



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA - IZTAPALAPA  
DIVISIÓN DE CIENCIAS BÁSICAS E INGENIERÍA

**“Formación y caracterización de biopelículas de  
*Acidithiobacillus thiooxidans* soportadas en grafito ”**

TESIS

Que presenta

M.C. Marcela Méndez Tovar

Para obtener el grado de académico

DOCTOR EN CIENCIAS (QUÍMICA)

Bajo la dirección de:

Dr. Ignacio González Martínez

Dra. J. Viridiana García Meza (UASLP)

Sinodales:

Dr. Ignacio González Martínez

Dr. Germán Buitrón Méndez

Dra. Margarita Miranda Hernández

Dra. Bibiana Cercado Quezada

Ciudad de México, 28 de Octubre de 2019

## Agradecimientos

Agradezco a Nacho por la dirección de esta tesis, sus comentarios y sobre todo por sus consejos profesionales y de vida. Así mismo, a Viridiana por brindarme todo el apoyo en el trabajo experimental y sus comentarios para la realización de este trabajo. Les agradezco toda su disposición, tiempo y apoyo en mi proceso de formación académica, que la vida se los regrese multiplicado y en abundancia.

Agracezco a mi comité de seguimiento: Margarita Miranda, Bibiana Cercado y Mariano Gutiérrez por todos sus acertados comentarios. Un agradecimiento especial a Francisco Galindo Murillo y Aurora Robledo Cabrera de la UASLP, por su asistencia técnica durante los análisis de ESEM y Raman, respectivamente. Se agradece también a Araceli Patrón-Soberano (IPICyT) por el pretratamiento de las biopelículas para su observación por ESEM. A CONACYT por la beca otorgada.

Doy gracias a mi mamá por confiar siempre en mí, inspirarme y cuidarme todos estos años. Gracias papá por apoyarme y creer que la educación es el mejor regalo que pueda tener.

Gracias a mis hermanos Miriam y Héctor por ser mis compañeros de aventuras.

Gracias a mis amigos del lab Conny, Greg, Ilda, Carlos, Guadalupe, Alice, Chico Chubbie, por estar conmigo en esta aventura llamada posgrado y ser de gran apoyo; ha sido un placer estar con ustedes. Gracias a Edgar, Matías, Noé, Harrison, Deysi, Mike, Jarib, Esdras, Rubén por su compañía y ayuda.

Agradezco a Prospero por toda su ayuda y asesoría incondicional, a Albert por sus enseñanzas y disponibilidad. Gracias Paco por resolver todas mis dudas y todo tu apoyo.

Gracias a los nuevos integrantes de mi familia: a Tony, Mario, Sara, Alex, Hana, Rivka y David por aceptarme y estar ahí.

Agradezco a mis maestros y mis guías espirituales por su acompañamiento y ayuda emocional, sin ella no sé como lo hubiera logrado.

Agradezo a Isaac por ser mi coach, amigo, compañero y amor de mi vida y estar siempre ahí para mí. Te amo infinitamente, gracias por todo tu apoyo a lo largo de este proceso de aprendizaje, te dedico esta tesis con mucho amor.

¡Que la vida los colme de bendiciones!

---

## Publicaciones producto de esta tesis

M. Méndez-Tovar, J. V. García Meza, I. González, Electrochemical monitoring of *Acidithiobacillus thiooxidans* biofilm formation on graphite surface with elemental sulfur, *Bioelectrochemistry* 128 (2019) 30–38

---

## Índice

|  |           |
|--|-----------|
| <b>Resumen .....</b>   | <b>12</b> |
| <b>Abstract.....</b>   | <b>14</b> |
| <b>Capítulo 1 . Introducción .....</b>   | <b>16</b> |
| <b>1.1 Introducción.....</b>   | <b>17</b> |
| <b>Capítulo 2 . Antecedentes.....</b>  | <b>19</b> |
| <b>2.1 Acidithiobacillus thiooxidans .....</b>   | <b>20</b> |
| 2.1.1 Modelo de oxidación de azufre elemental y otros compuestos de azufre<br>reducidos para <i>A. thiooxidans</i> ..... | 20        |
| <b>2.2 A. thiooxidans y procesos de biolixiviación.....</b>  | <b>26</b> |
| <b>2.3 Biopelícula .....</b>   | <b>28</b> |
| 2.3.1 Adherencia y formación de biopelículas de <i>Acidithiobacillus sp.</i> ....  | 31        |
| <b>2.4 Sistemas Bioelectroquímicos .....</b>   | <b>33</b> |
| <b>2.4.1 Procesos Bioelectroquímicos relacionados con azufre.....</b>  | <b>34</b> |
| <b>2.5 Técnicas electroquímicas utilizadas para detección y seguimiento de<br/>    evolución de biopelícula.....</b>     | <b>36</b> |
| 2.5.1 Voltamperometría cíclica .....   | 36        |
| 2.5.2 Espectroscopía de Impedancia Electroquímica (EIS).....   | 42        |
| <b>Justificación.....</b>  | <b>48</b> |
| <b>Hipótesis .....</b>   | <b>49</b> |
| <b>Objetivo general .....</b>  | <b>49</b> |
| <b>Objetivos específicos.....</b>  | <b>49</b> |
| <b>Capítulo 3 . Metodología .....</b>  | <b>50</b> |
| <b>3.1. Medio de Cultivo.....</b>  | <b>51</b> |
| <b>3.2. Mantenimiento de cultivos .....</b>  | <b>51</b> |
| <b>3.3 Incremento de células en suspensión .....</b>   | <b>52</b> |
| <b>3.4. Lavado de electrodos de trabajo .....</b>  | <b>52</b> |

|   |           |
|---|-----------|
| <b>3.5. Sistema de tres electrodos (celda electroquímica)</b> .....   | <b>53</b> |
| <b>3.6 Medición del potencial de circuito abierto (OCP)</b> .....   | <b>53</b> |
| <b>3.6 Caracterización electroquímica de la interfase del bioelectrodo <i>in situ</i></b>   | <b>54</b> |
| <b>3.7. Caracterización electroquímica de la interfase del bioelectrodo <i>ex situ</i></b><br>.....   | <b>55</b> |
| 3.7.1 Condiciones experimentales parte 1: Adherencia y formación de una<br>biopelícula de <i>A. thiooxidans</i> soportada en electrodos de grafito<br>(bioelectrodos) ..... | 55        |
| 3.7.2 Condiciones experimentales parte 2: Caracterización electroquímica de<br>la interfase de bioelectrodos <i>ex situ</i> .....   | 57        |
| <b>3.8. Análisis microscópico de los bioelectrodos</b> .....  | <b>58</b> |
| 3.8.1. Preparación de muestras para ESEM .....  | 58        |
| 3.8.2. Preparación de muestras para Microscopía Confocal Laser de Barrido<br>(CLSM).....  | 60        |
| 3.9 Espectroscopía Raman.....   | 62        |
| <b>Capítulo 4 . Establecimiento de condiciones de operación</b> .....   | <b>63</b> |
| <b>4.1 Incremento de células en suspensión</b> .....  | <b>64</b> |
| <b>4.2 Caracterización del sistema abiótico</b> .....   | <b>67</b> |
| 4.2.1 Electrodos de trabajo .....   | 67        |
| 4.2.2. Selección de la ventana de potencial del sistema abiótico.....   | 68        |
| 4.2.3 Voltamperometría cíclica con tetrionato ( $S_4O_6^{2-}$ ) y azufre elemental ( $S^0$ )<br>.....   | 69        |
| 4.2.4. Selección de condiciones experimentales para EIS.....  | 72        |
| 4.2.5 Efecto del $S^0$ elemental adsorbido en el electrodo de grafito.....  | 74        |
| 4.2.6 Efecto del lavado y esterilización de los electrodos de trabajo .....   | 76        |
| <b>Capítulo 5 . Resultados y discusión</b> .....  | <b>78</b> |
| <b>5.1. Caracterización electroquímica de la interfase del bioelectrodo <i>in situ</i></b><br>.....   | <b>79</b> |
| <b>Medición del OCP durante el periodo de crecimiento de la población</b> .....   | <b>79</b> |
| <b>5.2 Caracterización microscópica de la interfase del bioelectrodo <i>ex situ</i></b> .....   | <b>86</b> |
| <b>Condiciones experimentales parte 1: Adherencia y formación de una<br/>    biopelícula de <i>A. thiooxidans</i> en electrodos de grafito (bioelectrodos)</b> .....        | <b>86</b> |
| 5.2.1 Análisis ESEM .....   | 86        |
| 5.2.2 Análisis CLSM.....  | 89        |
| 5.2.3 Análisis por Espectroscopía Raman .....   | 92        |

---

|   |            |
|---|------------|
| <b>5.3 Caracterización electroquímica de la interfase del bioelectrodo <i>ex situ</i></b>                                 | <b>95</b>  |
| <b>Condiciones experimentales parte 2: Caracterización electroquímica de la interfase de bioelectrodos <i>ex situ</i></b> | <b>95</b>  |
| 5.3.1 Resultados de Espectroscopía de Impedancia Electroquímica (EIS).....  | 95         |
| 5.3.2. Voltamperometría Cíclica.....  | 105        |
| <b>5.4 Comparación de las interfases <i>in situ</i> y <i>ex situ</i></b>  | <b>109</b> |
| <b>Capítulo 6 .Conclusiones y perspectivas.....</b>   | <b>111</b> |
| 6.1 Conclusiones.....   | 112        |
| 6.2 Perspectivas .....  | 112        |
| <b>Referencias .....</b>  | <b>114</b> |
| <b>Capítulo 7 . Anexos .....</b>  | <b>127</b> |
| Anexo 1 Datos experimentales adicionales.....   | 128        |
| Anexo 2 Recomendaciones e influencia de contaminación del sistema y su respuesta electroquímica .....                     | 129        |
| Anexo 3 Espectroscopía de impedancia electroquímica (EIS).....  | 132        |
| Anexo 4 Microscopía confocal láser de barrido (CLSM).....   | 134        |

# Índice de Figuras

## Capítulo 2

**Figura 2.1a)** Estructura molecular del azufre octamérico ( $S_8$ ). Las esferas amarillas representan los átomos de azufre ( $S^0$ ). .....21

**Figura 2.2** Representación esquemática del modelo de oxidación a partir de azufre elemental de especies reducidas de azufre para *Acidithiobacillus thiooxidans* DSM 1738. OMP, proteínas de membrana externa; SDO, sulfuro dioxigenasa; SOR, sulfuro oxigenasa reductasa; TTH, tetrionato hidrolasa; DoxDA, tiosulfato quinol oxidorreductasa; SoxABXYZ, operon sulfuro-oxidante; SQR, Sulfuroquinona; oxido reductasa. Abiotic: reacciones químicas espontáneas Modificado de Bobadilla et al. 2013 [39] y Rohwerder et al. 2003 [43]. .....24

**Figura 2.3** Variación del potencial de Nernst con respecto al porcentaje teórico oxidado de glutatión (GSSG). Los puntos fueron calculados utilizando la ecuación 2.13 [44], a 28 °C y pH 1.5 y utilizando diferentes concentraciones iniciales de GSH antes de su oxidación: Indicadas en la figura. ....26

**Figura 2.4** Esquema general de proceso de biolixiviación (mecanismo de polisulfuros) MS= sulfuro mineral, Lf= *Leptospirillum ferrooxidans*, Af= *Acidithiobacillus ferrooxidans*, At= *A. thiooxidans*. Modificado de Rohwerder y Sand [48]. .....27

**Figura 2.5** Etapas de formación de una biopelícula. 1) microorganismos libres se adhieren a la superficie, 2) y 3) Formación de microcolonias y macrocolonias, 4) desarrollo y producción de EPS, 5) desorción y dispersión. Modificado de Harrison et al. 2005 [56]. ....30

## Capítulo 3

**Figura 3.1** Celda electroquímica utilizada para caracterización de la interfase del bioelectrodo in situ. ....54

**Figura 3.2** Diagrama general del procedimiento de la caracterización de la interfase ex situ (medio de cultivo fresco). .....56

**Figura 3.3** Esquema representativo de la preparación de las muestras para su observación por ESEM [124]. .....58

## Capítulo 4

**Figura 4.1** Variación de las células en suspensión de *A. thiooxidans* en el medio de cultivo (tabla 3.1) con  $S^0$  como fuente de electrones/energía y el comportamiento del pH en el tiempo transcurrido desde la inoculación. Los experimentos se llevaron a cabo por triplicado y se muestra la desviación estándar. ....65

**Figura 4.2** Imagen obtenida mediante el microscopio óptico (40x) de una muestra de un cultivo de *A. thiooxidans* que corresponde al día 7 de incubación. ....66

|  |    |
|--|----|
| <b>Figura 4.3</b> Cultivos de <i>A. thiooxidans</i> . Izquierda, cultivo de 4 días; derecha, cultivo de 3.5 meses. ....  | 66 |
| <b>Figura 4.4</b> Imagen de SEM de la superficie del grafito utilizada como electrodo de trabajo. ....   | 67 |
| <b>Figura 4.5</b> Voltamperometrías cíclicas obtenidas en grafito a diferentes velocidades de barrido, en el medio de cultivo sin $S^0$ a pH 1.9. El barrido de potencial se inicia en el OCP en diferentes direcciones: a) sentido positivo, b) sentido negativo, y c) sentido positivo con agitación (100 rpm). ....   | 69 |
| <b>Figura 4.6</b> Voltamperometrías cíclicas ( $v= 5 \text{ mV s}^{-1}$ ) obtenidas en grafito, en el medio de cultivo pH 1.9 con $3 \text{ mM S}_4\text{O}_6^{2-}$ . El barrido de potencial se inicia en el OCP en dirección positiva y la dirección del barrido se invierte en diferentes potenciales indicados en la figura. El control se obtiene en ausencia de tetrationato. .... | 70 |
| <b>Figura 4.7</b> Voltamperometrías cíclicas obtenidas en grafito, en el medio de cultivo pH 1.9 con $S^0$ en suspensión. El barrido de potencial se inicia en el OCP en dirección positiva, a diferentes velocidades de barrido. ....   | 72 |
| <b>Figura 4.8</b> Espectros de Impedancia realizados a electrodos de grafito en medio de cultivo pH 1.9 con diferentes amplitudes, que se indican en la figura. a) Diagrama de Nyquist b) Diagrama Bode ángulo. ....   | 73 |
| <b>Figura 4.9</b> a) y b) Electrodos de grafito con $1 \text{ mg S}^0$ ; c) y d) electrodos grafito con $4 \text{ mg S}^0$ (la superficie fue completamente cubierta) e) Sistema de tres electrodos en medio de cultivo pH 1.9, sin $S^0$ en suspensión. ....  | 74 |
| <b>Figura 4.10</b> Electrodos de grafito cubiertos con diferentes cantidades de $S^0$ . Los EIS fueron obtenidos en $\text{OCP} \pm 10 \text{ mV}$ . a) Diagrama de Nyquist. b) Diagrama de Bode fase. c) CV en sentido negativo a partir de OCP $v = 1 \text{ mV s}^{-1}$ . ....  | 75 |
| <b>Figura 4.11</b> Espectros de Impedancia de un electrodo de grafito, diferentes mediciones después de esterilizar en autoclave. a) Diagrama de Nyquist. b) Diagrama de Bode fase. ....   | 77 |

## Capítulo 5

|   |    |
|---|----|
| <b>Figura 5.1</b> Variación del Potencial a circuito abierto (OCP) durante el tiempo de inmersión de una barra de grafito en el medio de cultivo con $S^0$ en suspensión: sistema abiótico y sistema biótico. ....  | 80 |
| <b>Figura 5.2</b> Experimento in situ. Diagramas de Nyquist obtenidos en función del tiempo de inmersión (indicados en la figura), en un electrodo de grafito en el medio de cultivo con $S^0$ en suspensión y en presencia de un inóculo de <i>A. thiooxidans</i> , sin agitación, con ampliación a altas frecuencias. Se incluye el diagrama obtenido en ausencia de microorganismos (abiótico). .... | 81 |
| <b>Figura 5.3</b> Diagramas de Nyquist obtenidos en función del tiempo de inmersión (indicados en la figura), en un electrodo de grafito en el medio de cultivo con $S^0$ en suspensión, sin  |    |

---

agitación. Experimento in situ. a) Control abiótico. b) Sistema biótico (con inóculo de *A. thiooxidans*.) .....82

**Figura 5.4** Diagramas de Bode fase obtenidos en un electrodo de grafito en el medio de cultivo. Los espectros fueron obtenidos a los diferentes días, indicados en la figura sin agitación. Experimento in situ. a) Control Abiótico b) Sistema Biótico (con inóculo de *A. thiooxidans*). .....83

**Figura 5.5** Caracterización de la interfase. a) Voltamperometría Cíclica ( $v = 1 \text{ mVs}^{-1}$ ) obtenida en el electrodo en medio de cultivo con  $S^0$  al finalizar el séptimo día. En ausencia (sistema abiótico) y presencia (sistema biótico) de *A. thiooxidans*. El barrido de potencial se inicia desde el OCP en dirección positiva. ....84

**Figura 5.6** Imagen de ESEM del bioelectrodo al séptimo día de haber inoculado la celda electroquímica con *A. thiooxidans*. Las flechas indican las células adheridas. ....85

**Figura 5.7** Imágenes de ESEM de los bioelectrodos después de diferentes tiempos de incubación: a) 2h; b) y c) 7 días; d) control abiótico después de 7 días. Figura c' es una magnificación de la superficie indicada por la flecha en la figura c. Imágenes obtenidas a diferentes ampliaciones. ....88

**Figura 5.8** Imágenes de CLSM de biopelículas de *A. thiooxidans* colonizando electrodos de grafito. Las imágenes en fila corresponden a diferentes tiempos de incubación con  $S^0$ : a) 1 b) 3 c) 5 y d) 7 días en medio de cultivo con  $S^0$ . La primer columna corresponde a la superficie del grafito sin ninguna señal emitida (imagen óptica); epifluorescencia de EPS hidrofílicos como exopolisacáridos teñidos con Con-A aparecen en verde (segunda columna), mientras que EPS hidrofóbicos teñidos con RN aparecen en rojo (tercer columna); Se presenta un traslape de la imágenes (ópticas y con epifluorescencia) en la cuarta columna. Imágenes obtenidas a diferentes ampliaciones (como se indica). ....90

**Figura 5.9** Reconstrucción 3-D despues de un análisis de CLSM de *A. thiooxidans* colonizando un electrodo de grafito, se muestra un traslape de ambas señales de epifluorecencia (verde para EPS hidrofílicos teñidos con Con-A, y rojo para EPS hidrofóbicos teñidos con NR). Imágenes obtenidas despues de a) 1, b) 3, c) 5 y d) 7 días en medio con  $S^0$  .....91

**Figura 5.10** Imágenes de CLSM de biopelículas de *A. thiooxidans* colonizando electrodos de grafito. Todas las imágenes corresponden a un tiempo de incubación de 3 días con  $S^0$ . a) epifluorescencia de ADN, se tiñió con NA (color azul) b) EPS hidrofílicos como exopolisacáridos teñidos con Con-A (color verde) c) EPS hidrofóbicos teñidos con RN (color rojo) d) Superficie grafito e)Traslape de las imágenes anteriores.....92

**Figura 5.11** Evidencia de azufre elemental en grafito mediante análisis Raman. Los espectros corresponden a los días 1 y 7 indicados en la figura. Los picos principales están asociados con las especies químicas correspondientes. Los picos Raman fueron identificados usando la base de datos RRUFF [125] así como otras fuentes. [41,126–129]. .....93

**Figura 5.12** Imágenes del bioelectrodo después de 3 días de incubación. Las partículas de azufre adheridas en la superficie del grafito están indicadas con flechas. ....94

---

|   |     |
|---|-----|
| <b>Figura 5.13</b> Diagramas de EIS obtenidos en una celda electroquímica con medio de cultivo fresco sin S <sup>0</sup> . Los bioelectrodos con <i>A. thiooxidans</i> a diferentes días, como se indica en la figura. Los puntos corresponden a los datos experimentales y la línea continua corresponde al ajuste obtenido mediante el circuito equivalente mostrado en la figura 5.15. a) Diagrama 3D Nyquist. b) Diagrama 2D Bode fase.....   | 97  |
| <b>Figura 5.14</b> Residuales de las componentes reales e imaginarias evaluadas con el programa Lin KK Tool [121] de los espectros obtenidos en una celda electroquímica con medio fresco sin azufre a) Control Abiótico b) Bioelectrodo tomado del frasco inoculado con <i>A. thiooxidans</i> en el día 7.....   | 99  |
| <b>Figura 5.15</b> Circuito equivalente propuesto para ajustar los diagramas de impedancia experimentales en la interfase del bioelectrodo.; adaptado de [106,107,114]. R <sub>1</sub> = resistencia de la solución, R <sub>2</sub> = resistencia de la biopelícula, CPE <sub>1</sub> =capacitancia de la biopelícula representada con un elemento de fase constante, R <sub>3</sub> =resistencia a la transferencia de carga. ....   | 100 |
| <b>Figura 5.16</b> Variación de los elementos eléctricos obtenidos para el ajuste con eec de la Figura 10.3 de los espectros de EIS para el control y bioelectrodos a diferentes tiempos de incubación a) Resistencia de la solución (R <sub>1</sub> ) y (R <sub>2</sub> ) de la biopelícula b) Resistencia a la transferencia de carga (R <sub>3</sub> ) c) Capacitancia de la biopelícula y sus respectivos valores de n <sub>1</sub> d) C <sub>2</sub> y sus respectivos valores de n <sub>2</sub> .....             | 103 |
| <b>Figura 5.17</b> Voltamperometría cíclica (v =1 mVs <sup>-1</sup> ), realizadas en el sistema electroquímico con medio fresco sin S <sup>0</sup> . El bioelectrodo fue tomado del cultivo de <i>A. thiooxidans</i> en los días indicados. El barrido del potencial se inició del OCP en dirección positiva a) sin agitación b) 100 rpm. ....  | 106 |
| <b>Figura 5.18</b> Diagramas de Bode obtenidos de bioelectrodos con <i>A. thiooxidans</i> a diferentes tiempos de inmersión a) estrategia in situ: celda electroquímica con <i>A. thiooxidans</i> , medio de cultivo y S <sup>0</sup> en suspensión b) estrategia ex situ: los bioelectrodos se incubaron en un frasco con <i>A. thiooxidans</i> y S <sup>0</sup> , posteriormente se extrajeron los bioelectrodos y fueron analizados en una celda electroquímica con medio de cultivo fresco sin S <sup>0</sup> ..... | 110 |

---

## Índice de tablas

|  |     |
|--|-----|
| <b>Tabla 2.1</b> Diferentes biopelículas soportadas en un electrodo y su respectivo CV. ....   | 38  |
| <b>Tabla 2.2</b> Propuestas de circuito equivalente como análisis de la EIS para la observación/seguimiento de adherencia y desarrollo de biopelículas con diferentes bacterias..... | 44  |
| <b>Tabla 3.1</b> Composición química del medio de cultivo utilizado. ....  | 51  |
| <b>Tabla 5.1</b> Constantes dieléctricas de algunos compuestos relacionados. ....  | 104 |

## Resumen

*Acidithiobacillus thiooxidans* es una bacteria sulfuroxidante que utiliza compuestos inorgánicos reducidos de azufre (RISC, por sus siglas en inglés) como fuente de energía [1–4]. Al ser una bacteria quimiolitotrófica, se utiliza en procesos de biolixiviación de diversos sulfuros minerales [5]. En los últimos años el uso de microorganismos acidófilos y quimiolitotróficos se ha propuesto como una alternativa en los sistemas bioelectroquímicos (BES) que operan a pH ácido. Uno de los aspectos importantes en los sistemas bioelectroquímicos radica en la importancia de la biopelícula soportada en materiales a base de carbono. Aunque la formación y desarrollo de biopelículas se ha estudiado en superficies de sulfuros minerales (SM) por la principal aplicación de estos microorganismos, los estudios interfaciales en materiales de carbono (orientados a BES) son escasos y enfocados a caracterizar únicamente procesos redox. A pHs ácidos se carece de estudios sobre los fenómenos que ocurren en la interfase electrodo/bacteria-biopelícula/solución. Debido a las posibles aplicaciones de las biopelículas en procesos bioelectroquímicos, es necesario investigar el crecimiento de una biopelícula en un soporte sólido en condiciones ácidas. En este trabajo se estudió la formación de biopelículas de *Acidithiobacillus thiooxidans* sobre una superficie de grafito. Se establecieron las condiciones de operación tanto microbiológicas como electroquímicas y los respectivos controles abióticos. Para poder estudiar la formación y evolución de la biopelícula se ensayaron dos estrategias experimentales: condiciones *in situ* y *ex situ*; en la caracterización de la interfase *in situ*, se enmascara la respuesta de la biopelícula debido al medio de cultivo “envejecido”, siendo más efectiva la estrategia *ex situ*. En esta estrategia primero se formó la biopelícula y posteriormente se analizó en un sistema de tres electrodos con medio de cultivo fresco. Mediante la técnica de EIS, se obtuvieron espectros a diferentes tiempos de formación y desarrollo de la biopelícula, a los cuales se

---

verificó el estado estacionario de los bioelectrodos; posteriormente se propuso el ajuste de los espectros a un circuito equivalente (*eec*) para obtener los parámetros eléctricos (Resistencia de la solución, Resistencia de la biopelícula, Resistencia a la transferencia de carga y Capacitancia de la biopelícula) correspondientes a cada día de incubación. Por medio de microscopía confocal láser de barrido (CLSM) se detectaron las sustancias poliméricas extracelulares (EPS) de la superficie de los bioelectrodos, (exopolisacáridos, compuestos hidrofóbicos y ADN). Contrastando la información obtenida por EIS (parámetros eléctricos) con las imágenes de CLSM, se observó que la respuesta obtenida por EIS está relacionada con la modificación de las EPS (proporción de compuestos hidrofóbicos/exopolisacáridos) que tiene la biopelícula a diferentes tiempos de incubación. Se observó que cuando se tiene una mayor proporción de compuestos hidrofóbicos/exopolisacáridos, incrementa la resistencia de la biopelícula. Se realizó una voltamperometría cíclica a cada bioelectrodo donde se detectó un proceso de reducción irreversible (0.1- 0.2 V vs. NHE) que incrementa a medida que los tiempos de incubación de la biopelícula son mayores; esta señal se asoció al par redox del glutatión que se encuentra en las proteínas de membrana externa de *A. thiooxidans*. El análisis de Raman demostró S<sup>0</sup> adherido a la superficie de grafito y también polisulfuros como subproductos de la biooxidación.

## Abstract

*Acidithiobacillus thiooxidans* is a sulfur-oxidizing bacteria that uses reduced inorganic compounds of sulfur (RISC) as an energy source [1-4]. This chemolithotrophic bacteria is widely used in bioleaching processes of diverse mineral sulphides [5]. In recent years the use of acidophile and chemolithotrophic microorganisms has been proposed as an alternative in bioelectrochemical systems (BES) that operate at acidic pHs. One of the important aspects in bioelectrochemical systems lies in the biofilm supported on carbon-based materials. Because of the application of these microorganisms, the formation and development of chemolithotrophic biofilms has been studied in sulphide mineral surfaces; however, interfacial studies in carbon materials (oriented to BES) are scarce and only focus on the characterization of redox processes. While the studies of the phenomena that occur at the bacteria-electrode/biofilm/solution interface remain unexplored. Due to the possible applications of biofilms in bioelectrochemical processes, it is necessary to investigate the biofilm growth in a solid support under acidic conditions. In this work, the biofilm formation of *Acidithiobacillus thiooxidans* was studied on a graphite surface. The microbiological and electrochemical conditions and its respective abiotic controls were established. In order to study biofilm formation and its evolution, two strategies were proposed: *in situ* and *ex situ* conditions; during the *in situ* characterization of the interface, biofilm response was masked due to the “aged” culture medium; meanwhile, it was more effective to use *ex situ* strategy. In this strategy the biofilms were grown and subsequently analyzed in a three electrode system with fresh medium. By using EIS technique, the spectra were obtained at different incubation times, the stationary state of the bioelectrodes was verified; subsequently, the fitting of EIS of the spectra to an electric equivalent circuit (*eec*) was proposed to obtain the electrical parameters (solution resistance, biofilm resistance, charge transfer resistance and biofilm capacitance) corresponding to each incubation day. Extracellular Polymeric Substances (EPS) such as exopolysaccharides, hydrophobic compounds and DNA were detected on the surface of the bioelectrodes using confocal laser scanning microscopy (CLSM).

Comparing the information obtained by EIS (electrical parameters) with the CLSM images, a correlation between the EIS response and the modification of the EPS (hydrophobic compounds/exopolysaccharides ratio) at different incubation times was observed. Specifically, when there is a greater ratio of hydrophobic compounds/exopolysaccharides, the biofilm resistance increases. Cyclic voltammetry detected an irreversible reduction process (0.1-0.2 V vs NHE) that increases with longer incubation times of the biofilm; this signal is associated with the glutathione redox pair that is found in the proteins of the outer membrane of *A. thiooxidans*. Raman analysis showed  $S^0$  adhered to the graphite surface as well as polysulfides as byproducts of the biooxidation.

# Capítulo 1 . Introducción

*“En la vida no existe nada que temer, sólo cosas que comprender”  
Marie Curie*

## 1.1 Introducción

*Acidithiobacillus thiooxidans* es un microorganismo quimiolitotrófico sulfuroxidante que utiliza compuestos inorgánicos reducidos de azufre (RISC, por sus siglas en inglés) como fuente de energía [1–4]. Es una bacteria acidófila que vive a pHs menores a 3 que se utiliza en procesos de biolixiviación de diversos sulfuros minerales [5], junto con otras bacterias como *Acidithiobacillus ferrooxidans* y *Leptospirillum ferrooxidans*. Uno de los aspectos más estudiados en los procesos de biolixiviación es la adhesión de la bacteria al mineral y la formación de biopelículas, pues se le considera una pieza fundamental para comprender la biolixiviación por contacto [5]. La adherencia y formación de biopelículas de *A. thiooxidans* se ha estudiado en diferentes superficies principalmente en sulfuros minerales como pirita ( $\text{FeS}_2$ ) [6–10], calcopirita ( $\text{CuFeS}_2$ ) [6,11,12] y arsenopirita ( $\text{CuFeS}$ ) [13,14]; también ha sido estudiada en azufre elemental [6] y otros materiales como cuarzo [6] y vidrio [7].

Los sistemas bioelectroquímicos (BES, por sus siglas en inglés) son sistemas capaces de convertir la energía química en energía eléctrica y viceversa, mediante el uso de microorganismos como catalizadores. Aunque los BES tienen diversas aplicaciones [15–17], en general se utilizan como una tecnología para producir electricidad y tratar aguas residuales o residuos [18–21]. Los BES dependen de múltiples factores, uno de los cuales es la formación de la biopelícula en la superficie del electrodo [22]; generalmente se utilizan como electrodos, materiales a base de carbono (grafito, carbón activado, carbón vitreo, nanotubos) por su estabilidad química, conductividad, biocompatibilidad y bajo costo [22,23]. Las investigaciones en BES que operan a pHs ácidos son un área poco investigada; existen estudios sobre la remoción de compuestos de azufre como tetrionato ( $\text{S}_4\text{O}_6^{2-}$ ) y calcopirita ( $\text{CuFeS}_2$ ) a pHs ácidos, utilizando microorganismos quimiolitotróficos que utilizan RISC, como fuente de energía [1–4], abriendo la posibilidad de tratar aguas de diversos efluentes en condiciones ácidas como el drenaje ácido de roca y efluentes residuales provenientes de la biolixiviación de minerales. Los

microorganismos encontrados en los BES a pH ácido pertenecen a los géneros *Thermoplasma*, *Ferroplasma*, *Leptospirillum*, *Sulfobacillus* y *Acidithiobacillus* [1–4]. Los estudios relacionados con los fenómenos que suceden en la interfase electrodo/bacteria-biopelícula/solución usando grafito como electrodo y en condiciones ácidas son muy escasos: se ha estudiado la formación de la biopelícula de *A. ferroxidans* en fieltro de grafito [24] y se ha utilizado grafito como soporte para la formación de una biopelícula a partir de un cultivo mixto de *A. thiooxidans* y *Leptospirillum sp.* [1]. Estos estudios se han limitado a identificar los procesos redox relacionados con la biopelícula en el electrodo sin proporcionar información cuantitativa de lo que está sucediendo en la interfase electrodo/bacteria-biopelícula/solución. Debido a las posibles aplicaciones de las biopelículas en diversos procesos bioelectroquímicos, es necesario investigar cómo la biopelícula evoluciona en un soporte sólido en condiciones ácidas y, obtener datos cuantitativos sobre cómo cambia la interfase en ausencia de un potencial aplicado. En este trabajo se propone estudiar el desarrollo de una biopelícula en condiciones ácidas soportada en grafito (sin perturbación eléctrica) y caracterizar las propiedades eléctricas de la interfase electrodo/bacteria-biopelícula/solución; con la finalidad de establecer las condiciones idóneas de crecimiento de la biopelícula, se utiliza como fuente de energía tanto un compuesto de azufre soluble en agua ( $S_4O_6^{2-}$ ) y como uno sólido (azufre elemental). Se propone estudiar la interfase en un sistema de tres electrodos para poder caracterizar el bioelectrodo mediante técnicas electroquímicas y de microscopía.

## **Capítulo 2 . Antecedentes**

*“En todo caos existe un cosmos, en todo desorden, un orden secreto “*  
*Carl Jung*

## 2.1 *Acidithiobacillus thiooxidans*

Los microorganismos quimiolitotróficos oxidan compuestos inorgánicos como fuente de electrones (energía), y reducen el CO<sub>2</sub> como fuente de carbono. La bacteria *Acidithiobacillus thiooxidans* pertenece a las  $\gamma$ -proteobacteria Gram-negativas, es una bacteria acidófila pues vive a pH menor a 3. Los sulfuros son una fuente de energía para quimiolitotróficos durante la fijación de CO<sub>2</sub> o para la asimilación de nitritos o nitratos, hecho de crucial importancia evolutiva que implica, además, la disolución ácida de los sulfuros minerales (SM) [25,26]. Este microorganismo utiliza la energía química almacenada en sulfuros minerales (SM), durante su biooxidación; produciéndose los iones metálicos correspondientes y especies intermediarias de azufre mejor conocidas como RISC: azufre elemental, tetrionato, tiosulfato, sulfato, entre otros. Además de ser ampliamente estudiada en procesos de biolixiviación (sección 2.2), *A. thiooxidans* ha sido utilizada para remediación de suelos contaminados con metales pesados [27–31] y para la recuperación de metales (Cu, Ni, Zn entre otros) a partir de residuos electrónicos [32–34].

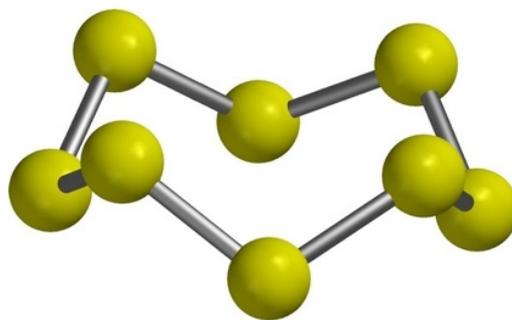
Esta bacteria es mesofílica, con una temperatura óptima de 28-30°C. A temperaturas más bajas (por debajo de 18°C) y a temperaturas más altas (37°C o más) el incremento de biomasa es más lento mientras que las temperaturas en un intervalo de 55-60°C pueden ser fatales aún si son por periodos cortos [35]. Se le considera una aerobia estricta, que puede oxidar el azufre mediante su sistema Sox (ver sección 2.1.1).

### 2.1.1 Modelo de oxidación de azufre elemental y otros compuestos de azufre reducidos para *A. thiooxidans*

Considerando la química del azufre, es claro que varios RISC se forman durante la biolixiviación de SM por las bacterias acidófilas. En estas bacterias un conjunto de proteínas, el denominado sistema Sox, puede ser responsable de la oxidación de sulfuros, azufre elemental, tiosulfato y sulfito a sulfato, acompañado de la

transferencia de electrones al citocromo *c*. Contrario a este descubrimiento, *A. ferrooxidans* y otras bacterias oxidantes de azufre carecen del sistema Sox [36–38]. No obstante, aunque se desconoce la ruta exacta de la oxidación del azufre en las bacterias acidófilas, se puede proponer un mecanismo y las enzimas involucradas en la oxidación. A continuación, se presenta un modelo de la oxidación de azufre elemental y otros compuestos de azufre reducidos en *Acidithiobacillus thiooxidans* [39], se recomienda observar la Figura 2.1 y 2.2 para una mayor comprensión.

1. El azufre elemental,  $S^0$ , puede adoptar diversas formas estructurales (alotrópos) entre las cuales se considera al anillo octamérico ( $S_8$ ) como la forma más estable (Figura 2.1) que forma cristales con extremadamente baja solubilidad [40–42]. Como consecuencia, una activación previa a la biooxidación del azufre es necesaria; es imprescindible romper el anillo mediante una reducción extracelular y ser transportado a través de la membrana externa mediante proteínas con grupos tiol (proteínas de membrana externa transportadoras de tioles, OMP), ver Figura 2.2. Esto debido a que la enzima sulfuro-dioxigenasa (SDO) que está localizada en el periplasma, característica de las bacterias Gram negativas, no puede oxidar extracelularmente de forma directa, el azufre elemental. En esta etapa los grupos tiol reaccionan con el azufre para formar “persulfide sulfur” ( $-RSS^-$ ).



**Figura 2.1a)** Estructura molecular del azufre octamérico ( $S_8$ ). Las esferas amarillas representan los átomos de azufre ( $S^0$ ).

2. El  $-RSS^-$  puede ser oxidado por la enzima sulfuro-dioxigenasa (SDO) o sulfuro oxigenasa reductasa (SOR) de forma simultánea. No obstante, debido a la disponibilidad fisiológica del sustrato (fuente de energía) y a la

localización de las enzimas, el 99% del sustrato es oxidado por SDO a sulfito (ver reacción 2.6), que es una enzima que se encuentra en el periplasma mientras que SOR se encuentra en el citoplasma; ésta además de reducir el  $-RSS^-$  a  $HS^-$  también lo oxida a sulfito ( $SO_3^{2-}$ )

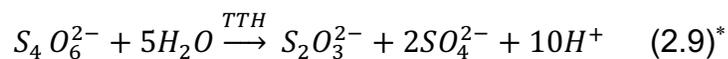
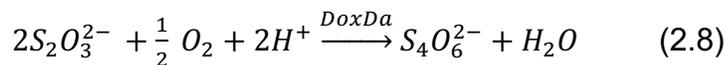


3. El ion sulfito puede reaccionar abióticamente con azufre elemental para dar tiosulfato ( $S_2O_3^{2-}$ ). Ver reacción 2.7



4. El tiosulfato puede ser oxidado por dos formas:

- a) Por la enzima tiosulfato quinol oxidoreductasa (DoxDa) para formar tetrionato ( $S_4O_6^{2-}$ ), ver reacción 2.8; a su vez el tetrionato puede reaccionar de forma abiótica para dar tiosulfato, sulfatos y azufre elemental. Otra opción es que la enzima tetrionato hidrolasa (TTH) reaccione con el tetrionato para producir tiosulfato y sulfatos ( $SO_4^{2-}$ ), ver reacción 2.9.



- b) El tiosulfato es oxidado por el sistema Sox (genes SoxABXYZ) hasta sulfatos o, bien que de la interacción con las proteínas SoxAX y SoxB se generen polisulfuros ( $S_n^{2-}$ ) que pueden ser oxidados a azufre elemental, como se observa en la reacción catalizada por la enzima sulfuro quinona-oxidoreductasa (SQR), presente en *A. thiooxidans*. Ver reacción 2.10.

---

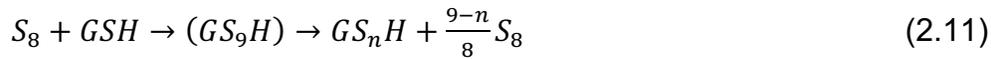
\* Reacción pendiente balancear carga, tomada de esquema de Bobadilla et al 2013 [39].



El azufre de valencia cero ( $S^0$ ) es libre y puede formar agregados (glóbulos de azufre en el espacio periplasmático).



Ampliando el punto 1 referido a la oxidación del azufre elemental, también se ha estudiado que el glutatión está involucrado en la ruptura del anillo octamérico del  $S_8$  y su linealización (RSSH) (reacción 2.11) para poder ser transportado mediante las proteínas de membrana externa [43].

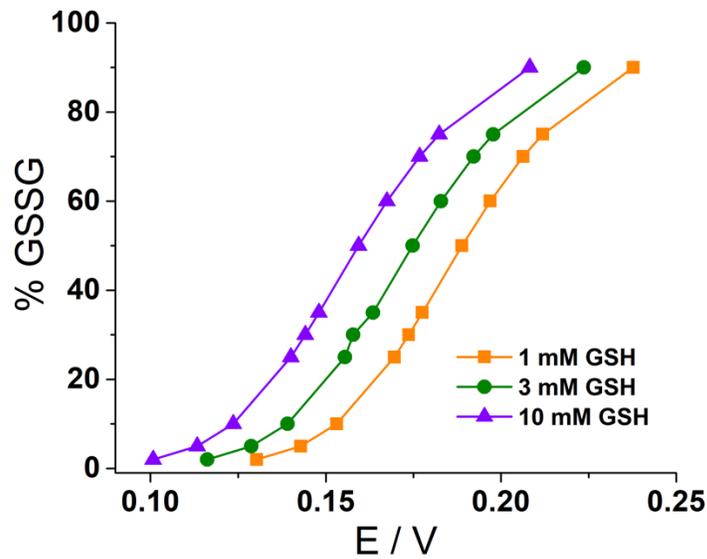


Por esta situación, es importante considerar el par redox del glutatión:



$$E = E^0 - \frac{59.1 \text{ mV}}{n} \log \frac{[GSH]^2}{[GSSG][H^+]^2} \quad (2.13)$$

Schafer et al. [44] calcularon el potencial de Nernst del par GSSG/GSH a pH neutro y observaron que el potencial es dependiente de la concentración de GSH (ecuación 2.13). En la Figura 2.3 se calcularon los potenciales de reducción de este par redox, pero utilizando un pH ácido de 1.5. La ordenada representa el porcentaje de GSH que ha sido oxidado a GSSG. Las concentraciones de GSH que pueden existir en la célula antes de que se oxide están en un intervalo entre 10 y 1 mM [44] aunque puede encontrarse en concentraciones más pequeñas [45]. Este gráfico muestra las proporciones de  $[GSH]/[GSSG]$  a los diferentes potenciales de reducción, a medida que la concentración de GSH se modifica para un pH ácido.

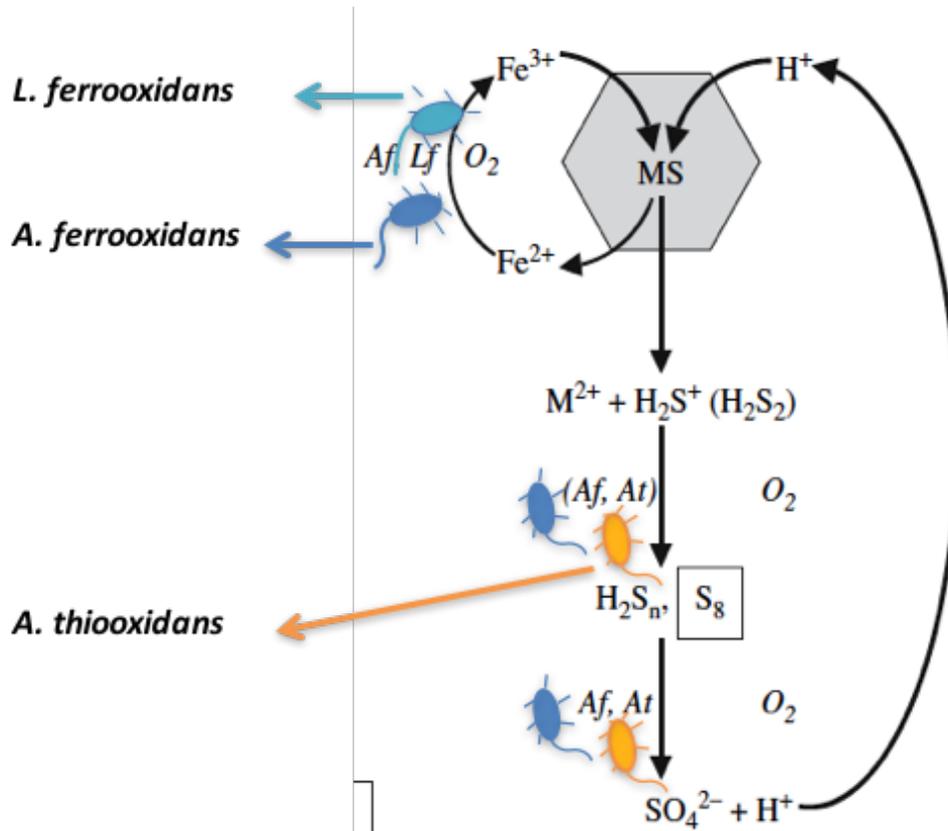


**Figura 2.3** Variación del potencial de Nernst con respecto al porcentaje teórico oxidado de glutatión (GSSG). Los puntos fueron calculados utilizando la ecuación 2.13 [44], a 28°C y pH 1.5 y utilizando diferentes concentraciones iniciales de GSH antes de su oxidación: Indicadas en la figura.

## 2.2 A. thiooxidans y procesos de biolixiviación

La calcopirita ( $\text{CuFeS}_2$ ) es la mayor fuente de cobre a nivel mundial [46]; es difícil y costoso extraer cobre a través de la calcopirita usando los métodos tradicionales, debido a que está generalmente asociada con otros minerales como pirita, calcita entre otros [47]. La biolixiviación puede ser la alternativa más efectiva en cuanto a costos y procesos ambientalmente amigables [47]; por más de medio siglo, el uso de microorganismos acidófilos se ha utilizado para desempeñar el proceso de biolixiviación de diversos sulfuros minerales de forma industrial [5]. Este proceso consiste en fragmentar los minerales y apilarlos sobre una pila permeable, después, se bombea agua a pH ácido desde la parte superior. Los microorganismos acidófilos acelerarán la disolución de sulfuros minerales vía la oxidación del ion ferroso y/o compuestos de azufre [5]. *Acidithiobacillus ferrooxidans*, *Leptospirillum ferrooxidans* y *Acidithiobacillus thiooxidans* son las especies mesófilas más comunes. *A. ferrooxidans* puede oxidar tanto los iones ferrosos ( $\text{Fe}^{2+}$ ) como compuestos de azufre; mientras que *A. thiooxidans* es únicamente un sulfuroxidante [5] y es muy

importante para evitar la pasivación del mineral y contribuye al mantenimiento de un pH ácido mediante la biooxidación del azufre elemental a ácido sulfúrico. En la Figura 2.4 se describe el esquema general del proceso de biolixiviación de un sulfuro mineral mediante el mecanismo de los polisulfuros [48].



**Figura 2.4** Esquema general de proceso de biolixiviación (mecanismo de polisulfuros) MS= sulfuro mineral, Lf= *Leptospirillum ferrooxidans*, Af= *Acidithiobacillus ferrooxidans*, At= *A. thiooxidans*. Modificado de Rohwerder y Sand [48].

Uno de los aspectos más estudiados en los procesos de biolixiviación es la adhesión de la bacteria al mineral y la formación de biopelículas, pues se le considera una pieza fundamental para comprender la biolixiviación por contacto [49–52]. Es por este motivo que a continuación se describe la formación de una biopelícula.

## 2.3 Biopelícula

Se define como biopelícula a una comunidad de microorganismos embebidos dentro de una matriz de compuestos químicos producidos por sí mismos, conocidos como sustancias poliméricas extracelulares (EPS) compuesta por iones, gases, compuestos, partículas coloidales y canales de agua.

Debido a su heterogeneidad con el paso del tiempo, las biopelículas se representan como un sistema dinámico [53]. Estudios han demostrado que la mayoría de las comunidades microbianas pasan gran parte de su ciclo de vida dentro de una biopelícula, prefiriendo “un estilo de vida sedentario a una existencia nómada” [53]. El motivo más importante por el cual los microorganismos se integran a biopelículas es para maximizar sus capacidades metabólicas o como estrategia para adaptarse a condiciones ambientales inestables. Cuando éstas no son favorables, se da una respuesta biológica característica al estrés inducido [54]. En la mayoría de los ambientes naturales, la asociación de estas biopelículas a superficies o interfases, es su estilo de vida predominante, pues éste provee un microambiente favorable donde las células no se encuentran comprometidas por el esfuerzo cortante [55]. Aunque cada célula en la biopelícula tiene sus propias respuestas al estrés, el vivir en una comunidad provee mecanismos de supervivencia, siendo la heterogeneidad su mayor ventaja [54].

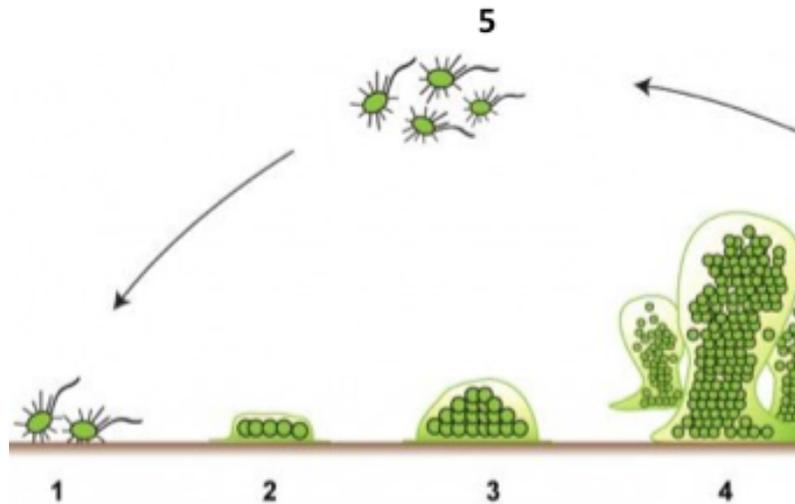
Los microorganismos embebidos en una biopelícula pertenecen a una o diferentes especies, siendo la matriz extracelular polimérica de EPS la que mantiene la cohesión y la posibilidad de interactuar entre ellas [56]. El desarrollo de una biopelícula microbiana ofrece varias ventajas en contraste con las bacterias al estado libre y suspendidas; la proximidad de diferentes células favorece interacciones sinérgicas, las células se distribuyen naturalmente en la biopelícula de acuerdo a requerimientos específicos (aerobias estrictas, anaerobias facultativas, anaerobias estrictas, acidófilas, entre otros); como consecuencia, dentro de la biopelícula pueden encontrarse zonas con diferentes gradientes de

aeración, acidificación, iones. Estas zonas enriquecen el establecimiento de estas complejas comunidades simbióticas [56].

En las biopelículas heterogéneas existen limitaciones de transporte de masa (difusión) que pueden controlar los nutrientes y otras sustancias fluyendo a través de la biopelícula [57]. Mientras que en microorganismos de vida libre, la difusión de especies químicas no es un factor limitante para la obtención de nutrientes por la célula [57], debido a que el medio de cultivo o el electrolito en donde están presentes, están generalmente bajo un flujo o en condiciones de agitación y por consecuencia existe un transporte fácil de especies químicas hacia las células [57].

Las EPS y las células pueden estar negativamente cargadas [56], haciendo posible el acomplejamiento de las partículas cargadas (algunos minerales u otros compuestos) que sirven a las células como nutrientes; las EPS también actúan como un intercambiador de iones [58] en tal forma que restringe el transporte de ciertos agentes químicos (antibióticos, biocidas, dispersantes, desinfectantes) a través de la biopelícula [57,59,60], además de actuar como un filtro molecular y un adsorbente [61]. Bajo la mayoría de las circunstancias, este fenómeno es indeseable para la industria. Por ejemplo, las limitaciones de difusión a través de una biopelícula podrían disminuir la concentración de agentes antimicrobianos a concentraciones menos letales, que no afectan a los microorganismos en un sistema [62], o en concentraciones que permitan que los microorganismos degraden ciertos compuestos.

La Figura 2.5 muestra que el proceso de formación de una biopelícula está compuesto de varias etapas y es muy complejo. Se propone que la formación de una biopelícula comprende los siguientes eventos: movimiento de bacterias en estado libre hacia una superficie, adhesión más o menos irreversible a la superficie, colonización con división celular y secreción de EPS; ya madura, sucede la desorción total o parcial de la biopelícula y la dispersión de células.



**Figura 2.5** Etapas de formación de una biopelícula. 1) microorganismos libres se adhieren a la superficie, 2) y 3) Formación de microcolonias y macrocolonias, 4) desarrollo y producción de EPS, 5) desorción y dispersión. Modificado de Harrison et al. 2005 [56].

Las bacterias en estado libre están buscando nutrientes para sobrevivir [63]. En la superficie de diversos materiales pueden encontrar nutrientes adsorbidos. Los nutrientes son transportados desde el seno del electrolito a la superficie. Es muy común que las bacterias se muevan hacia las superficies por quimiotaxis, motivadas por la existencia de una fuente de energía; sin embargo, la adhesión (*attachment*) no es tan fácil pues deben superar ciertos obstáculos como el flujo, condiciones de la superficie, fuerzas coulómbicas, hidrofobicidad/hidrofilicidad [63]. Organelos extracelulares, como flagelos, fimbrias o pili; así como proteínas de membrana externa han mostrado que pueden ayudar a la bacteria a “sensar” e interactuar con una superficie [63–65]. Estas interacciones pueden ayudar a las células a superar las fuerzas repulsivas, este proceso es crítico para la formación de la estructura de la biopelícula, y es influenciado por la superficie del sustrato (por ejemplo, hidrofobicidad) [63]. En esta etapa, las bacterias generalmente se mantienen en movimiento browniano y pueden ser movidas relativamente a través de fuerzas de cizallamiento (*shear forces*) [63]. Eventualmente la bacteria se adhiere a la superficie del material, pero algunas veces ocurre la desorción de la superficie. La fracción que es capaz de permanecer adsorbida en la superficie se vuelve

irreversiblemente adherida después de un tiempo crítico de residencia [66]. Cuando domina el proceso de adherencia de forma irreversible, el número de bacterias comienza a incrementar formando microcolonias y macrocolonias. Una producción substancial de EPS promueve la cohesión de la biopelícula, mientras que el *quorum sensing* se vuelve activo [66]. La materia orgánica e inorgánica se adhiere a la biopelícula desarrollada a medida que alcanza un estado maduro. Los segundos colonizadores metabolizarán residuos de los colonizadores primarios y producirán su propio residuo que otras células utilizarán. El *quorum sensing* regula la concentración de células en la biopelícula y regula el fenómeno de desorción, cuando concentraciones celulares críticas son alcanzadas. Posteriormente, partes externas de la biopelícula desorbida regresan al seno del electrolito. Las células desorbidas pueden adherirse a un nuevo sitio o superficie para desarrollar una nueva biopelícula o incorporarse en otra biopelícula ya establecida [67].

### **2.3.1 Adherencia y formación de biopelículas de *Acidithiobacillus sp.***

La adhesión es un prerrequisito para la biooxidación de contacto directo y puede afectar su eficiencia [5]; por este motivo, la adherencia de bacterias biooxidantes de Fe y S en superficies minerales y la corrosión consecutiva del mineral han sido estudiadas por una gran cantidad de investigadores [52,68–70], esto debido a que es un factor clave en la eficiencia de los procesos de biolixiviación. La adherencia y formación de biopelículas de *A. thiooxidans* se ha estudiado en diferentes superficies principalmente en sulfuros minerales como pirita [6–10], calcopirita [6,11,12] y arsenopirita [13,14]; también ha sido estudiada en azufre elemental [6] y otros materiales como cuarzo [6] y vidrio [7].

A pesar de las investigaciones realizadas, el mecanismo de adherencia de la bacteria al mineral aún se encuentra bajo investigación. Inicialmente se postuló que la bacteria no se adhiere a toda la superficie mineral sino que la adhesión sucede

en sitios con imperfecciones/fracturas y que la solubilización del ion metálico es debida a interacciones electroquímicas [68,71]. Murr y Berry (1976) [72] atribuyeron el mecanismo de adherencia a la adhesión electrostática entre la bacteria y la superficie mineral, mientras que Weiss et al. 1973 [52] demostraron que la adherencia entre los cristales de azufre y la bacteria es mediante un pili adhesivo; otros especulan con agentes humectantes que son responsables de promover el contacto entre la bacteria y el azufre [73]. Gehrke et al. [74] y más recientemente Sand y Gehrke (2006;1999) [49,50] demostraron que las EPS juegan una función importante en la adherencia de la bacteria a la superficie del sulfuro mineral; así mismo, mostraron que el tipo de sustrato y condiciones de incubación varían en la adherencia. Trabajos recientes también sugieren que además de la adición de EPS, el *quorum sensing* tipo AI-1 está involucrado en la formación de la biopelícula de bacterias biolixivantes en pirita. Sand y Gehrke (1999) [50] notaron que las EPS producidos por bacterias biolixivantes consisten principalmente de carbohidratos, ácidos urónicos y lípidos. En su estudio reportan que las proteínas no fueron detectadas; también encontraron que las EPS de las células que fueron cultivadas con azufre están compuestas de lípidos, mientras que las células cultivadas con sulfato de hierro (II) o pirita como sustrato, producen una gran cantidad de carbohidratos y ácido glucurónico [49]. En general, los carbohidratos son conocidos por ser cruciales en la formación y propiedades de las biopelículas [51,75]; los polisacáridos y las proteínas son responsables de fortalecer la adhesión a la superficie y soportar el estrés del libre desplazamiento [5,64]. Michel et al. (2009) [51] explicaron que las EPS no sólo están involucradas en la adherencia de la pirita para su biooxidación; es posible que parte de las EPS jueguen un papel en contra de las condiciones estresantes y características del ambiente de biolixiviación (bajo pH, presencia de metales, condiciones en agitación y medio complejo, entre otros).

Zhu et al. 2012 [47] estudiaron la adhesión de *A. ferrooxidans*, *A. thiooxidans* y *Leptospirillum sp.* utilizando microscopía de fuerza atómica (AFM); el estudio demuestra que la carga superficial y la hidrofobicidad de las células influyen en la fuerza de adhesión; además, la fuerza de adhesión disminuye en caso de que las

EPS hayan sido removidas. Diao et al. (2014) [5] mediante AFM, observaron una fuerza de adhesión de 0.144 y 0.091 nN para *A. ferrooxidans* y *A. thiooxidans* respectivamente, a un pH bajo, cerca del punto isoeléctrico ( $\approx$  pH 2) de las células y la calcopirita; sin embargo la fuerza de adhesión disminuyó a medida que se incrementa el pH.

En general la mayoría de la información que existe en la literatura está orientada a sulfuros minerales que actúan tanto como un soporte para la biopelícula como fuente de energía. En este trabajo se propone utilizar grafito como soporte de la biopelícula que a diferencia de los SM no es una fuente de energía.

## 2.4 Sistemas Bioelectroquímicos

La diversidad en la catálisis microbiana a través de sus diversas enzimas que existe en la naturaleza permite una pluralidad de aplicaciones potenciales. Los sistemas bioelectroquímicos (BES, por sus siglas en inglés) son sistemas capaces de convertir la energía química en energía eléctrica y viceversa, mientras se emplean microorganismos como catalizadores. Las aplicaciones de BES comprenden las celdas de combustible microbianas (MFCs), celdas de electrólisis microbianas (MECs) y las MFCs como biosensores [22,76].

Los BES han tenido gran auge desde la década pasada por su contribución como una tecnología sustentable y versátil; estos sistemas pueden contribuir como una tecnología sustentable para producir electricidad y como tratamiento de aguas residuales [18], residuos [19–21], producción de hidrógeno [15] u otros compuestos de valor como acetato, etanol y butirato [16,17]. Los BES dependen de múltiples factores, uno de los cuales es la formación de la biopelícula en la superficie del electrodo [22]. Generalmente se utilizan como electrodos materiales a base de carbono, tales como grafito, carbón activado, carbón vitreo, nanotubos en diferentes presentaciones (placas, barras, cepillos, papel, telas, fieltro, entre otros) por su estabilidad química, conductividad, biocompatibilidad y bajo costo [22,23]. Debido a la gran diversidad del tema, a continuación sólo se presentan los BES relacionados con azufre, específicamente los que trabajan a un pH ácido.

## 2.4.1 Procesos Bioelectroquímicos relacionados con azufre

La remoción de compuestos de azufre ha sido estudiada en BES para el tratamiento de aguas residuales con alta concentración de sulfato, sulfuro y otros compuestos de azufre provenientes de procesos industriales [77]. Se han utilizado bacterias sulfatoreductoras [78–81] para reducir el sulfato ( $\text{SO}_4^{2-}$ ) a sulfuro ( $\text{S}^{2-}$ ), posteriormente el sulfuro producido es electroquímicamente oxidado en el ánodo [78,82,83]. En general, estos estudios de BES operan en condiciones de pH neutro o muy cercano a éste; así mismo, existen estudios sobre la remoción de compuestos de azufre a pHs ácidos utilizando microorganismos sulfurooxidantes, abriendo la posibilidad de tratar aguas de diversos efluentes en condiciones ácidas como el drenaje ácido de roca y de la biolixiviación de minerales. Fernández-Reyes y García-Meza (2017) [1] mostraron la prueba de concepto de un BES que utiliza la biooxidación de calcopirita por un cultivo acidófilo (*A. thiooxidans* y *Leptospirillum* sp.). Además, se ha estudiado el tetrionato ( $\text{S}_4\text{O}_6^{2-}$ ) como fuente de energía en celdas de combustible microbianas (MFC, por sus siglas en inglés); Sulonen et al. [2,3] utilizaron diferentes tipos de efluentes provenientes del proceso de biolixiviación de “pilas o terreros” (*heap bioleaching*) para obtener inóculos, con los que estudiaron la degradación de tetrionato como sustrato vía anaerobia, generando una densidad de potencia de  $26 \text{ mW m}^{-2}$ . Mientras que Ni et al. [4] utilizaron también tetrionato como sustrato y un consorcio aislado de sedimentos provenientes de una mina para alimentar una MFC, la comunidad empleada mostró pertenecer a los géneros *Thermoplasma*, *Ferroplasma*, *Leptospirillum*, *Sulfobacillus* y *Acidithiobacillus*.

Sulonen et al. [84] estudiaron el efecto del potencial anódico en la degradación del tetrionato y producción de electricidad en un BES, demostrando que los potenciales anódicos por debajo de  $0.7 \text{ V}$  (vs.  $\text{Ag}/\text{AgCl}$ ) sólo son eficientes si se tienen microorganismos como biocatalizadores de la degradación del tetrionato. Posteriormente, Sulonen et al. [85] a un BES de dos cámaras, se le aplicó un

potencial de celda en un intervalo de 0.5-1.5 V con la finalidad de degradar tetrionato y simultáneamente recuperar cobre en la cámara catódica, se obtuvo una remoción de tetrionato hasta de 440 mg L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup> y un 99.9% de eficiencia de recuperación de cobre.

Los estudios arriba mencionados representan una prueba de concepto a través de la biooxidación de compuestos inorgánicos de azufre (RISC) bajo condiciones ácidas; sin embargo, estudios relacionados con los fenómenos que suceden en la interfase electrodo/bacteria-biopelícula/solución usando grafito como electrodo y en condiciones ácidas son muy limitados. Carbajosa et al. [24] estudiaron una biopelícula de *A. ferrooxidans* sobre grafito aplicando un potencial de 0.24 V vs NHE sin adición de mediadores redox o un donador de electrones (Fe<sup>2+</sup>), sin embargo la bacteria utilizó el Fe<sup>3+</sup>/Fe<sup>2+</sup> que se encontraba acomplejado en las EPS de las células y se identificó el proceso asociado a la reducción de oxígeno a 0.285 V vs NHE. Mientras que Fernández-Reyes y García-Meza (2017) [1] demostraron que es posible formar biopelículas soportadas en grafito a partir de un cultivo mixto de *A. thiooxidans* y *Leptospirillum* sp. Estos estudios se han limitado a sólo identificar los posibles procesos redox relacionados con la biopelícula en el electrodo, sin proporcionar información cuantitativa de lo que está sucediendo en la interfase electrodo/bacteria-biopelícula/solución. Debido a las posibles aplicaciones de las biopelículas en diversos procesos bioelectroquímicos, es necesario investigar cómo la biopelícula evoluciona en un soporte sólido en condiciones ácidas y, obtener datos cuantitativos sobre cómo cambia la interfase, en ausencia de un potencial aplicado

Por lo cual se propone realizar un estudio con la bacteria acidófila *Acidithiobacillus thiooxidans* y de la biopelícula de forma cuantitativa usando grafito como superficie. En la siguiente sección se resumen las técnicas electroquímicas utilizadas en esta tesis.

## 2.5 Técnicas electroquímicas utilizadas para detección y seguimiento de evolución de biopelícula

Diversas técnicas de caracterización y detección biológica, físico y químico han sido desarrolladas para la detección de la biopelícula, como: la medición óptica de la absorción de luz, la dispersión inducida (*scattering induced*) [86,87], las transformadas de Fourier en el infrarrojo (FTIR) [88,89], la detección de cambios en la transferencia de calor, presión, y metabolitos que resultan de la formación de la biopelícula [90,91] y microscopía de fuerza atómica (AFM) [5]. Adicionalmente, las técnicas que utilizan CLSM (microscopía confocal láser de barrido) son ampliamente aplicadas para observar la estructura dimensional de las biopelículas [92]. Las técnicas electroquímicas tienen ventajas en el seguimiento de la adhesión y la formación de la biopelícula. Son muy sensibles para la detección y la información puede ser rápidamente procesada. En adición, son técnicas ambientalmente amigables y simples de operar debido a que sólo se necesita una cantidad de energía eléctrica mínima para activar el sistema.

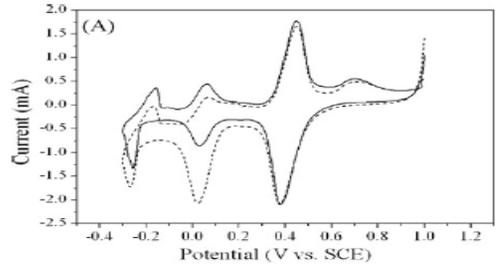
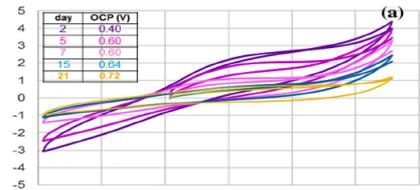
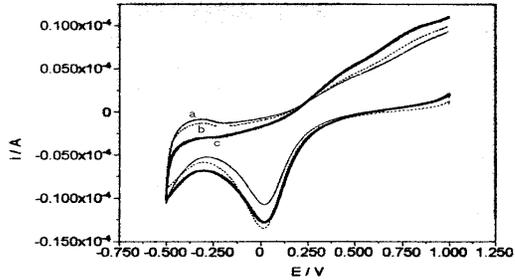
### 2.5.1 Voltamperometría cíclica

La Voltamperometría Cíclica (CV) es una técnica muy estudiada dentro de las herramientas electroquímicas para la detección de sustancias biológicas incluyendo biopelículas [91]. La CV puede ser utilizada para identificar el potencial al cual los pares redox relacionados con la biopelícula son oxidados o reducidos. Debido a que los pares redox sólo pueden ser reducidos u oxidados a ciertos potenciales, la CV puede determinar el intervalo donde la transferencia de carga extracelular puede ocurrir en las biopelículas [93,94]. En la tabla 2.1 se presenta un resumen de los CVs de algunas biopelículas formadas y los pares redox característicos, con estudios que abarcan velocidades de barrido muy diferentes desde  $0.25 \text{ mV s}^{-1}$  hasta  $250 \text{ mV s}^{-1}$ . Existe una gran cantidad de información sobre la adherencia de microorganismos en diversos materiales y la respuesta electroquímica es muy diversa dependiendo del microorganismo, su metabolismo y sus EPS. De esta

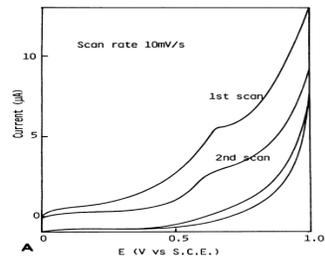
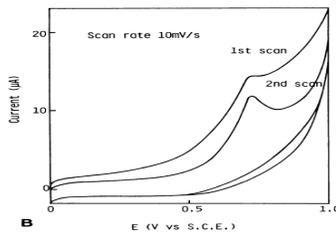
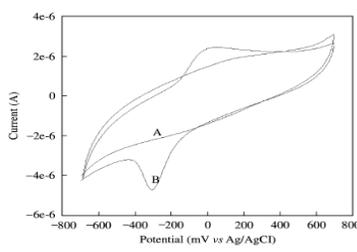
diversidad se concluye que es difícil intentar caracterizar la respuesta característica de un género de bacteria en particular.

Además de dar seguimiento a un par redox inherente a la biopelícula, también se puede utilizar un par redox asociado a la superficie del electrodo tal es el caso del platino, donde la corriente característica de los óxidos de platino disminuye o incrementa dependiendo de la maduración de la biopelícula [91,95,96]

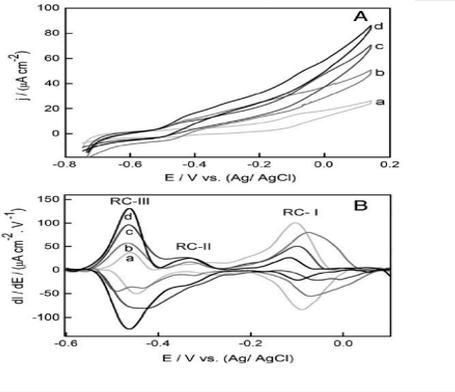
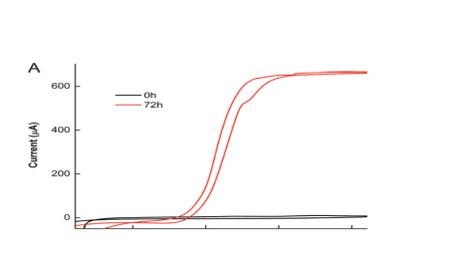
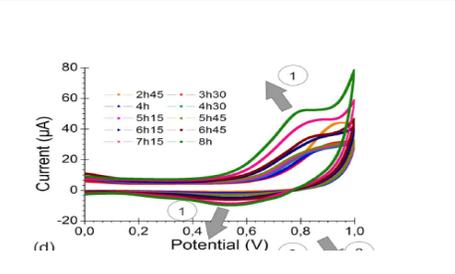
**Tabla 2.1** Diferentes biopelículas soportadas en un electrodo y su respectivo CV.

| Electrodo        | Microorganismo                        | Velocidad de barrido   | Potencial  | Voltamperograma cíclico   | Ref. |
|------------------|---------------------------------------|------------------------|--|---|------|
| Tela de grafito  | <i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i> | 1 mV s <sup>-1</sup>   | Creció a<br>0 V vs SCE sin Fe <sup>2+</sup> añadido<br>0.405 V, 0.045V y -0.210 V vs SCE |    | [24] |
| Barra de grafito | <i>Acidithiobacillus thiooxidans</i>  | 50 mV s <sup>-1</sup>  | 0.8 V vs SHE   |    | [1]  |
| Discos de plata  | <i>Pseudomonas fluorescens</i>        | 0.25mV s <sup>-1</sup> | -0.5V vs Ag/AgCl<br>afectan el pico relacionado con la adsorción del Hidrógeno           |  | [95] |

Continuación Tabla 2.1. Diferentes biopelículas soportadas en un electrodo y su respectivo CV.

| Electrodo          | Microorganismo                   | Velocidad de barrido  | Potencial   | Voltamperograma cíclico   | Ref. |
|--------------------|----------------------------------|-----------------------|---|---|------|
| Grafito pirolítico | <i>Lactobacillus acidophilus</i> | 10 mV s <sup>-1</sup> | 0.68 V vs SCE   |    | [97] |
| Grafito pirolítico | <i>E. coli</i>                   | 10 mV s <sup>-1</sup> | 0.72 V vs SCE   |    | [97] |
| Carbón vitreo      | <i>Clostridium</i> sp. EG3       | 100 mVs <sup>-1</sup> | Picos de reducción y oxidación<br>a<br>-300mV y- 50mV vs Ag/AgCl<br>respectivamente |  | [98] |

Continuación Tabla 2.1. Diferentes biopelículas soportadas en un electrodo y su respectivo CV.

| Electrodo     | Microorganismo                  | Velocidad de barrido  | Potencial  | Voltamperograma cíclico   | Ref.     |
|---------------|---------------------------------|-----------------------|--|---|----------|
| Grafito       | <i>Shewanella loihica PV-4</i>  | 1 mV s <sup>-1</sup>  | Creció a un potencial de 0.2 V vs. Ag/AgCl<br>RC-I=-0.07 V, RC-II=-0.35 V, y RC-III=-0.44 V vs. Ag/AgCl. |    | [99,100] |
| Carbón vitreo | <i>Geobacter sulfurreducens</i> | 1 mVs <sup>-1</sup>   | -0.15 - -0.22V vs SHE  |   | [93,101] |
| Oro           | <i>Staphylococcus epidermis</i> | 100 mVs <sup>-1</sup> | ---  |  | [102]    |

Continuación Tabla 2.1. Diferentes biopelículas soportadas en un electrodo y su respectivo CV.

| Electrodo                  | Microorganismo                     | Velocidad de barrido  | Potencial   | Voltamperograma cíclico | Ref.      |
|----------------------------|------------------------------------|-----------------------|---|-------------------------|-----------|
| Barra de Carbón / hematita | <i>Shewanella oneidensis MR-1</i>  | 1 mV s <sup>-1</sup>  | Creció a 0.2 V vs. Ag/AgCl<br>-0.2 V y 0.1 V vs Ag/AgCl respectivamente |                         | [103,104] |
| Discos de platino          | <i>Pseudomonas aeruginosa PAO1</i> | 250 mVs <sup>-1</sup> | Disminuyó el pico de reducción de óxido de platino<br>0.0 V vs Ag/AgCl  |                         | [91]      |

En los estudios de CV se asume que las biopelículas que crecen en la superficie del electrodo están en condiciones idóneas para su desarrollo; caracterizar la biopelícula únicamente utilizando esta técnica ha sido difícil [94] pues cambia la interfase con el barrido de potencial; además, a medida que la velocidad de barrido incrementa, la corriente capacitiva se incrementa considerablemente enmascarando las corrientes farádicas; particularmente cuando están asociadas a reacciones lentas como es el caso de la cinética enzimática (*continuous enzymatic turnover*) [101], en la cual está involucrada la transferencia electrónica entre grupos rédox de las proteínas y el electrodo.

Mientras que estudios previos se han enfocado principalmente en la simple detección de cambios en las señales predominantemente por el desarrollo de biopelículas, un enfoque electroquímico más avanzado es necesario para detectar cada etapa del desarrollo de la biopelícula. Es por este motivo que, en este estudio, se utilizará la Espectroscopía de Impedancia Electroquímica (EIS) que presenta la ventaja de poder separar las contribuciones de diferentes procesos que ocurren de forma simultánea.

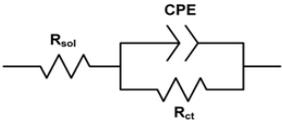
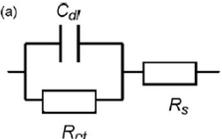
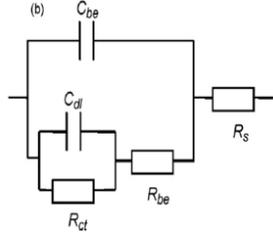
### **2.5.2 Espectroscopía de Impedancia Electroquímica (EIS)**

EIS es una técnica prometedora para el estudio de cambios interfaciales; cualquier propiedad eléctrica de las bacterias adheridas a la superficie del electrodo afecta la conductividad en la superficie de los electrodos [105]. En los últimos años esta técnica se ha utilizado para caracterizar el desarrollo de biopelículas [12,100,106–111]. Las aplicaciones de EIS son numerosas en la corrosión influenciada por microorganismos, en donde la muestra es estudiada a potencial de circuito abierto [112,113], también se ha utilizado para caracterizar biopelículas de bacterias patógenas como *E. coli* [110], *Staphylococcus epidermis* [105], *Pseudomonas aeruginosa* [109] mientras que relacionado con los BES se ha estudiado el desarrollo de biopelículas de bacterias como *Geobacter sulfurreducens* [106,107,114] y *Shewanella loihica* [100] soportadas carbón vítreo, papel grafito, nanotubos de carbono y en FTO (flúor dopado con óxido de estaño).

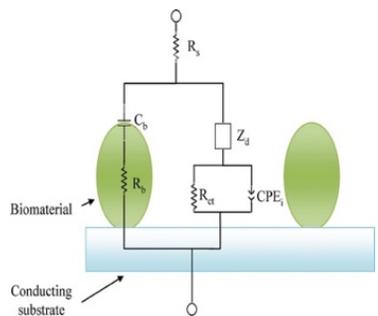
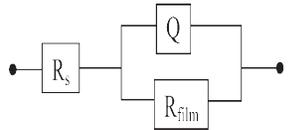
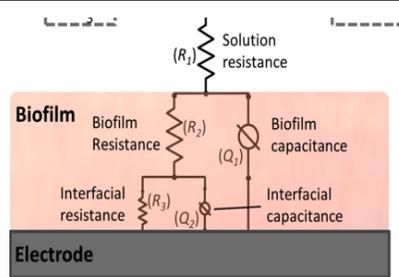
La interpretación de los diagramas generalmente se lleva a cabo a través de circuitos eléctricos equivalentes (eec) que son asociados con propiedades de la interfase electrodo-biopelícula. Los parámetros eléctricos que se obtienen a partir del circuito equivalente propuesto, como por ejemplo resistencias, capacitores y elementos de fase constante (CPE) se les atribuye un significado físico relacionado con: cambios en las EPS de la biopelícula, con fenómenos de transferencia de carga debido a la bacteria o de algún compuesto metabólico producido, el incremento o desprendimiento de células adheridas, difusión de nutrientes entre otros.

A continuación se presenta una revisión de la literatura (Tabla 2.2) referente a estudios sobre la adherencia de bacterias y desarrollo de biopelículas soportadas en un sistema de tres electrodos; donde se han propuesto modelos de circuito equivalente en diferentes superficies y se proponen la asociación física para cada elemento eléctrico que conforma el circuito equivalente.

**Tabla 2.2** Propuestas de circuito equivalente como análisis de la EIS para la observación/seguimiento de adherencia y desarrollo de biopelículas con diferentes bacterias.

| Bacteria  | Circuito equivalente propuesto   | Ref.  |
|---|--|-------|
| <p><b>Superficie/electrodo:</b> platino</p> <p><i>Pseudomonas aeruginosa</i><br/>PA14 y wspF mutante</p>  | <p><math>R_{sol}</math> = Resistencia a la solución<br/> <math>R_{ct}</math> = Resistencia a la transferencia de carga<br/> <math>Cdl</math> = Capacitancia de la doble capa</p>    | [109] |
| <p><b>Superficie/electrodo:</b> óxido de Indio y Estaño (ITO)</p> <p><i>Pseudomonas stutzeri</i> (PS)/<br/><i>Staphylococcus epidermis</i> (SE)</p> | <p><math>R_s</math> = Resistencia ohmica del electrolito,<br/> <math>Cdl</math> = Capacitancia de la doble capa<br/> <math>R_{CT}</math> = Resistencia a la transferencia de carga</p> <p>Antes de la adhesión</p> <p>(a) </p> <p>Después de la adhesión:</p> <p>(b) </p> <p><math>R_{be}</math> = Resistencia a la transferencia de carga de la bacteria<br/> <math>C_{be}</math> = representa el intercambio de cargas entre las dos superficies.</p> | [105] |

**Continuación Tabla 2.2.** Propuestas de circuito equivalente como análisis de la EIS para la observación/seguimiento de adherencia y desarrollo de biopelículas con diferentes bacterias.

| Bacteria  | Circuito equivalente propuesto  | Ref.  |
|---|---|---|
| <i>E. coli</i>  | <p><b>Superficie/electrodo:</b> ITO (óxido de Indio y estaño )</p> <p><math>R_s</math> = Resistencia de la solución,<br/> <math>C_b</math> = Capacitancia del biomaterial<br/> <math>R_b</math> = Resistencia del biomaterial<br/> <math>R_{CT}</math>= Resistencia a la transferencia de carga,<br/> <math>CPE_i</math>= Elemento de fase constante de la solución en la interfase del electrodo<br/> <math>Z_d</math> = difusión linear anómala debido a interacciones químicas entre las partículas y los iones en el electrolito y el material.</p> |  <p>[110]</p>          |
| <i>Geobacter sulfurreducens</i>                           | <p><b>Superficie/electrodo:</b> papel grafito</p> <p><math>R_s</math>= Resistencia de la solución (<math>R_s</math>)<br/> <math>Q</math>= Elemento de fase constante (CPE)<br/> <math>R_{film}</math>=Resistencia de la transferencia de carga</p>  |  <p>[115]</p>          |
| <i>Geobacter sulfurreducens</i> y mutante deficiente PilR | <p><b>Superficie/electrodo:</b> carbón vítreo, FTO (óxido de flúor y estaño)</p> <p><math>Q_1</math> = Elemento de fase constante que representan la capacitancia de la biopelícula.<br/> <math>Q_2</math>=Elemento de fase constante que representan la capacitancia de la doble capa<br/> <math>R_1</math>= Resistencia de la solución<br/> <math>R_2</math>=resistencia a través de la biopelícula<br/> <math>R_3</math>=Resistencia a la transferencia de carga en la interfase biopelícula/electrodo.</p>  |  <p>[106,107,114]</p> |
| <i>Shewanella loihica</i>                                 | <p><b>Superficie/electrodo:</b> nanotubos de carbón</p> <p><math>R_1</math> =Resistencia del electrolito<br/> <math>R_2</math> =Resistencia a la transferencia de carga de las flavinas producidas por la bacteria,<br/> <math>R_3</math> =Oxidación de la fuente de energía (lactato).</p>   | <p><math>R_1 + R_2/C_2 + R_3/C_3</math></p> <p>[100]</p>  |

Uno de los aspectos importantes de utilizar EIS como técnica para evaluar el seguimiento de la biopelícula, es que no es necesario tener un par redox en la interfase; se puede dar seguimiento a la evolución de la biopelícula con un parámetro eléctrico definido como la capacitancia de biopelícula. En la tabla 2.2 se muestra que la mayoría de los circuitos propuestos contemplan dos constantes de tiempo (RC); mientras que cuando hay una constante de tiempo, en el cambio de la capacitancia de la doble capa, está incluido el cambio de la capacitancia de la biopelícula [109]. La mayoría de estos estudios se les ha aplicado un potencial al electrodo, esto puede modificar la forma en como se desarrolla la biopelícula. Estudios relacionados con la formación de la biopelícula sin polarización, son muy limitados. Hasta ahora sólo se ha estudiado a *Geobacter sulfurreducens* y *Pseudomonas aeruginosa* sin aplicación de potencial [109,114].

Cabe señalar que existe mayor cantidad de estudios de EIS enfocados en celdas de dos electrodos (MFCs) utilizando electrodos a base de carbono que miden la resistencia total de la celda; así como otros casos, donde únicamente se presentan los diagramas de EIS sin proponer un circuito equivalente, no obstante, en este trabajo esta información queda fuera de este estudio. Esto debido a que el sistema de tres electrodos está diseñado para que la repuesta electroquímica esté asociada sólo el electrodo de trabajo (WE); siendo esta área muy pequeña, mientras que el área del contraelectrodo (CE) es en comparación más grande (al menos 10 veces mayor ) [116].

La EIS también se ha utilizado para caracterizar los cambios interfaciales en SM como la calcopirita, bornita ( $\text{Cu}_5\text{FeS}_4$ ) y arsenopirita ( $\text{FeAsS}$ ) debido a la formación de biopelículas de *A. ferrooxidans* o *A. thiooxidans* en la superficie que fomentan la oxidación del sulfuro mineral [12,13,108,117]; sin embargo, la interfase sulfuro mineral/bacteria-biopelícula/solución presenta cambios debido a:

1. La oxidación abiótica del sulfuro mineral
2. La biooxidación del mineral originada por las bacterias

3. La adherencia de las células del mineral y la formación/evolución de la biopelícula.

Todos estos procesos suceden de forma simultánea en la superficie del mineral; aunque hay esfuerzos para lograr una mayor comprensión y se han realizado estudios de EIS aún no es claro del todo; separar y explicar la contribución de cada aspecto es complejo aunque se realicen los controles correspondientes. Por lo que el estudio de interfase electrodo/bacteria-biopelícula/solución usando grafito como electrodo tiene la finalidad de aportar información cuantitativa de los cambios interfaciales que podrían ser asociados a la operación de los BES, en condiciones ácidas y, por otro lado, contribuir al estudio de los procesos de biolixiviación y de adherencia a los SM en un sistema menos complejo, al tener una superficie menos reactiva como el grafito.

## Justificación

La mayoría de la información relacionada con biopelículas de *Acidithiobacillus thiooxidans* se encuentra enfocada en superficies de sulfuros minerales; en donde al tener una superficie reactiva que actúa tanto como soporte, como una fuente de energía, haciendo difícil la comprensión de las contribuciones de los fenómenos que suceden simultáneamente en la interfase. De esta manera, para estudiar los procesos iniciales de formación de biopelículas de *A. thiooxidans* es necesario utilizar una superficie menos reactiva como soporte de ésta, por ejemplo materiales de carbono.

Los estudios interfaciales electroquímicos de biopelículas con microorganismos quimiolitotróficos y acidófilos que utilizan diversos compuestos de azufre soportados en grafito se han limitado sólo a identificar los posibles procesos redox relacionados con la biopelícula en el electrodo, sin proporcionar información cuantitativa de lo que está sucediendo en la interfase electrodo/bacteria-biopelícula/solución. Debido a las posibles aplicaciones de las biopelículas en diversos procesos bioelectroquímicos y de biolixiviación, es necesario investigar cómo la biopelícula evoluciona en grafito en condiciones ácidas y obtener datos cuantitativos sobre cómo cambia la interfase en ausencia de un potencial aplicado.

## Hipótesis

Es posible el desarrollo de una biopelícula de *Acidithiobacillus thiooxidans* soportada en un electrodo de grafito usando como fuente de energía compuestos de azufre y correlacionar sus cambios/evolución con su respuesta electroquímica.

## Objetivo general

Evaluar mediante técnicas electroquímicas el desarrollo de una biopelícula de *Acidithiobacillus thiooxidans* soportada en un electrodo de grafito

## Objetivos específicos

- Establecer las condiciones experimentales para formar una biopelícula de *Acidithiobacillus thiooxidans* en el colector de corriente.
- Obtener la respuesta bioelectroquímica inherente al desarrollo y evolución de la biopelícula de *A. thiooxidans*.
- Caracterizar la biopelícula mediante técnicas microscópicas para contrastar la información obtenida de las técnicas electroquímicas.

## Capítulo 3 . Metodología

*“Los experimentos son el único medio de conocimiento a nuestra disposición. El resto es  
poesía, imaginación ”  
Max Planck*

### 3.1. Medio de Cultivo

El medio de cultivo utilizado tiene la siguiente composición:

**Tabla 3.1** Composición química del medio de cultivo utilizado.

| Compuesto                            | Concentración (g/L) |
|--------------------------------------|---------------------|
| NH <sub>4</sub> Cl                   | 0.2                 |
| MgCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O | 0.5                 |
| CaCl <sub>2</sub>                    | 0.25                |
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>      | 3.0                 |
| FeS                                  | 0.0005              |
| S <sup>0</sup>                       | 10                  |

Para su preparación se diluyeron todos los compuestos en un matraz aforado de 1 L (en el orden que aparecen en la Tabla 3.1) con excepción del azufre elemental. El medio de cultivo se esterilizó en autoclave a 121°C durante 20 min en frascos Wheaton, después el pH del medio se ajustó a 1.9 con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrado. El S<sup>0</sup> se esterilizó de forma separada con luz UV por dos horas en una campana de flujo laminar y se añadió al medio hasta el momento en el que se inicia el experimento/cultivo. El ajuste de pH del medio de cultivo y la esterilización del S<sup>0</sup> se llevó a cabo en una campana de flujo laminar.

### 3.2. Mantenimiento de cultivos

Para obtener el inóculo, se tomaron de 15 a 20 mL de un cultivo de *Acidithiobacillus thiooxidans* ATCC 19377 obtenido de otro cultivo previo que se encuentre en fase exponencial (15 días) y se centrifugó a 8000 rpm durante 40 min a 28 °C. Posteriormente, se decantó el sobrenadante (aprox. 10 mL) y el pellet formado se disolvió en los 5 mL restantes; este inóculo en fase exponencial se añadió a un matraz Erlenmeyer de 250 mL con 100 mL del medio previamente esterilizado y ajustado a pH de 1.9 (sección 3.1). La concentración inicial fue de 10<sup>6</sup> células/mL,

esta concentración se obtuvo realizando conteos directos en cámara de Neubauer utilizando un microscopio óptico Leica Gallen III 317505 . Después, se adicionó el S<sup>0</sup> previamente esterilizado. Todo este procedimiento se lleva a cabo en una campana de flujo laminar. Finalmente, se colocó el matraz en un agitador orbital y se incubó a 115 rpm a temperatura entre 28 y 30 °C.

### **3.3 Incremento de células en suspensión**

Se realizó la cinética de crecimiento de la población de *A. thiooxidans* únicamente contabilizando las células en suspensión; esto debido a la dificultad que se tiene de obtener la concentración celular en el sólido (azufre).

#### **Condiciones experimentales:**

Se inocularon matraces Erlenmeyer con una biomasa inicial de 10<sup>6</sup> células/mL utilizando 100 mL del medio de cultivo mencionado en la sección 3.1. Para la obtención de la curva de crecimiento, se extrajeron muestras de 200 µL y se realizaron conteos directos en cámara de Neubauer durante 13 días, utilizando un microscopio óptico Leica Gallen III 317505.

### **3.4. Lavado de electrodos de trabajo**

Barras de grafito comercial (95% de pureza) de 0.5 cm ancho x 15 cm de largo., fueron cortadas con un disco de diamante a baja velocidad. Posteriormente, fueron lavados con una solución de 37 mM HCl durante 2 horas; después, fueron inmersos en acetona pura durante 10 min; posteriormente fueron sumergidos durante toda la noche en agua desionizada y esterilizados en autoclave antes de usarse. El área del electrodo del trabajo es de 0.25 cm<sup>2</sup> (0.5 cm x 0.5 cm) misma que fue delimitada utilizando cinta teflón. Experimentos previos demostraron que la cinta teflón aísla el material.

### 3.5. Sistema de tres electrodos (celda electroquímica)

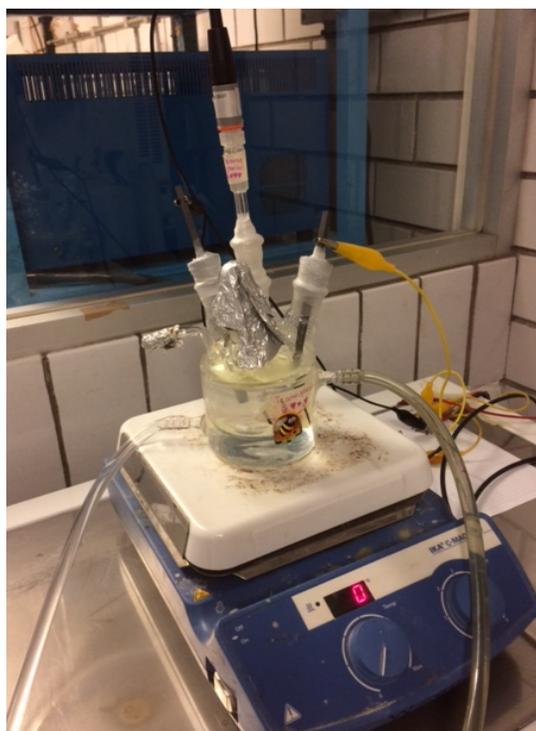
Esta celda se utilizó para todos los experimentos electroquímicos. Consiste en una celda de vidrio enchaquetada de tres electrodos, que tiene un filtro estéril de algodón para permitir el flujo del aire para mantener condiciones aerobias. El contra electrodo fue una barra de grafito (Alfa Aesar 99.9995 % pureza) previamente pulida con una lija de 1200 y lavado con agua desionizada. Como electrodo de referencia se utilizó un electrodo de Calomel (0.241 V vs. NHE) con una solución saturada de KCl previamente esterilizada en autoclave, el electrodo se mantuvo en luz UV durante 1.5 h, posteriormente le fue colocado un capilar de Luggin con solución saturada de KCl. El electrodo de trabajo varía, puede ser un bioelectrodo/control (área geométrica de 0.25 cm<sup>2</sup>, sección 3.4) según el experimento correspondiente. Todos los potenciales reportados en este trabajo se transformaron al electrodo normal de hidrógeno (NHE). Se utilizaron 100 mL del medio de cultivo mencionado en 3.1 como electrolito soporte. La celda, el contraelectrodo, el capilar de Luggin, y el medio de cultivo fueron esterilizados por separado en autoclave a 121°C por 20 minutos antes de utilizarse. Todo el sistema electroquímico se ensambló en una campana de flujo laminar. La temperatura de operación durante las pruebas electroquímicas se mantuvo en un intervalo de 28 a 30 °C mediante un baño recirculatorio.

### 3.6 Medición del potencial de circuito abierto (OCP)

Antes de iniciar cualquier experimento electroquímico, se midió el potencial de circuito abierto por un tiempo mínimo de 40 minutos para pruebas abióticas; mientras que para pruebas con *A. thiooxidans* el tiempo mínimo fue de 2.5 horas. Una vez que se obtuvo un valor constante se llevaba a cabo la técnica electroquímica de interés. Para realizar cada medición de EIS fue necesario tener un OCP muy estable con una variación de  $\pm 5$  mV entre cada medición por al menos 1 hora, de lo contrario, el espectro no tenía la calidad requerida para su posterior análisis.

### 3.6 Caracterización electroquímica de la interfase del bioelectrodo *in situ*

En una celda electroquímica descrita en la sección 3.5, se inoculó con una concentración inicial de  $10^7$  células/mL y el medio de cultivo incluyó  $S^0$  elemental. Se utilizó como electrodo de trabajo un electrodo de grafito previamente lavado y esterilizado (Figura 3.1) . Se monitoreó su potencial de circuito abierto (OCP) y se realizaron espectros de impedancia (EIS) durante 7 días en continuo (*in situ*) sin agitación y también con una agitación de 100 rpm; la agitación fue de tipo magnética. El control abiótico se utilizó una celda con las mismas condiciones sin adición de inóculo. Los espectros de impedancia electroquímica se obtuvieron a partir del OCP con una amplitud sinusoidal de  $\pm 10$  mV y un intervalo de frecuencias de  $10 \times 10^3$  hasta  $1 \times 10^{-3}$  Hz y 6 puntos por década. Para el análisis de los espectros ver el procedimiento en la sección 3.7.



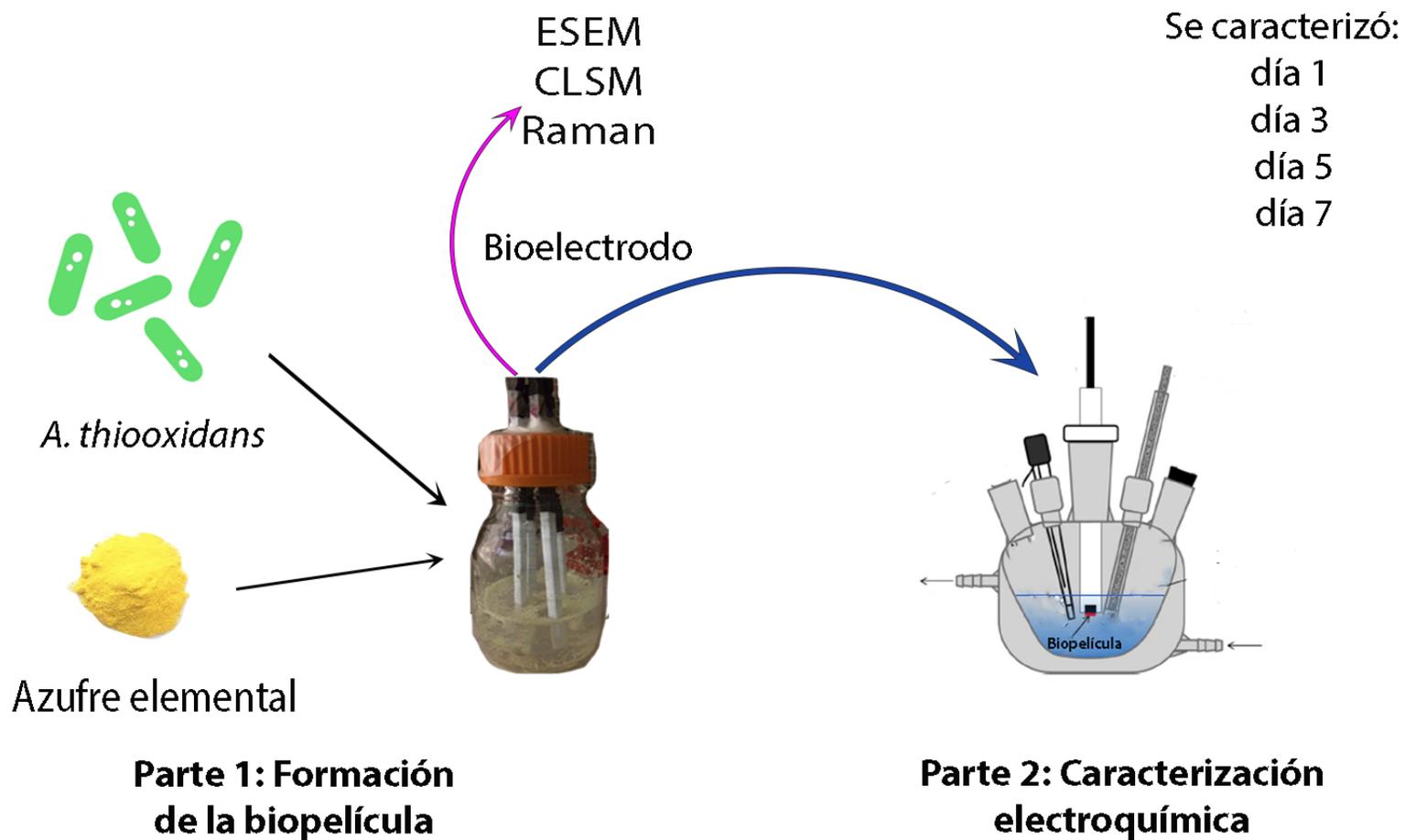
**Figura 3.1** Celda electroquímica utilizada para caracterización de la interfase del bioelectrodo *in situ*.

Adicionalmente, al finalizar el día 7, se realizó una Voltamperometría Cíclica (CV) para analizar las propiedades oxidativas-reductoras de la biopelícula, sin y con agitación (100 rpm); comenzando el barrido en dirección positiva a partir del potencial de circuito abierto, con una velocidad de barrido pequeña de  $1 \text{ mV s}^{-1}$  para no dañar las células/biopelícula. Esto debido a que existen estudios que han utilizado altas velocidades de barrido ( $250\text{-}500 \text{ mV s}^{-1}$ ) donde se afirma que puede ocurrir una desorción parcial de las células/biopelícula o disminuir el número de células viables [96,118].

### **3.7. Caracterización electroquímica de la interfase del bioelectrodo *ex situ***

#### **3.7.1 Condiciones experimentales parte 1: Adherencia y formación de una biopelícula de *A. thiooxidans* soportada en electrodos de grafito (bioelectrodos)**

Cuatro electrodos de grafito (sección 3.4) fueron insertados en una tapa de polipropileno de un frasco Wheaton de 250 mL. El frasco con los electrodos fue esterilizado en autoclave a  $121 \text{ }^{\circ}\text{C}$  por 20 minutos; después, 100 mL del medio de cultivo previamente esterilizado y 5 mL de inóculo con  $10^7$  células/mL fueron añadidas al frasco, finalmente se agregó 1 gramo de  $\text{S}^0$  esterilizado. Un electrodo de grafito inmerso en un medio abiótico (sin inóculo) se utilizó como control. La velocidad de agitación y la temperatura se mantuvo a 100 rpm y  $28 \pm 2 \text{ }^{\circ}\text{C}$  respectivamente, (dentro de una incubadora con agitación mecánica) ver Figura 3.2. Durante el tiempo de incubación y desarrollo de la biopelícula, no se aplicó ninguna perturbación eléctrica (potencial o corriente), y el grafito únicamente fue utilizado como soporte de la biopelícula. Se tomaron bioelectrodos los días 1, 3, 5 y 7 para su caracterización electroquímica en la celda de tres electrodos (sección 3.3). Con la finalidad de evitar cambios en la estructura de la biopelícula y en las EPS, otro “juego de electrodos” obtenidos bajo las mismas condiciones, fue utilizado para la caracterización microscópica en cada día de los ensayos.



**Figura 3.2** Diagrama general del procedimiento de la caracterización de la interfase ex situ (medio de cultivo fresco).

### 3.7.2 Condiciones experimentales parte 2: Caracterización electroquímica de la interfase de bioelectrodos *ex situ*

Se realizó un espectro de impedancia a los bioelectrodos extraídos del frasco durante los días 1, 3, 5 y 7 y fueron colocados en una celda como la descrita en 3.5 con medio de cultivo fresco sin  $S^0$  (ver Figura 3.2). con el fin de obtener los espectros de impedancia electroquímica y Voltamperometría Cíclica, en los días correspondientes.

Para los espectros de EIS se utilizó un potenciostato (VMP3, Bio-Logic Science Instruments); antes de aplicar esta técnica, se midió el potencial de circuito abierto (OCP), el experimento se llevó a cabo hasta que el OCP fuera constante; como control abiótico se utilizó un electrodo de grafito previamente lavado y esterilizado. Los espectros de EIS se obtuvieron a partir del OCP con una amplitud sinusoidal de  $\pm 10$  mV y un intervalo de frecuencias de  $10 \times 10^3$  hasta  $1 \times 10^{-3}$  Hz y 6 puntos por década. El ajuste del circuito equivalente propuesto fue realizado con el software Zview 3.5 c (Scribner Associates Inc., Southern Pines, NC).

Para los elementos de fase constante (CPE) que están propuestos en el circuito equivalente se calculó la capacitancia mediante la siguiente ecuación [112,119,120]:

$$C = (Y_0 R)^{1/n} / R \quad (3.1)$$

Donde  $Y_0$  es la base de la admitancia del elemento de fase constante,  $R$  representa la resistencia y  $n$  es el factor que está en el intervalo de  $0 < n < 1$ .

Las transformadas de Kramers-Kronig se obtuvieron a partir de los espectros experimentales, utilizando con el *software* Lin-KK tool [121–123].

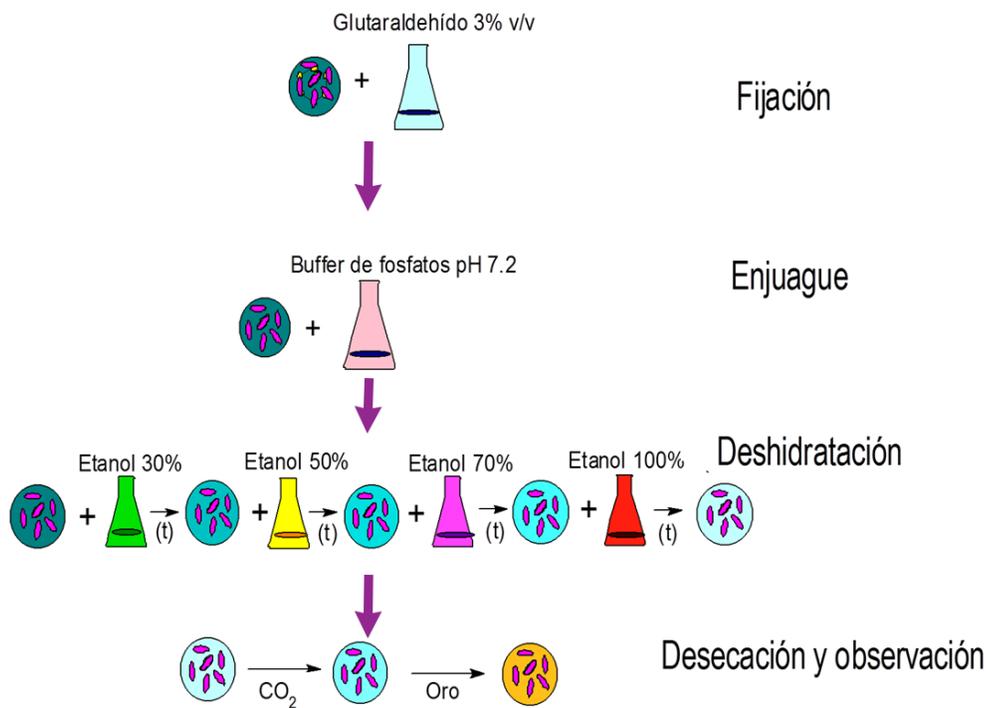
Al final de cada medición de EIS, se realizó una Voltamperometría Cíclica (CV) en la misma celda para analizar las propiedades oxidativas-reductoras de la biopelícula, sin y con agitación (100 rpm); iniciando el barrido en dirección positiva a partir del potencial de circuito abierto, con una velocidad de barrido de  $1 \text{ mV s}^{-1}$ . Con el

objetivo de evitar el daño a la biopelícula, después de realizar las respectivas pruebas (EIS y CV), el bioelectrodo se discontinuaba y no se regresaba al frasco. Como resultado de esto, cada bioelectrodo es un experimento independiente que sólo corresponde a un día en específico. Los experimentos se realizaron por triplicado.

## 3.8. Análisis microscópico de los bioelectrodos

### 3.8.1. Preparación de muestras para ESEM

Con el objetivo de observar las células/biopelículas adheridas a la superficie del grafito mediante ESEM, los bioelectrodos fueron preparados mediante la siguiente metodología. La preparación de las muestras biológicas incluye varias etapas (Figura 3.3) con la finalidad de no dañar las células.



**Figura 3.3** Esquema representativo de la preparación de las muestras para su observación por ESEM [124].

**Fijación**, tiene como objetivo endurecer el contenido intracelular para que soporte el estrés físico de los pasos posteriores; los fijadores actúan cesando la actividad enzimática y el tejido celular. Esto se logra por varios métodos, tanto físicos como químicos, en el caso de los químicos generalmente se utiliza glutaraldehído, formaldehído, tetraóxido de osmio, entre otros. En este trabajo se utilizó el glutaraldehído al 3% preparado en una solución de PBS ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  y  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , pH 7).

**Enjuague o lavado**, se utilizan soluciones *buffer* con la finalidad de mantener la tonicidad y osmolaridad de las células y evitar que éstas estallen o colapsen; por lo que la solución *buffer* debe tener el mismo potencial osmótico y pH que el citoplasma dentro de la célula (pH 7.2-7.4), y entre las más utilizadas se encuentran las de fosfatos, por su bajo costo y baja toxicidad.

**La deshidratación** tiene como objetivo eliminar el agua de la muestra, sustituyéndola por etanol, el cual es posteriormente intercambiado por  $\text{CO}_2$  líquido, durante el proceso de desecación. Dado que el agua es poco miscible con el  $\text{CO}_2$ , es que se utiliza etanol como líquido de transición; sin embargo, este proceso debe llevarse a cabo de manera gradual, para evitar la deshidratación drástica de las células, por lo que se utilizaron diluciones de etanol al 30%, 50%, 70% y 100% (durante un tiempo de 10 min en cada concentración de alcohol). Aunque los tiempos en los que se dejan las muestras sumergidas en etanol tienden a ser variables, y por lo regular son de tiempos cortos y generalmente dependen del grosor de la muestra.

**La desecación**, generalmente se realiza por punto crítico ya que, a ciertas características de temperatura y presión, un fluido iguala su densidad en fase líquida a la de vapor, haciéndose una sola fase (punto crítico), y en esta condición es posible llevar todo el líquido a la fase vapor sin que exista tensión en la superficie de la muestra. Comúnmente se utiliza  $\text{CO}_2$  en estado líquido, lográndose el punto crítico con relativa facilidad (31°C, 1072 psi). Finalmente, para hacer conductora la

muestra se aplica una capa muy delgada de un metal de elevado número atómico, lo cual se realiza por *sputtering*. Se forma una nube de iones de Ar y átomos de metal descargados desde una laminilla o *target* del metal a usar como conductor, y los cuales caen suavemente sobre la muestra. El metal preferentemente es Au, pues le imparte mayor conductividad a la muestra, emitiendo una señal más intensa para formar la imagen topográfica. Además, durante la observación se tuvieron en cuenta varios factores, tales como la distancia de trabajo (10 mm), el tamaño de apertura de los lentes electrónicos finales y el tamaño del diámetro del haz de electrones que fue de 5.5 y, el factor más importante, mantener un voltaje de aceleración entre 18 y 20 kV.

Además, se obtuvieron imágenes únicamente de la superficie del grafito y su composición elemental mediante SEM-EDAX con un voltaje de aceleración de 15 kV. El análisis EDAX fue realizado con una ampliación 10K.

### **3.8.2. Preparación de muestras para Microscopía Confocal Laser de Barrido (CLSM)**

Con el objetivo de observar en el CLSM las células/biopelículas adheridas y el tipo de sustancias poliméricas extracelulares en la superficie del grafito, los bioelectrodos fueron preparados mediante la siguiente metodología.

Se usaron tres fluorocromos: la lectina de *Canavalia ensiformis* (Con-A) para compuestos hidrofílicos, principalmente residuos o carbohidratos extracelulares de  $\alpha$ -manosa y  $\alpha$ -glucosa; rojo Nilo para compuestos hidrofóbicos ricos en lípidos y Naranja de acridina para detección de ADN.

Se prepararon las siguientes disoluciones en oscuridad:

- HEPES (ácido libre, ácido 4-(-2 hidroxietil) piperazina-1-1 etanosulfónico,  $C_8H_{18}N_2O_4S$ ; Sigma Aldrich), se toma ~0.2383 g cantidad que se afora a 100

mL con agua destilada, después de ajustar a pH de 7.2 con una solución de NaOH diluido. Se mantiene en refrigeración (4° C) hasta su uso.

- Con-A: se pesan 0.120 g del reactivo Con-A (Lectina de *Canavalia Ensiformis*, Sigma-Aldrich) que se disuelve en 25 mL de 1 M NaCl, con el fin de favorecer la solubilidad del reactivo; mientras que para preparar el Rojo Nilo (Sigma-Aldrich) se utilizan 0.0125 g disuelto en 25 mL de etanol concentrado grado reactivo.
- Naranja de Acridina, NA (Sigma-Aldrich), se pesan 0.005 g y se afora con 25 mL de solución de PBS.

Después de preparar las soluciones se mantuvieron en oscuridad y refrigeración (4 °C).

### *Tinción*

Todo el procedimiento se realiza en oscuridad y las muestras se cubren con papel aluminio durante el tiempo de reacción. Se realiza de la siguiente manera: (i) se fijan las células con una solución de formaldehído al 3.5% con PBS y se mantiene en refrigeración a 4 °C hasta que se lleve a cabo la tinción. (ii) se lava con HEPES para remover el resto de formaldehído, (iii) posteriormente se hace la tinción con Con-A agregando unas gotas y cubriendo la superficie de las muestras con papel aluminio, y las preparaciones son colocadas en la oscuridad por 1:15 h para que suceda la reacción del fluorocromo con los exopolisacáridos, (iv) nuevamente la preparación se enjuaga con HEPES para retirar el resto del fluorocromo, (v) se cubre la superficie de los electrodos con Rojo Nilo y se mantienen en oscuridad por 15 min, (vi), se realizó el lavado con HEPES para retirar el exceso de fluorocromo. Si se requiere identificar el ADN: (vii) se agrega Naranja de Acridina (NA) a la superficie de los electrodos y se deja interactuar por 5 min, posteriormente se lava con HEPES para retirar el exceso de fluorocromo (viii) se mantiene en oscuridad y refrigeración hasta su análisis por CLSM.

Por CLSM, se evalúa la intensidad de fluorescencia del Rojo Nilo, ConA y NA para lo cual, primero se obtienen las longitudes de onda fluorescentes asociadas a las especies de  $S^0$ , Rojo Nilo, Con-A y NA; utilizando diferente láser para obtener las correspondientes regiones de interés (ROI). Se utilizó un microscopio Confocal-Multifotónico LSM 710 NLO para la adquisición de imágenes 2D y 3D (Este instrumento está localizado en el Centro de Nanociencias y Micro y Nanotecnologías del IPN). Para las imágenes 3D se utilizaron los objetivos 20X y 40X (oil) plan-apochromat. Las longitudes de onda excitación y emisión fueron: 561 nm y de 563 a 588 nm para Con-A; para Rojo Nilo de 488 nm y de 600 a 753 nm; para NA 405 nm y de 465 a 524 nm respectivamente. Algunas muestras de grafito con azufre elemental (en el mismo frasco de suspensión) fueron analizadas sólo con la fijación de formaldehído al 3.5%, sin llevarse a cabo ninguna tinción, con la finalidad de monitorear la autofluorescencia del  $S^0$  en las longitudes de onda de excitación/emisión seleccionadas.

### 3.8.3. Espectroscopía Raman

La Espectroscopía de Raman se utilizó para observar y analizar posibles partículas de azufre que quedaran adsorbidas en la superficie del grafito. Los pasos son descritos a continuación:

Cubos de grafito se tomaron a diferentes tiempos de incubación de un cultivo y se colocaron en frascos de vidrio de 10 mL con tapas con sello hermético, donde se les inyectó  $N_2$  para remover el oxígeno y evitar la biooxidación de azufre. Para su envío a analizar, los frascos se incluyeron en un frasco de vidrio de 1 litro con sobre para anaerobiosis.

Los espectros de Raman fueron obtenidos utilizando un espectrofotómetro (T64000 Jobin Yvon) acoplado a un confocal-imaging module (Olympus BH2-UMA. Este equipo está localizado en el Laboratorio de Química de Superficies, Instituto de Metalurgia, UASLP. Se utilizó un láser de una longitud de ( $\lambda$  of 532 nm) . El intervalo vibracional fue de 0-700 $cm^{-1}$ . Los Picos de Raman fueron identificados usando la base de datos RRUFF [125] y otras fuentes [41,126–129].

## **Capítulo 4 . Establecimiento de condiciones de operación**

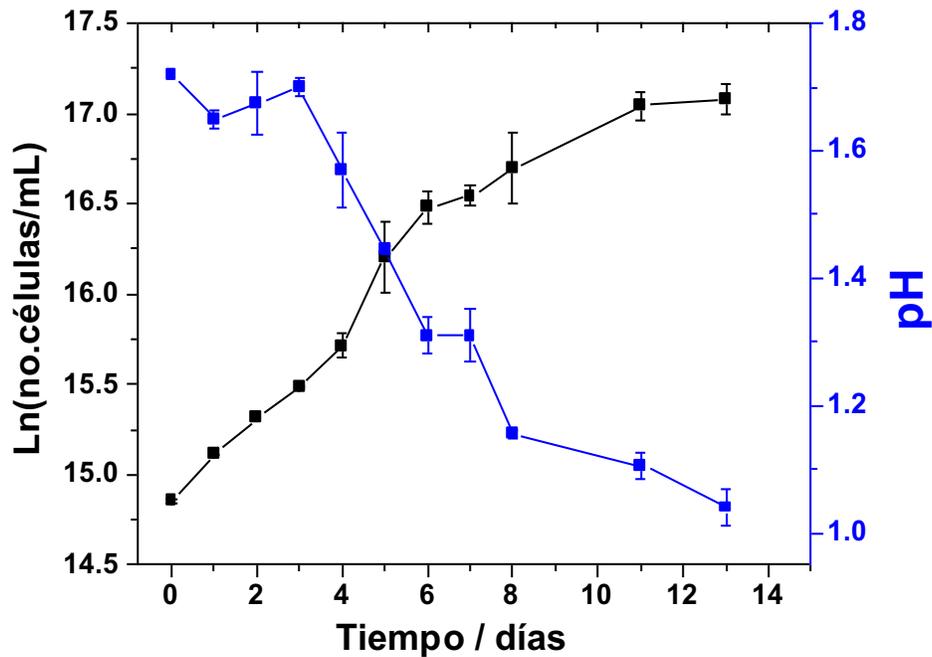
*“Si quieres entender el universo piensa en términos de energía, frecuencia y vibración“  
Nikola Tesla*

Este capítulo está dedicado a los experimentos necesarios para obtener las condiciones de operación, gran parte de la información obtenida está soportada en la literatura.

## 4.1 Incremento de células en suspensión

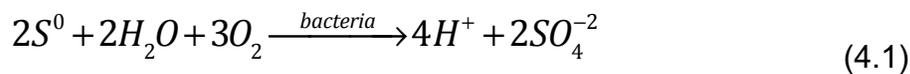
Se inocularon matraces Erlenmeyer con una concentración inicial de  $10^6$  células/mL en el medio de cultivo mencionado en la sección 3.1. Para la obtención de la curva de crecimiento, se extrajeron muestras y se realizaron conteos directos.

La cinética de crecimiento de la población de *A. thiooxidans* se estableció usando como fuente de energía azufre elemental (Figura 4.1). En esta cinética se observa la fase exponencial con una velocidad de incremento del número de células en suspensión de :  $\mu_1 = 0.26 \text{ días}^{-1}$  y un tiempo de duplicación total de la población de 2.6 días; entre los días 6 y 7, se observan concentraciones de células estadísticamente similares, con una desviación estándar de  $\pm 0.001$  y  $\pm 0.05$  respectivamente; este comportamiento se puede asociar a la adherencia a las partículas de azufre para la formación de biopelículas [130], como se corroboró en las imágenes obtenidas por el microscopio óptico durante los conteos celulares los días 6-7 (Figura 4.2). El incremento posterior en la concentración celular (días 8-13) se debe a la división celular. Este incremento de la biomasa en suspensión tiene una velocidad de  $\mu_2 = 0.12 \text{ días}^{-1}$ , que corresponde a un tiempo de duplicación total de la población de 5.7 días. Otros autores han estudiado la cinética de incremento celular de *A. thiooxidans* en medio con  $S^0$  [131–133]; sin embargo estos estudios no presentan este tipo de comportamiento, posiblemente debido a que realizan el estudio como una cinética de adsorción calculando tanto la concentración de células en suspensión y las adheridas al  $S^0$ , ajustándose a una isoterma de Langmuir [131], modelos no lineales a partir de una isoterma de Freundlich [133] u otros [132].

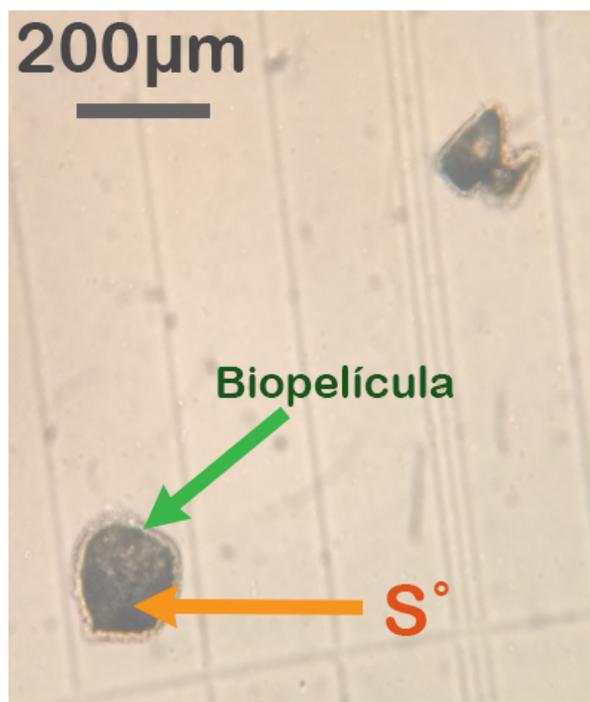


**Figura 4.1** Variación de las células en suspensión de *A. thiooxidans* en el medio de cultivo (tabla 3.1) con  $S^0$  como fuente de electrones/energía y el comportamiento del pH en el tiempo transcurrido desde la inoculación. Los experimentos se llevaron a cabo por triplicado y se muestra la desviación estándar.

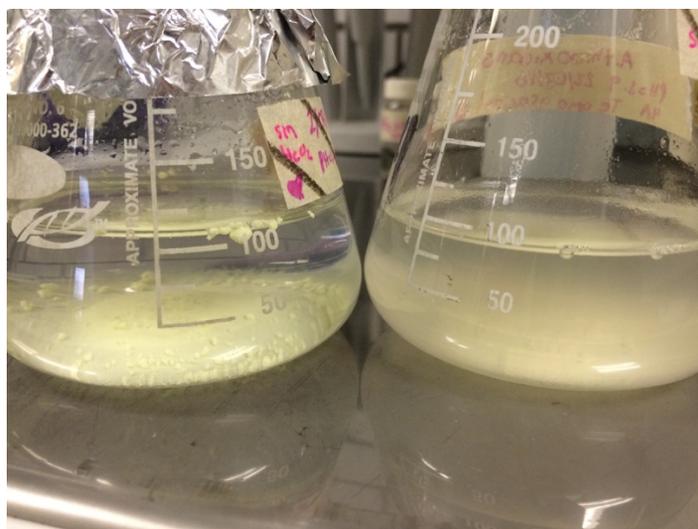
El decremento de pH es ocasionado por la biooxidación del  $S^0$  (reacción 4.1)



Al final de 3.5 - 4 meses se consume todo el  $S^0$  (Figura 4.3), el pH del medio disminuyó a casi cero, mientras se mantuvo una elevada población celular ( $\approx 10^8$  células/mL) corroborando que *A. thiooxidans* puede vivir en ambientes extremos, como se ha demostrado ya en la literatura; se ha reportado que *A. thiooxidans* puede desarrollarse en un intervalo de pH de 0.5-5.5 [53]. No se muestran resultados cuantitativos del consumo total de azufre.



**Figura 4.2** Imagen obtenida mediante el microscopio óptico (40x) de una muestra de un cultivo de *A. thiooxidans* que corresponde al día 7 de incubación.



**Figura 4.3** Cultivos de *A. thiooxidans*. Izquierda, cultivo de 4 días; derecha, cultivo de 3.5 meses.

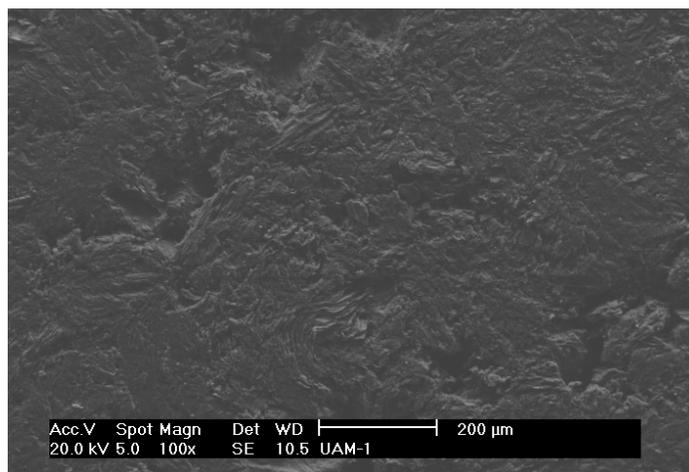
Inicialmente, también se optó por trabajar con una fuente de energía soluble, como el tetratiónato de potasio ( $K_2S_4O_6$ ) debido a que existen estudios que lo usan como fuente de energía para microorganismos acidófilos [2,134–136] y con el propósito de facilitar los experimentos electroquímicos con un compuesto soluble; sin embargo, el incremento celular fue más lento (datos no mostrados), pues los politionatos no son estables en ambientes oxigenados, sobre todo a un intervalo de pH bajo [137,138].

## 4.2 Caracterización del sistema abiótico

Se caracterizó el sistema abiótico para tener un control abiótico de la interfase .

### 4.2.1 Electrodo de trabajo

Los electrodos utilizados en este trabajo fueron barras de grafito comercial con una pureza de 95%, este grafito presenta una superficie porosa e irregular (Figura 4.4). Del análisis de SEM-EDAX se encontró que las impurezas que se encontraron en el grafito contienen sílice, magnesio y hierro.



**Figura 4.4** Imagen de SEM de la superficie del grafito utilizada como electrodo de trabajo.

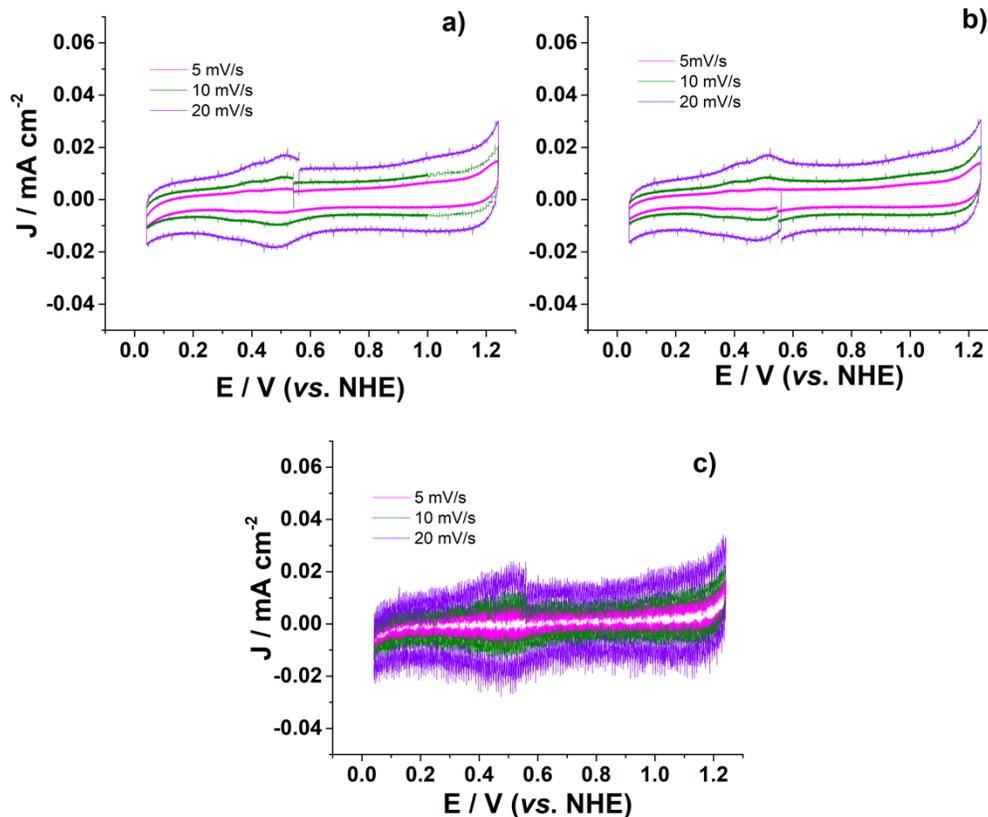
Antes de realizar cualquier experimento electroquímico que involucró a *A. thiooxidans* fue necesario caracterizar el medio de cultivo y la respuesta

electroquímica de la fuente de energía. A continuación se presentan los resultados de la respuesta del tetrionato ( $S_4O_6^{2-}$ ) y del azufre elemental ( $S^0$ ).

Se realizaron CVs para establecer la ventana de electroactividad, así como la presencia de posibles procesos de transferencia de carga asociados a especies químicas presentes en solución; el medio de cultivo mencionado en el apartado 3.1 (con/sin adición de  $S^0$ ) fue utilizado como electrolito soporte. Se utilizó el sistema de tres electrodos mencionado en el apartado 3.5. El electrodo de trabajo fue una barra de grafito (sección 3.4). Las velocidades de barrido seleccionadas para iniciar esta caracterización son de 5, 10 y 20  $mV s^{-1}$ . Estas velocidades de barrido se eligieron pues no incrementan la corriente capacitiva de forma importante permitiendo observar la posible existencia de procesos redox en la superficie. Se burbujeó el sistema con nitrógeno y se agitó durante 2 minutos antes de comenzar cada experimento. Para las pruebas de oxidación de tetrionato ( $S_4O_6^{2-}$ ) se añadió  $K_2S_4O_6$  en concentraciones de 3 y 6 mM y se utilizó una velocidad de 5  $mV s^{-1}$ .

#### **4.2.2. Selección de la ventana de potencial del sistema abiótico**

En la Figura 4.5 se presentan los CVs del electrodo de grafito en el medio de cultivo; en estos voltamperogramas aparece un proceso de reducción y oxidación, muy cercano (0.5 V vs. NHE) de donde se inicia el barrido de potencial (OCP), y es independiente tanto de la dirección donde se inicia el barrido (Figuras 4.5 a y b), como de la agitación del medio (Figura 4.5 c); este comportamiento indica la presencia de una especie que se encuentra adsorbida en la superficie y puede estar relacionada a una impureza propia del proceso de producción del grafito [139]. De lo anterior se concluye que la solución de medio de cultivo no lleva a cabo ninguna reacción faradaica al aplicar un potencial. Esta condición es favorable pues significa que en los siguientes experimentos en presencia de *A. thiooxidans*, donde se observe una modificación en los CVs puede ser atribuida a un proceso que vinculado directamente con la bacteria

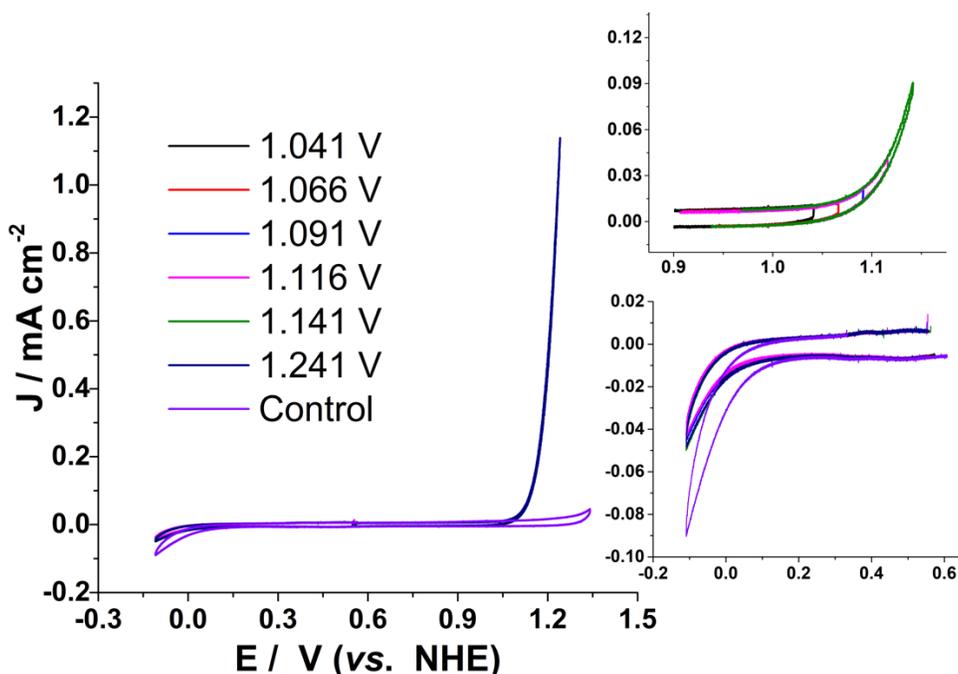


**Figura 4.5** Voltamperometrías cíclicas obtenidas en grafito a diferentes velocidades de barrido, en el medio de cultivo sin  $S^0$  a pH 1.9. El barrido de potencial se inicia en el OCP en diferentes direcciones: a) sentido positivo, b) sentido negativo, y c) sentido positivo con agitación (100 rpm).

### 4.2.3 Voltamperometría cíclica con tetrionato ( $S_4O_6^{2-}$ ) y azufre elemental ( $S^0$ )

Después de realizar las voltamperometrías cíclicas del electrodo de grafito únicamente sumergido en el medio de cultivo, se realizaron pruebas experimentales añadiendo al sistema 3 o 6 mM  $S_4O_6^{2-}$ . En la Figura 4.6 se presentan los CVs a diferentes potenciales en sentido positivo para 3 mM de tetrionato. En el sentido negativo no aparece reacción. por ser similares Los resultados empleando ambas concentraciones reflejaron un comportamiento similar (por lo que los gráficos con 6 mM se omiten). La oxidación química del  $S_4O_6^{2-}$  es tan rápida que no se alcanza a

observar un proceso rédox independientemente de la velocidad de barrido que se utilice. El único efecto sobresaliente/interesante que se presenta es el incremento en la corriente necesaria para llevar a cabo el proceso de oxidación del agua, a valores de 1.1-1.19 mA cm<sup>-2</sup>. Esto puede deberse a que está ocurriendo un traslape de los picos al potencial de oxidación del agua o bien, la oxidación del S<sub>4</sub>O<sub>6</sub><sup>2-</sup> cataliza la oxidación del agua. Se llevó a cabo el análisis por medio de potenciales de inversión; sin embargo, no se obtuvo más información de interés pues no se encontró un proceso relacionado con la oxidación del tetrationato.



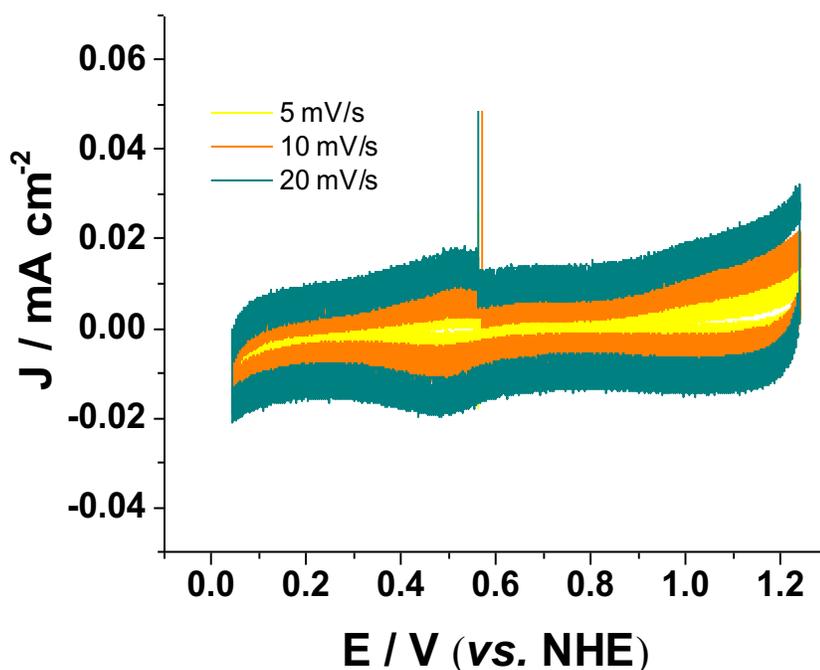
**Figura 4.6** Voltamperometrías cíclicas ( $v=5 \text{ mV s}^{-1}$ ) obtenidas en grafito, en el medio de cultivo pH 1.9 con 3 mM S<sub>4</sub>O<sub>6</sub><sup>2-</sup>. El barrido de potencial se inicia en el OCP en dirección positiva y la dirección del barrido se invierte en diferentes potenciales indicados en la figura. El control se obtiene en ausencia de tetrationato.

De este experimento se concluyó que el tetrationato se oxida muy rápido en condiciones aerobias y no se puede registrar su comportamiento electroquímico en un electrodo de grafito. En general, los politionatos no son una forma estable y predominante del azufre en ambientes oxigenados, y representan sólo un intermediario a lo largo de las diferentes etapas de la oxidación y reducción entre especies más reducidas de azufre y el sulfato [137]; sin embargo, se propuso como primer alternativa pues existen cinéticas de incremento celular en suspensión

utilizando tetrionato de potasio como fuente de energía en condiciones aerobias [134] .

Druschel et al. [137] estudiaron la cinética del tritronato ( $S_3O_6^{2-}$ ) y el tetrionato ( $S_4O_6^{2-}$ ) en sistemas análogos al drenaje de roca ácido; sin embargo la velocidad de barrido de las CVs obtenidas fue de  $500 \text{ mV s}^{-1}$  y se utilizó como electrodo de trabajo una gota de mercurio que se oxidaba y formaba un complejo de la forma  $Hg(S_xO_y^n)$  que posteriormente se estudiaba más afondo. Esto demuestra que se necesita tener condiciones experimentales electroquímicas muy diferentes para poder detectar el tetrionato en condiciones aerobias, que están fuera del alcance del proyecto. Además los sistemas bioelectroquímicos (MFCs) reportados que han trabajado a pH ácido usando  $S_4O_6^{2-}$  como fuente de energía [2,3], han sido bajo condiciones anaerobias, que son perjudiciales para *A. thiooxidans* al ser una bacteria aerobia estricta [35]. De esta información y la obtenida en la sección 4.1 relacionada con el lento incremento de la biomasa celular usando  $S_4O_6^{2-}$ , se tomó la decisión de únicamente trabajar con  $S^0$  en suspensión como fuente de energía.

Cuando se realiza una CV con adición de  $S^0$  en suspensión (Figura 4.7), el comportamiento es similar a los obtenidos en la Figura 4.5; sin embargo, el azufre al ser una especie no conductora y estar en suspensión sólo provoca perturbaciones en la corriente con respecto al CV trazados en ausencia de  $S^0$ . Cuando se agita la solución en presencia de  $S^0$ , los CVs no presentan ninguna modificación y sólo se observa corriente con mayores perturbaciones (gráficos no mostrados). Por lo que en los posteriores análisis de CV fue necesario promediar los puntos mediante la herramienta filter analysis del software EC Lab.

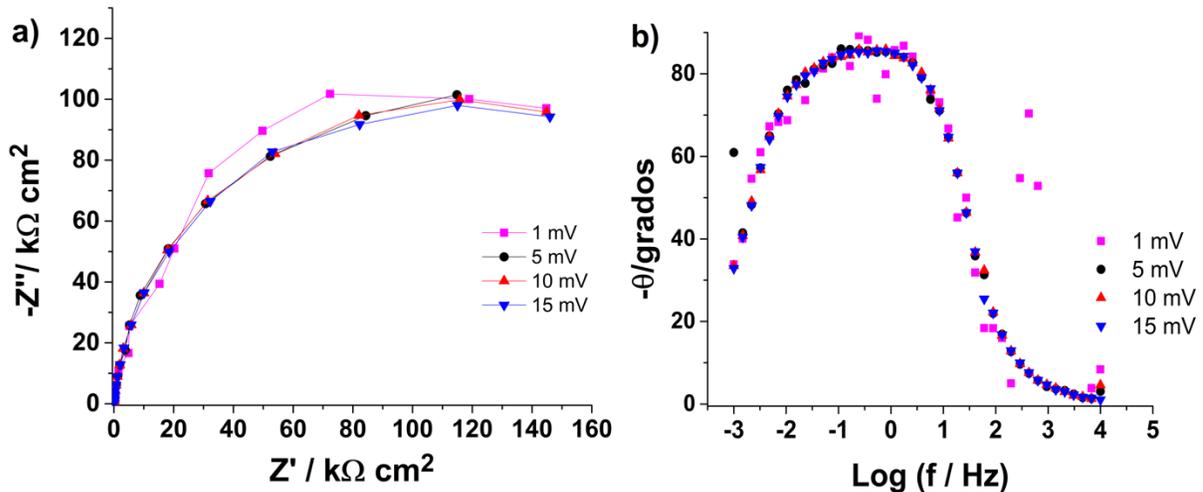


**Figura 4.7** Voltamperometrías cíclicas obtenidas en grafito, en el medio de cultivo pH 1.9 con  $S^0$  en suspensión. El barrido de potencial se inicia en el OCP en dirección positiva, a diferentes velocidades de barrido.

#### 4.2.4. Selección de condiciones experimentales para EIS

Uno de los aspectos importantes para llevar a cabo EIS es la amplitud utilizada; para su selección se deben realizar espectros con diferente amplitud. En este trabajo se ensayaron 1, 5, 10 y 15 mV. En la Figura 4.8 se presentan los espectros de impedancia obtenidos, se observa ruido a una amplitud de 1 mV, sobre todo en los diagramas de Bode fase, por lo que las mediciones a esta amplitud no serían confiables; mientras que de 5-15 mV el espectro se mantiene sin ningún cambio, lo cual significa que en este intervalo no existe error en la respuesta de impedancia [140,141]; entonces se selecciona una amplitud que se encuentre en el punto intermedio de otras dos amplitudes sin sufrir ningún cambio en el espectro [140,141] por esta razón, se eligió 10 mV como la amplitud para todos los experimentos. Los puntos por década varían de acuerdo con el tipo de experimento, siendo lo más

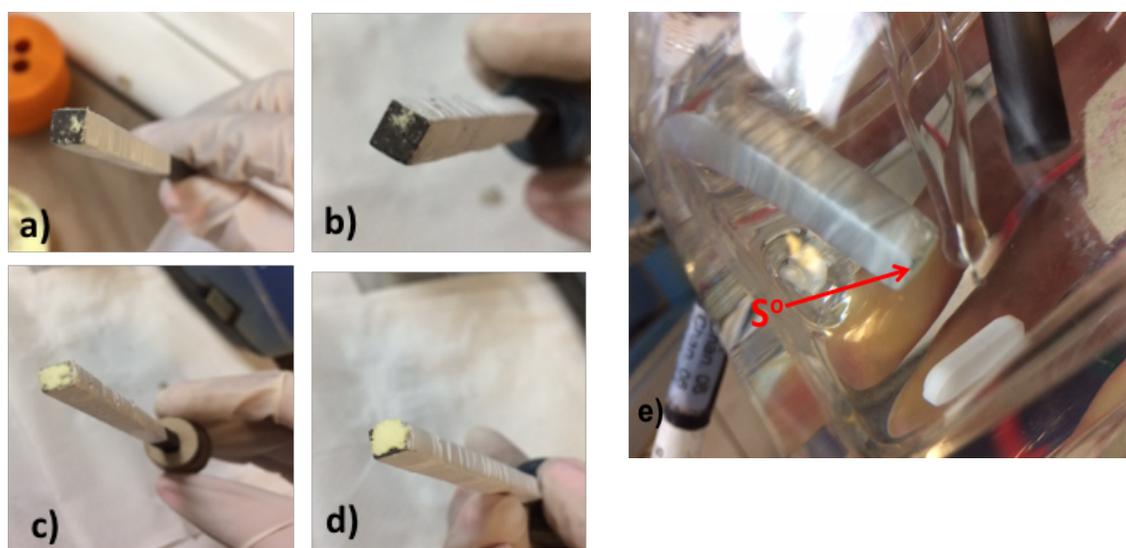
común 10 puntos por década en sistemas; no obstante, cuando se utiliza este valor, el tiempo de adquisición de todo el espectro fue de casi 3 horas; al trabajar en sistemas que pueden cambiar como es el caso de este trabajo; se seleccionaron 6 puntos por década. El intervalo de frecuencias utilizado fue de  $10^3$  Hz hasta  $10^{-3}$  Hz esto debido a que valores superiores a  $10^4$  Hz existen perturbaciones relacionadas con el equipo; mientras que a frecuencias más bajas demoraría más la obtención del espectro sin garantizar el estado estacionario de la medición. En la siguiente sección se describe el comportamiento del sistema abiótico (control). Para realizar cada medición de EIS es necesario tener un OCP estable con una variación de  $\pm 5$  mV entre cada medición por al menos 1 hora, de lo contrario, el espectro no presenta la calidad requerida para su posterior análisis.



**Figura 4.8** Espectros de Impedancia realizados a electrodos de grafito en medio de cultivo pH 1.9 y 100 rpm con diferentes amplitudes, que se indican en la figura . a) Diagrama de Nyquist b) Diagrama Bode ángulo.

## 4.2.5 Efecto del $S^0$ elemental adsorbido en el electrodo de grafito

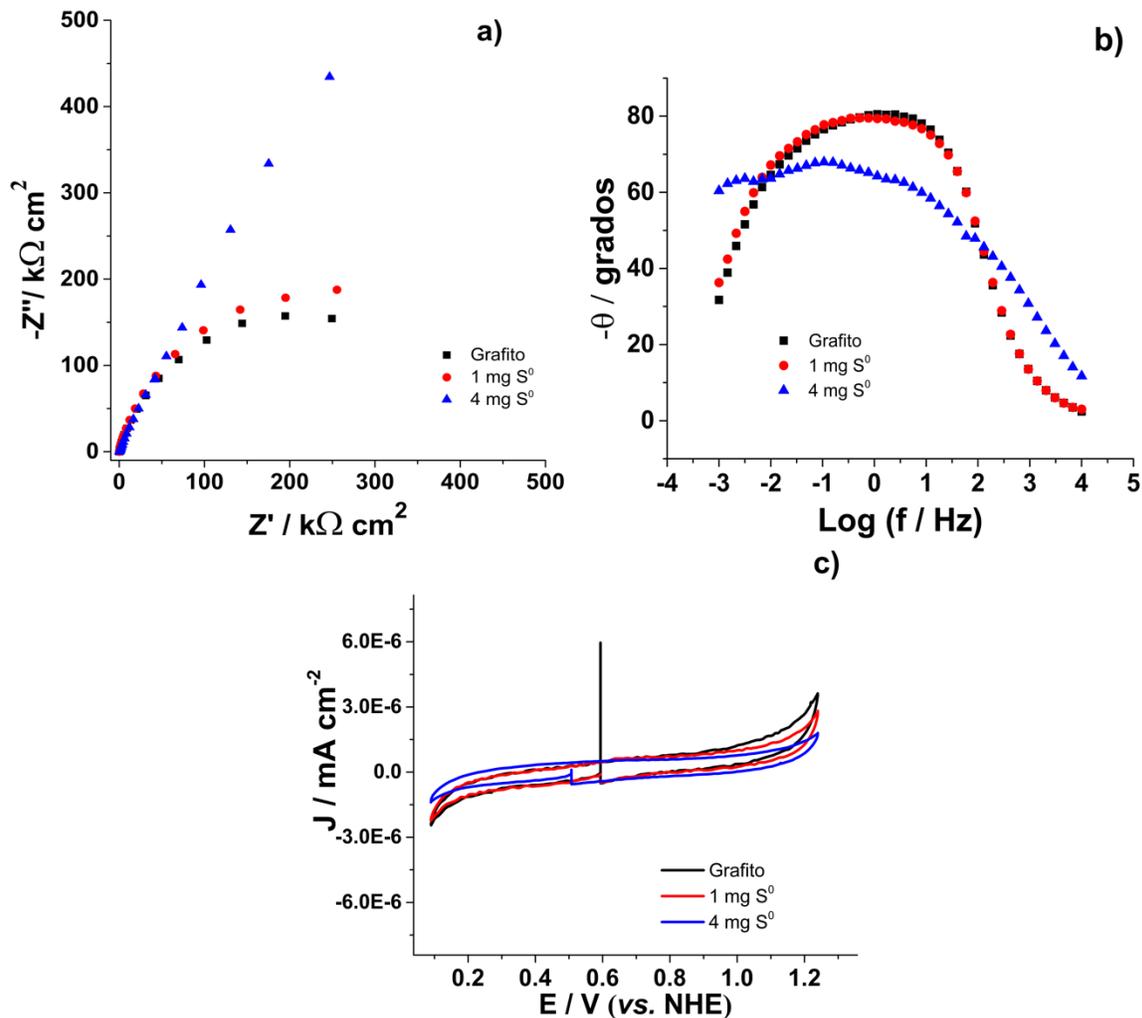
Con el fin de establecer qué tanta resistencia adicional aporta el azufre elemental adsorbido en la superficie del grafito, se realizaron otras pruebas experimentales de EIS y CV por duplicado, con la superficie del electrodo de grafito espolvoreada con 1 y 4 mg de  $S^0$  (Figura 4.9). Cuando se realizaron los experimentos, la hidrofobicidad del  $S^0$  es tan importante que el azufre permaneció adherido al grafito en el sistema de tres electrodos, aunque hubiera agitación (100 rpm).



**Figura 4.9** a) y b) Electrodo de grafito con 1 mg  $S^0$ ; c) y d) electrodo de grafito con 4 mg  $S^0$  (la superficie fue completamente cubierta) e) Sistema de tres electrodos en medio de cultivo pH 1.9, sin  $S^0$  en suspensión.

En la Figura 4.10 se muestran los diagramas de EIS obtenidos con electrodos ligeramente y completamente cubiertos de  $S^0$ . Tanto en el diagrama de Nyquist como de Bode se muestra que para la superficie desnuda del grafito como la que fue espolvoreada con 1 mg de  $S^0$  no existe un cambio importante tanto en la forma del espectro y se conserva una única constante de tiempo con su respectivo fenómeno difusivo, (bajas frecuencias  $10^{-3}$  a  $10^{-2}$  Hz; mientras que cuando la superficie del electrodo está completamente cubierta de  $S^0$  (4 mg) cambia

totalmente el espectro y posiblemente el electrodo ya no se encuentre en estado estacionario. Además, en la voltamperometría cíclica (Figura 4.10c), se observa un ligero decremento en la corriente a medida que el electrodo de grafito se cubre con  $S^0$ , sin volverse el sistema muy resistivo. No obstante sigue sin presentarse una reacción faradaica.



**Figura 4.10** Electrodo de grafito cubiertos con diferentes cantidades de  $S^0$ . Los EIS fueron obtenidos en  $OCP \pm 10$  mV. a) Diagrama de Nyquist. b) Diagrama de Bode fase. c) CV en sentido negativo a partir de  $OCP$   $v = 1$  mV  $s^{-1}$ .

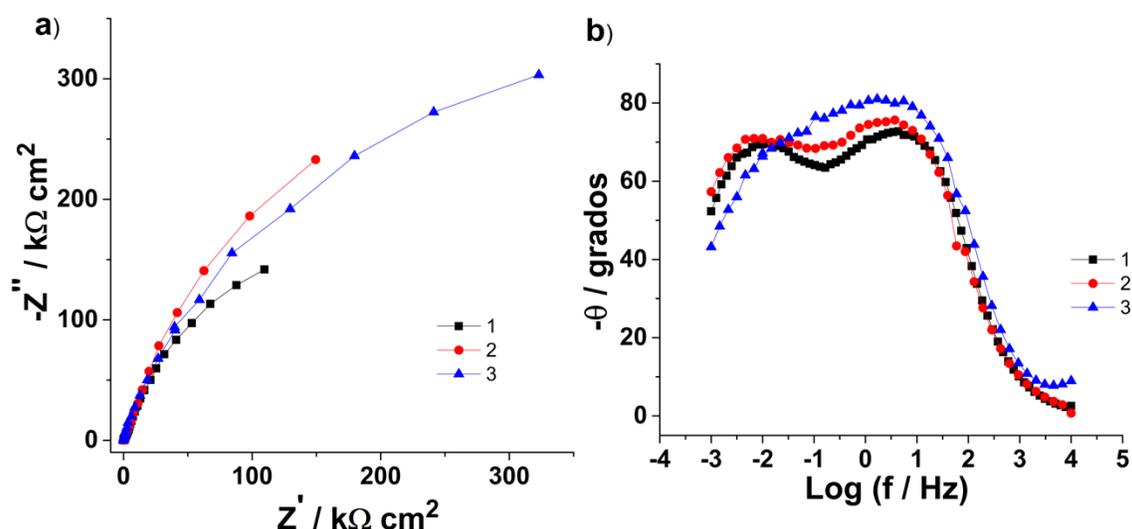
## 4.2.6 Efecto del lavado y esterilización de los electrodos de trabajo

Una dificultad que se presentó en el desarrollo de esta investigación fue la reproducibilidad experimental. La superficie de los electrodos de grafito es uno de los aspectos que juega un papel importante en la reproducibilidad. El lavado de los electrodos consiste en enjuagarlos con una solución diluida de HCl y posteriormente enjuagar con acetona y después remojar durante la noche en agua desionizada y posteriormente esterilizar los electrodos en la autoclave (sección 3.4).

En la Figura 4.11 se muestran los diagramas de Nyquist obtenidos para un electrodo de grafito que se lavó y esterilizó y se le realizó un espectro de impedancia (control abiótico); sin embargo si a este mismo electrodo, se enjuagaba, una vez más, con agua desionizada y esterilizaba en autoclave, el espectro obtenido se modificaba (Figura 4.11); era diferente de la medición anterior, cada que se realizaba la 2da y 3era medición, el espectro va incrementando hacia magnitudes mayores. Esto demuestra que hay un efecto que tiene el lavado y esterilización en la superficie del grafito. Bouleghlimat et al. [142] trataron grafito pirolítico con concentraciones de HCl entre 0.01 y 2 M y observaron la formación ligeras protuberancias de 4-6 nm de altura y 10 nm de ancho debido a la intrusión del ácido en el grafito que causa un debilitamiento de las fuerzas de interplanares de van der Waals y rompimiento de enlaces interplanares que ocasiona una delaminación similar a burbujas. Mientras que Vilimová et al. [143] demostraron que el exponer al grafito a temperaturas de 170 °C durante 1 hora, resulta en una mayor tasa de defectos en la estructura del grafito. Se intentó realizar sólo la esterilización de los electrodos de grafito únicamente con luz UV durante 2.5 horas; sin embargo, para las condiciones del laboratorio esto no fue suficiente y se contaminaba el sistema

Debido a lo anterior, se recomienda hacer una preselección de electrodos de grafito que tengan espectros de impedancia similares y con magnitudes grandes tanto en la componente real e imaginaria con la finalidad de obtener los parámetros similares,

mediante el ajuste con un circuito equivalente y posteriormente obtener desviaciones estándar factibles.



**Figura 4.11** Espectros de Impedancia de un electrodo de grafito, diferentes mediciones después de esterilizar en autoclave. a) Diagrama de Nyquist. b) Diagrama de Bode fase.

Resumiendo, de este capítulo se obtuvo la siguiente información:

- Se seleccionó el  $S^0$  como única fuente de energía
- Se establecieron las condiciones experimentales para realizar la CV y EIS para el sistema abiótico
- De las respuestas del sistema abiótico: de las CVs, el medio de cultivo no presenta una respuesta faradaica, en la superficie del grafito hay un par redox asociado al proceso de fabricación del grafito. El azufre elemental no reacciona en la ventana de potencial seleccionada.
- El lavado y esterilización de los electrodos modifica la interfase
- El azufre elemental no contribuye a un sistema más resistivo/ no cambia de forma significativa los espectros de EIS.

Una vez obtenida esta información se caracterizó la interfase del bioelectrodo *in situ* y *ex situ* que se presentan en el siguiente capítulo.

## **Capítulo 5 . Resultados y discusión**

*“No te sientas solo, el universo está dentro de ti “  
Rumi*

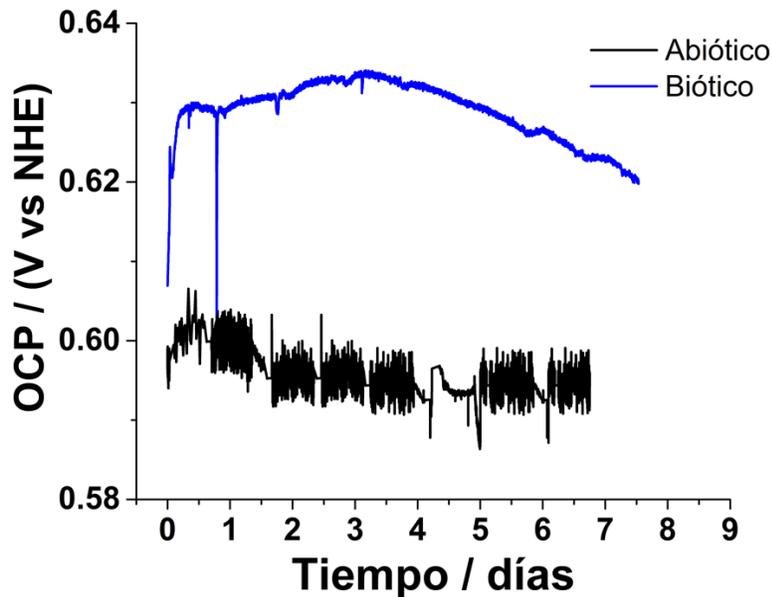
## 5.1. Caracterización electroquímica de la interfase del bioelectrodo *in situ*

En una celda electroquímica descrita en la sección 3.5 se inoculó con una biomasa inicial de  $10^7$  células/mL y el medio de cultivo incluyó  $S^0$  elemental (10 g/L en suspensión). Se utilizó como electrodo de trabajo un electrodo de grafito previamente lavado y esterilizado. Así mismo se llevó a cabo el mismo estudio en ausencia de microorganismos (control abiótico). Se midió el potencial de circuito abierto (OCP) y se realizaron espectros de impedancia (EIS) durante 7 días en continuo (*in situ*) con sin agitación, así como con una agitación magnética de 100 rpm. Adicionalmente, al finalizar el día 7, se realizó una Voltamperometría Cíclica (CV) para indagar las propiedades oxidativas-reductoras de la biopelícula.

### Medición del OCP durante el periodo de crecimiento de la población

En el sistema abiótico, el OCP se mantuvo constante en un valor de 0.59-0.60 V vs. NHE, mientras que en el sistema biótico existieron ligeras fluctuaciones e incrementos del OCP (Figura 5.1), posiblemente relacionados con la adherencia de la bacteria y la biooxidación del azufre elemental a sulfatos (reacción 4.1).

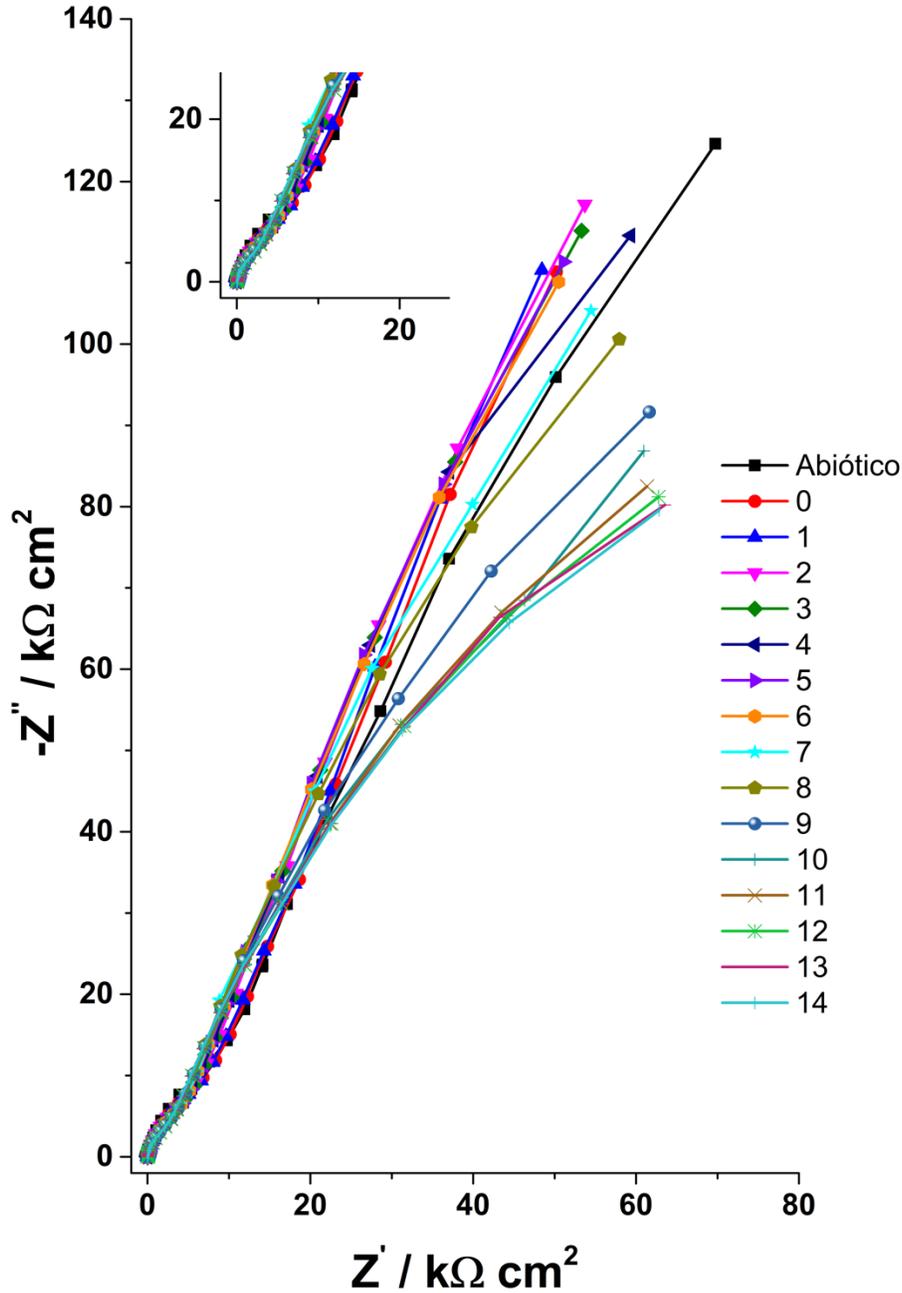




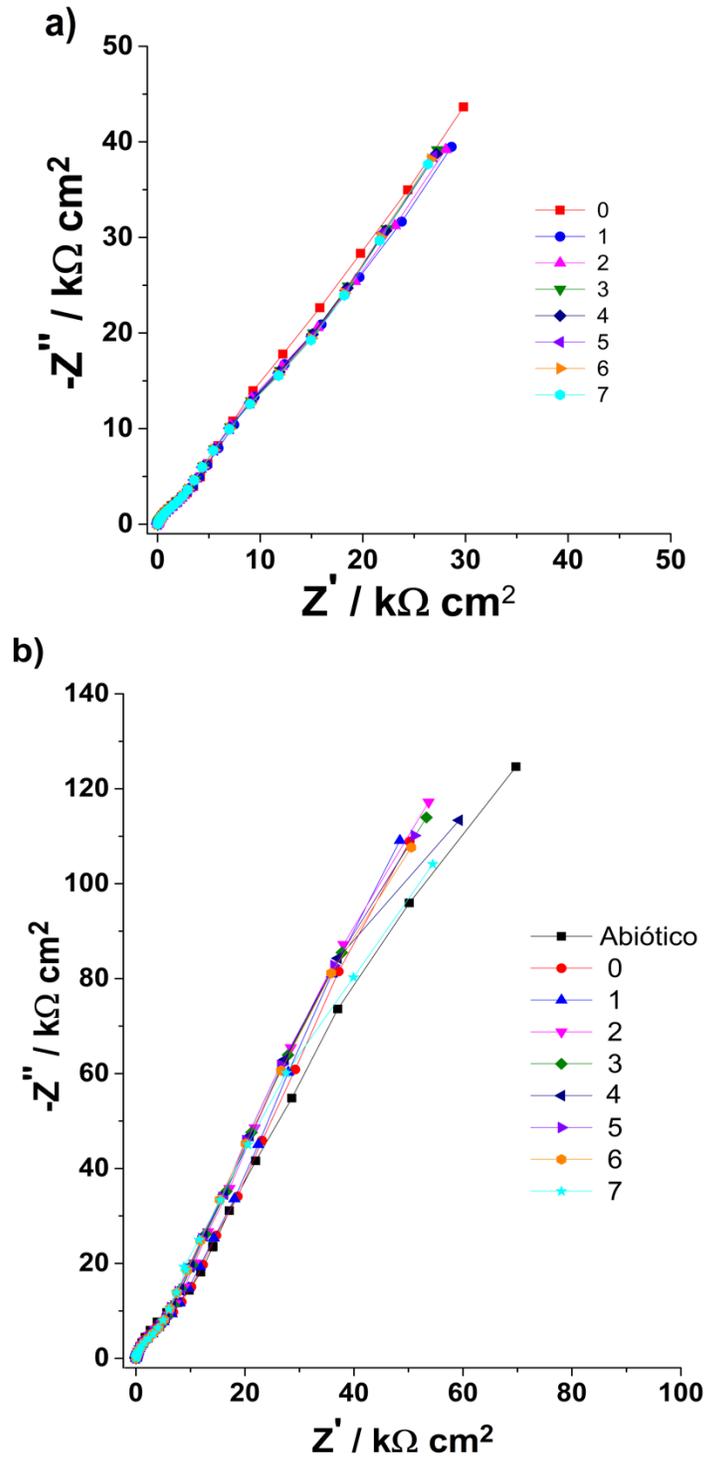
**Figura 5.1** Variación del Potencial a circuito abierto (OCP) durante el tiempo de inmersión de una barra de grafito en el medio de cultivo con  $S^0$  en suspensión: sistema abiótico y sistema biótico.

En la Figura 5.2 se muestran los diagramas de Nyquist obtenidos durante 14 días para el sistema biótico. En este sistema biótico, los espectros muestran dos constantes de tiempo relacionadas con la capacitancia y la porosidad/difusión dentro del material; sólo existe una ligera disminución en la primera constante de tiempo (semicírculo) durante los 14 días y el mayor cambio se aprecia en el proceso difusivo (diagonal de  $45^\circ$ ) que se lleva a cabo a bajas frecuencias; debido a que la primera constante de tiempo está asociada a la modificación de la interfase y ésta ya no se modifica después de 7 días de inmersión (Figura 5.2 recuadro), se decidió acotar el experimento a sólo 7 días, como primer criterio experimental para el estudio de la formación de la biopelícula. En el sistema abiótico no aparecen cambios significativos en ninguna de las componentes de la impedancia durante los 7 días (Figura 5.4a); mientras que los diagramas de Bode fase del sistema biótico, muestran (Figura 5.4b) un ligero desplazamiento del espectro a altas frecuencias y una modificación de éstos, en el intervalo de  $10^{-3}$  a  $10^{-1}$  Hz. Estos cambios, están relacionados a la adherencia de *A. thiooxidans* y a la modificación del medio de cultivo por la producción de  $H^+$ ,  $SO_4^{2-}$  y otros productos metabólicos. Sólo se

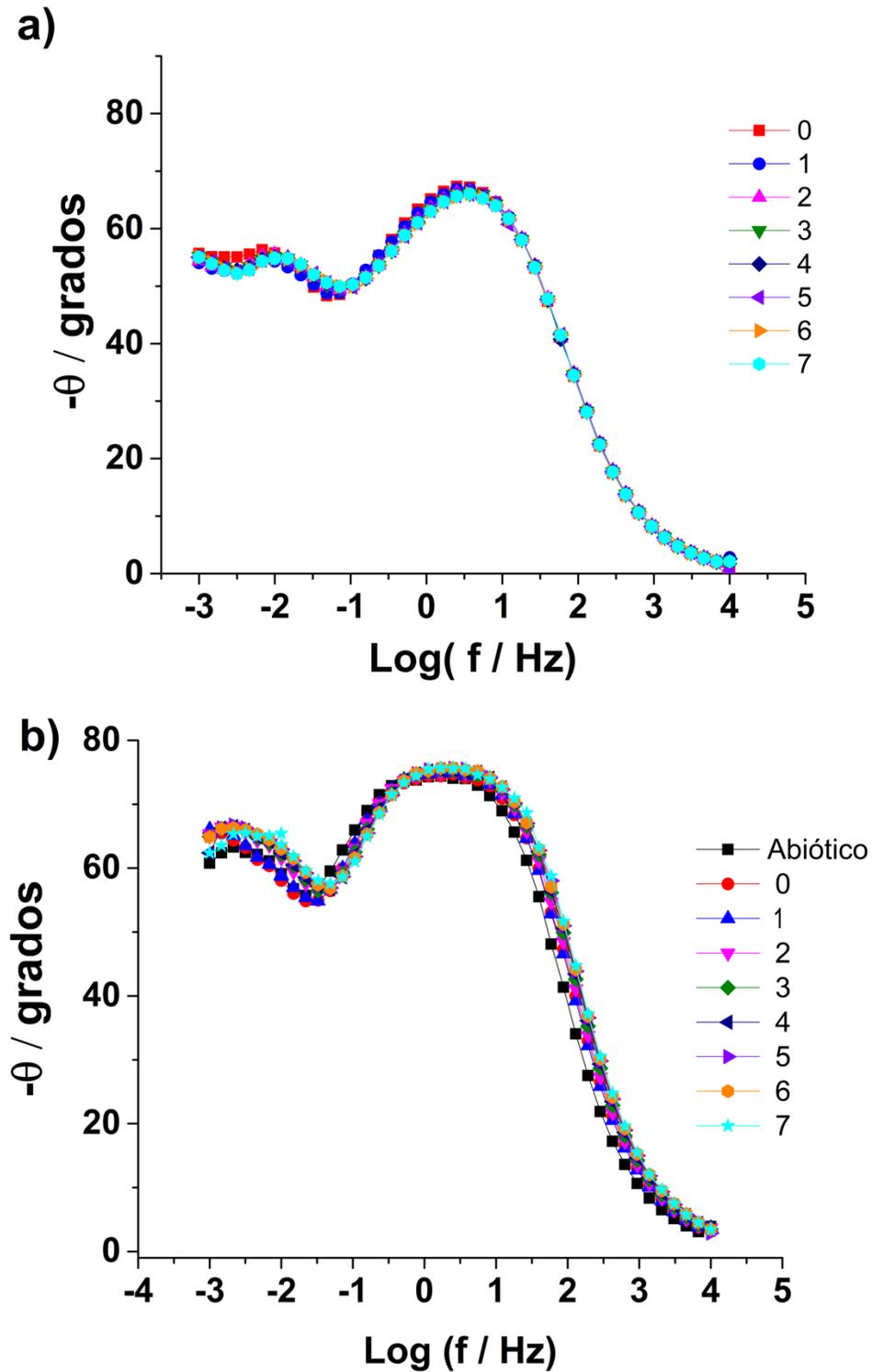
muestran los espectros realizados sin agitación debido a que los resultados obtenidos a 100 rpm son similares.



**Figura 5.2** Experimento *in situ*. Diagramas de Nyquist obtenidos en función del tiempo de inmersión (indicados en la figura), en un electrodo de grafito en el medio de cultivo con  $S^0$  en suspensión y en presencia de un inóculo de *A. thiooxidans*, sin agitación, con ampliación a altas frecuencias. Se incluye el diagrama obtenido en ausencia de microorganismos (abiótico).

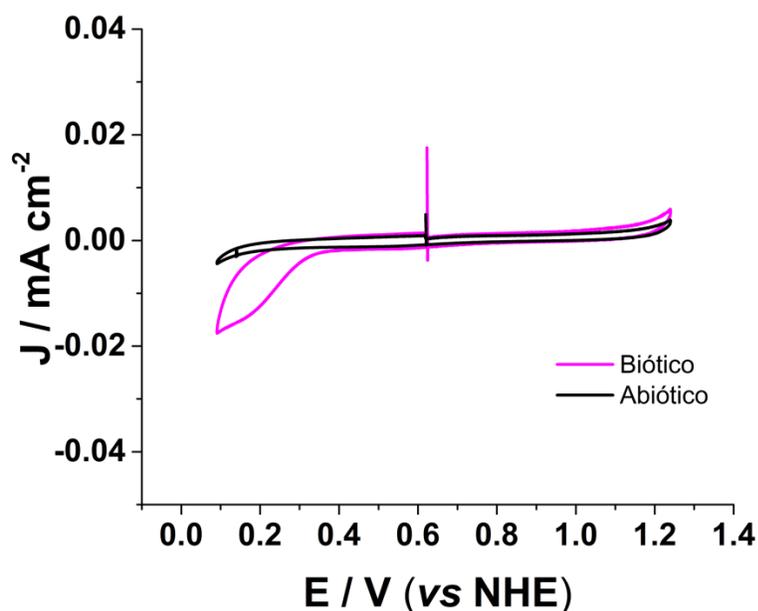


**Figura 5.3** Diagramas de Nyquist obtenidos en función del tiempo de inmersión (indicados en la figura), en un electrodo de grafito en el medio de cultivo con  $S^0$  en suspensión, sin agitación. Experimento *in situ*. a) Control abiótico. b) Sistema biótico (con inóculo de *A. thiooxidans*.)

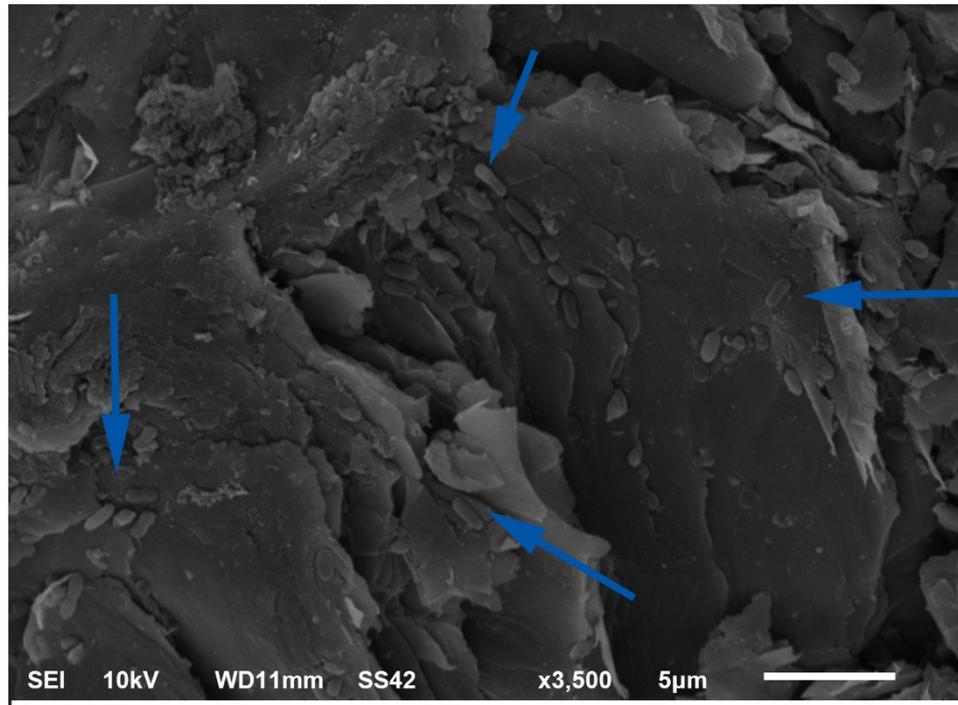


**Figura 5.4** Diagramas de Bode fase obtenidos en un electrodo de grafito en el medio de cultivo. Los espectros fueron obtenidos a los diferentes días, indicados en la figura sin agitación. Experimento *in situ*. a) Control Abiótico b) Sistema Biótico (con inóculo de *A. thiooxidans*).

Se realizó una CV al electrodo de grafito que estuvo en contacto en el sistema abiótico y al biótico al finalizar el séptimo día de inmersión. Sólo se realizó la Voltamperometría cíclica el último día con la finalidad de no dañar las células/biopelícula. En la Figura 5.5 se muestran las CV de ambos sistemas, el barrido de potencial se inicia en sentido positivo. En el sistema abiótico no aparece ningún proceso de oxidación/reducción; mientras que en el sistema biótico aparece, un proceso de reducción irreversible a 0.1-0.2 V vs. NHE. Este proceso irreversible puede ser adjudicado a un compuesto producido por el metabolismo de *A. thiooxidans* que queda acumulado en la interfase grafito/biopelícula [144]. En el siguiente capítulo se discutirá con mayor profundidad este proceso. En la Figura 5.6 se presenta una imagen de ESEM del electrodo del sistema biótico, las cuales muestran células dispersas sobre toda la superficie del grafito, en lugar de una biopelícula. El tamaño de los bacilos concuerda con el reportado en la literatura para *A. thiooxidans* ( $0.4 \mu\text{m} \times 1-1.5 \mu\text{m}$ ) [145]. Se obtuvieron bioelectrodos más colonizados pero estaban contaminados por otros microorganismos, estos electrodos se descartaron del estudio (Anexo 2).



**Figura 5.5** Caracterización de la interfase. a) Voltamperometría Cíclica ( $v = 1 \text{ mVs}^{-1}$ ) obtenida en el electrodo en medio de cultivo con  $\text{S}^0$  al finalizar el séptimo día. En ausencia (sistema abiótico) y presencia (sistema biótico) de *A. thiooxidans*. El barrido de potencial se inicia desde el OCP en dirección positiva.



**Figura 5.6** Imagen de ESEM del bioelectrodo al séptimo día de haber inoculado la celda electroquímica con *A. thiooxidans*. Las flechas indican las células adheridas.

De estos resultados experimentales surgieron las siguientes observaciones:

- Es complicado obtener desviaciones estándar debido a que el grafito presenta diferente comportamiento/magnitud de las componentes (real e imaginaria) (ver sección 4.2.6)
- El cambio en el medio de cultivo por los productos metabólicos acumulados durante los días de inmersión pueden enmascarar la respuesta de la biopelícula [91].
- En la celda electroquímica, aunque se mantuvo en agitación magnética durante los 7 días para la aeración del medio y mantener el  $S^0$  en suspensión; gran parte del  $S^0$  se precipitaba en el fondo y fue necesario agitar manualmente la celda ocasionalmente, esto pudo haber establecido variabilidad en la cantidad de células adheridas.
- Aunque los espectros de EIS mostrados se encuentran en estado estacionario, fue complicado obtenerlos debido a las perturbaciones del  $S^0$  en suspensión.

Estas observaciones orillaron a cambiar la estrategia para poder caracterizar la interfase sin interferencias, en la sección 5.2 y 5.3 se aborda la caracterización *ex situ*.

## **5.2 Caracterización microscópica de la interfase del bioelectrodo *ex situ***

Con la finalidad de caracterizar la interfase sin interferencias y evadir ruido en las mediciones debido al azufre en suspensión, se optó por primero crecer la biopelícula en el bioelectrodo y analizarla por técnicas microscópicas. A continuación se presenta un breve resumen del desarrollo experimental y la discusión de los resultados.

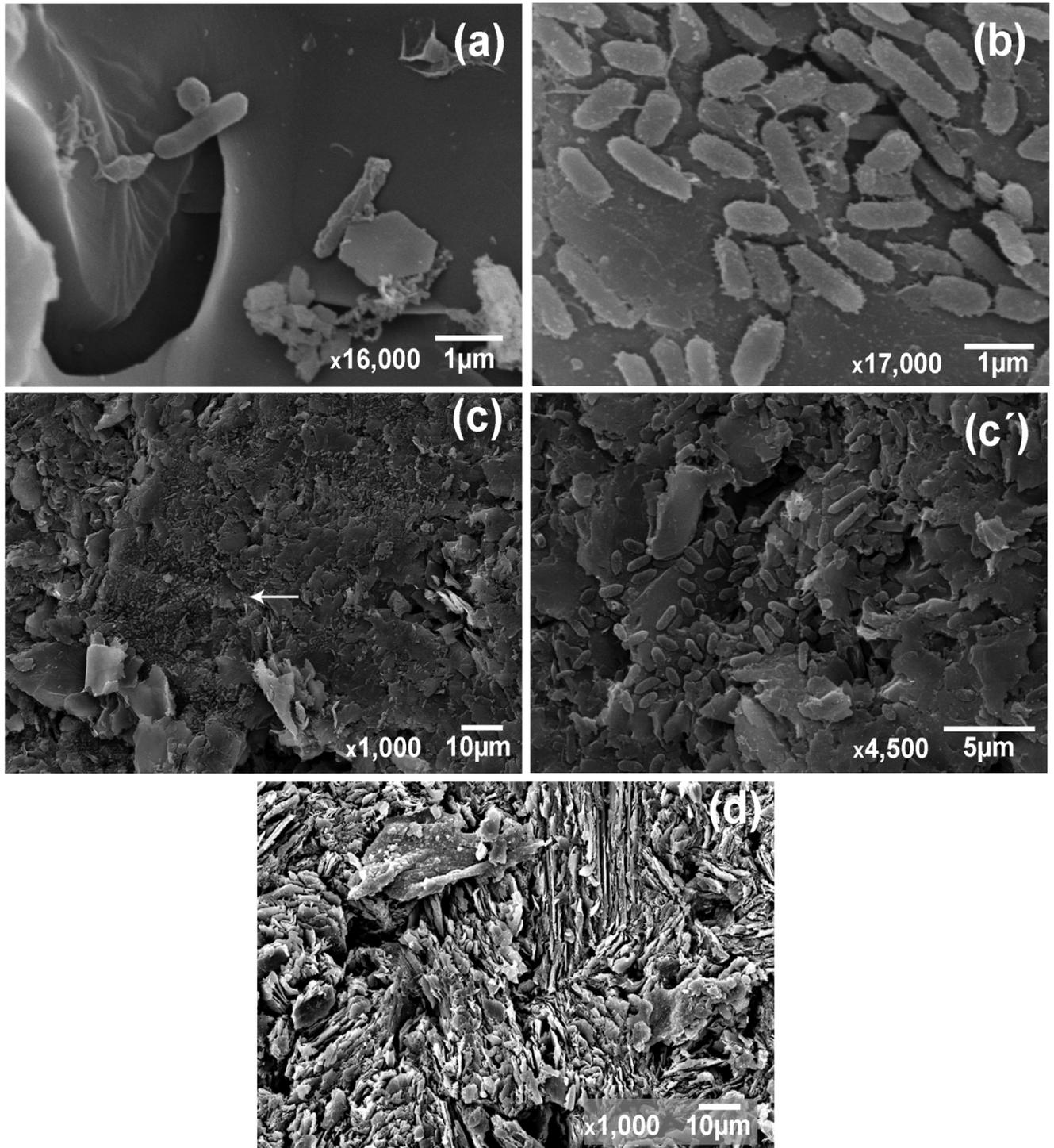
### **Condiciones experimentales parte 1: Adherencia y formación de una biopelícula de *A. thiooxidans* en electrodos de grafito (bioelectrodos)**

Cuatro electrodos de grafito (sección 3.7.1) fueron insertados en un frasco Wheaton. Se le adicionaron al frasco 100 mL del medio de cultivo y un inóculo (5 mL) con  $10^7$  células/mL y se agregó 1 gramo de  $S^0$  esterilizado por UV. Un electrodo de grafito inmerso en un medio abiótico (sin inóculo) se utilizó como control. Durante el tiempo de incubación y desarrollo de la biopelícula, no se aplicó ninguna perturbación eléctrica (potencial o corriente), y el grafito únicamente fue utilizado como soporte de la biopelícula. Se extrajeron bioelectrodos los días 1, 3, 5 y 7 para su caracterización microscópica. Con la finalidad de evitar cambios en la estructura de la biopelícula y/o en las EPS, otro juego de electrodos con las mismas condiciones fue utilizado para cada caracterización microscópica (ver Figura 3.2)

#### **5.2.1 Análisis ESEM**

Los bioelectrodos fueron analizados mediante microscopia electrónica de barrido (ESEM). Se encontraron células de *A. thiooxidans* adheridas a la superficie de

grafito después de dos horas (Figura 5.7a); mientras que en un sulfuro mineral al mismo tiempo, se alcanza el equilibrio de la adhesión [6,47] o ya existe una biopelícula. Las células colonizaron tanto la superficie y los poros del grafito después de 7 días de inmersión (Figura 5.7.b), formando una biopelícula en monocapa que cubre la superficie de forma heterogénea, con algunas áreas altamente colonizadas ( Fig. 5.7 c y c', flechas). A una magnificación de 17000x, se observaron células interconectadas a través de filamentos dentro de la biopelícula que pudieran ser extensiones de membrana o pili. Mientras que el control abiótico (Figura 5.7 d) muestra una superficie sin células lo que corrobora el buen manejo del material y esterilización del azufre elemental.

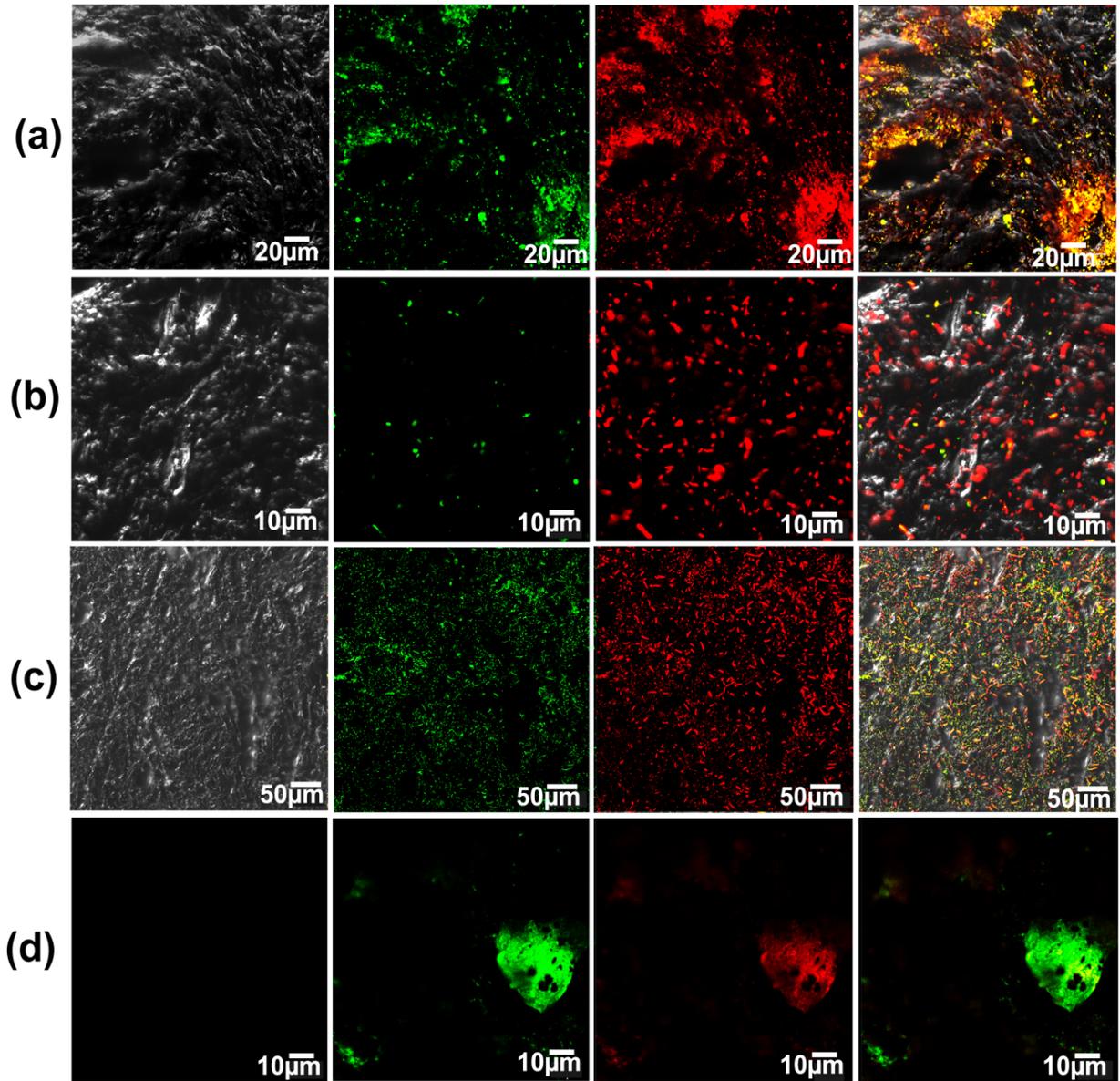


**Figura 5.7** Imágenes de ESEM de los bioelectrodos después de diferentes tiempos de incubación: a) 2h; b) y c) 7 días; d) control abiótico después de 7 días. Figura c' es una magnificación de la superficie indicada por la flecha en la figura c. Imágenes obtenidas a diferentes ampliaciones.

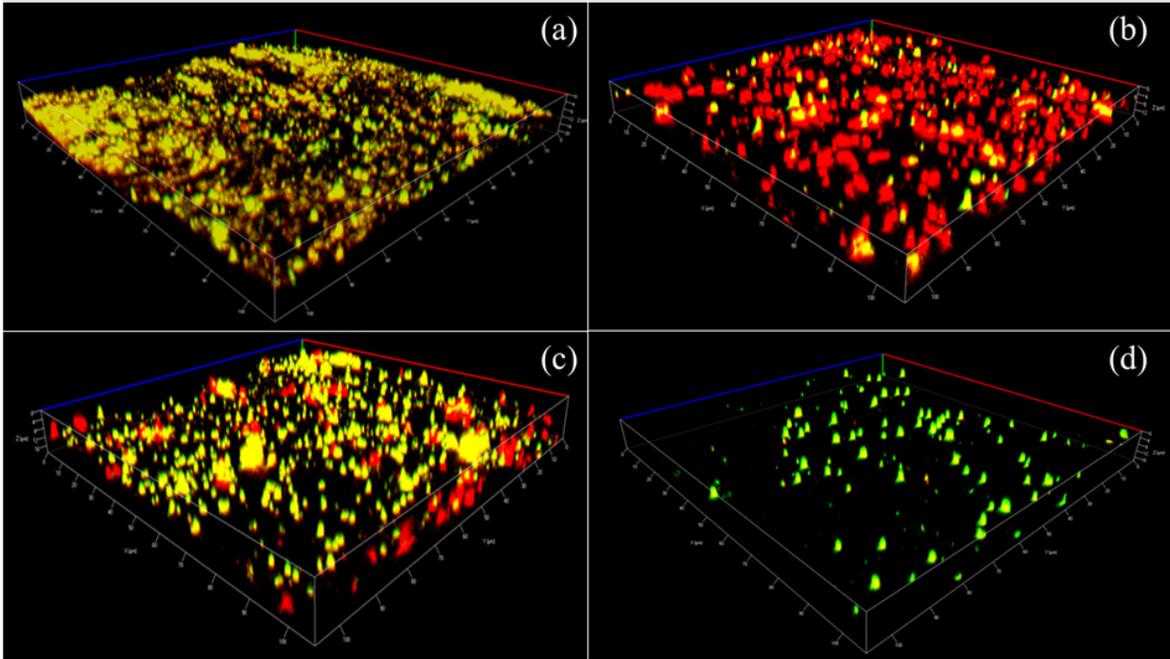
### 5.2.2 Análisis CLSM

Con la finalidad de no modificar las EPS que se encuentren en los bioelectrodos, para este análisis fue necesario utilizar bioelectrodos sin exposición a ninguna técnica electroquímica, con el fin detectar la adherencia y formación de la biopelícula en los electrodos de grafito (sección 3.7.1). La adhesión de *A. thiooxidans* al grafito y la composición general de la biopelícula fue monitoreada por CLSM (Figuras 5.8 y 5.9); así mismo, se observaron células formando una biopelícula colonizando la superficie del grafito y sus poros desde el día 1. En tal forma que tanto la señal de epifluorescencia de Con-A para exopolisacáridos (verde) como la de rojo Nilo RN para residuos hidrofóbicos (rojo), emiten intensidades similares, como lo indica el color amarillo resultante del traslape (Figuras 5.8 fila a y 5.9 a); entonces la proporción de EPS hidrofóbicos/exopolisacáridos es similar, sin embargo, se observa una mayor proporción de células teñidas de rojo después de 3 días (Figuras 5.8 fila b y 5.9 b), esto indica una mayor señal de epifluorescencia debido a una mayor abundancia de los compuestos extracelulares hidrofóbicos y por lo tanto la proporción de EPS hidrofóbicos/exopolisacáridos incrementa. Está reportado que las EPS de *A. thiooxidans* cultivada con S<sup>0</sup> tienen principalmente polisacáridos y ácidos grasos [6].

Otro cambio sucedió en la composición de EPS en el día 5, en donde los fluorocromos emitieron una intensidad similar sobre la superficie (amarillo) (Fig. 5.8 fila c), a la observada en el día 1; algunas biopelículas dentro de los poros permanecen en rojo debido a la proporción de EPS hidrofóbicos con RN (Figura 5.9c). Finalmente, después de 7 días se observa un decremento en la densidad celular, también como en la señal RN (Figuras 5.8 fila d y 5.9 d); sin embargo, en algunas depresiones de la superficie del grafito se registraron emisiones (señales de epifluorescencia) de EPS debido a la presencia de la biopelícula (Fig. 5.9 fila d).

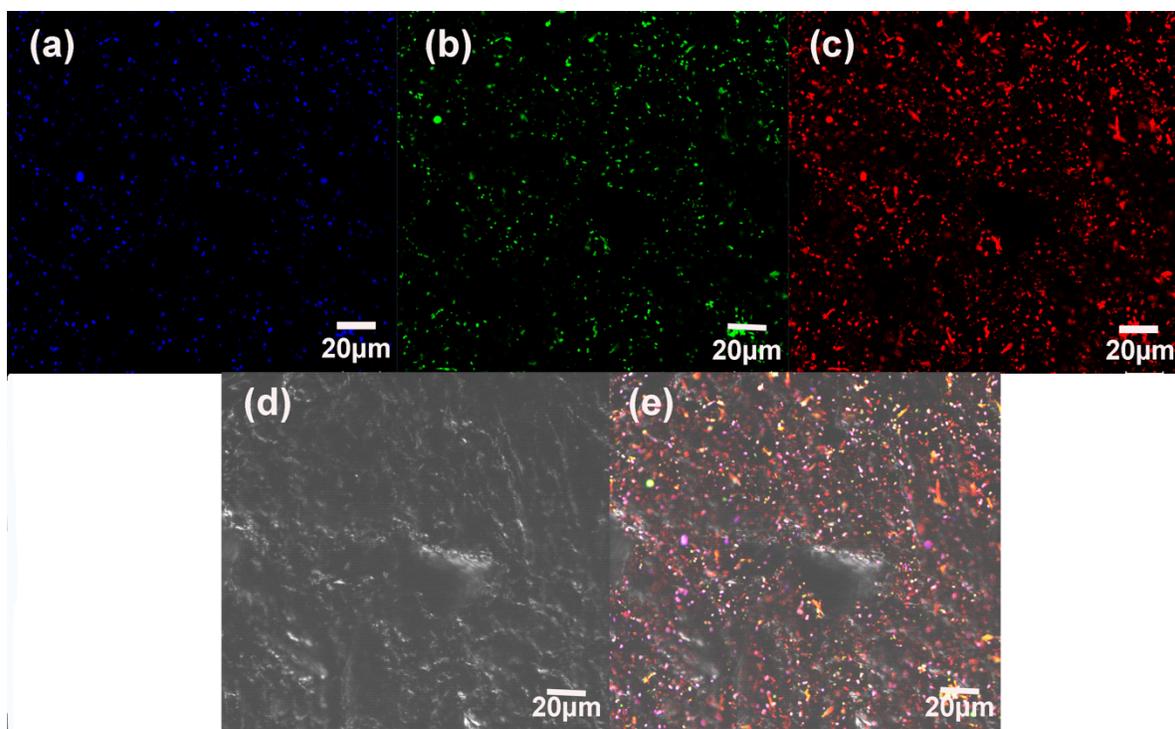


**Figura 5.8** Imágenes de CLSM de biopelículas de *A. thiooxidans* colonizando electrodos de grafito. Las imágenes en fila corresponden a diferentes tiempos de incubación con  $S^0$ : a) 1 b) 3 c) 5 y d) 7 días en medio de cultivo con  $S^0$ . La primer columna corresponde a la superficie del grafito sin ninguna señal emitida (imagen óptica); epifluorescencia de EPS hidrofílicos como exopolisacáridos teñidos con Con-A aparecen en verde (segunda columna), mientras que EPS hidrofóbicos teñidos con RN aparecen en rojo (tercer columna); Se presenta un traslape de las imágenes (ópticas y con epifluorescencia) en la cuarta columna. Imágenes obtenidas a diferentes ampliaciones (como se indica).



**Figura 5.9** Reconstrucción 3-D después de un análisis de CLSM de *A. thiooxidans* colonizando un electrodo de grafito, se muestra un traslape de ambas señales de epifluorescencia (verde para EPS hidrofílicos teñidos con Con-A, y rojo para EPS hidrofóbicos teñidos con NR). Imágenes obtenidas después de a) 1, b) 3, c) 5 y d) 7 días en medio con  $S^0$ .

Además de utilizar las tinciones para detectar exopolisacáridos y compuestos hidrofóbicos, también se realizó una tinción adicional con Naranja de acridina (NA) para detectar la presencia de ADN en las células. En la Figura 5.10 se presenta la tinción del día 3 con los tres fluorocromos utilizados. La Figura 5.10 a) corresponde a la epifluorescencia del NA en color azul. Se observa una gran presencia de células teñidas, mientras que en la Figura 5.10 e) que es el traslape de las tres tinciones, predomina un color morado que está relacionado con el traslape de las señales de epifluorescencia de EPS hidrofóbicos (rojo) y el ADN (azul). Esto coincide con que en el tercer día de incubación se encontró una mayor proporción de EPS hidrofóbicos.

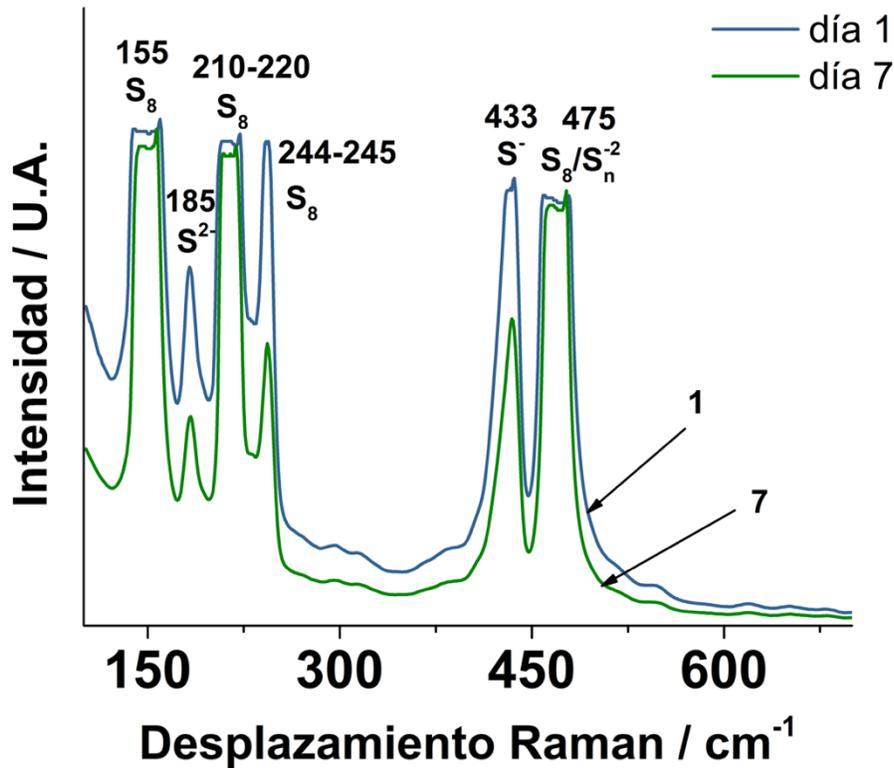


**Figura 5.10** Imágenes de CLSM de biopelículas de *A. thiooxidans* colonizando electrodos de grafito. Todas las imágenes corresponden a un tiempo de incubación de 3 días con  $S^0$ . a) epifluorescencia de ADN, se tiñó con NA (color azul) b) EPS hidrofílicos como exopolisacáridos teñidos con Con-A (color verde) c) EPS hidrofóbicos teñidos con RN (color rojo) d) Superficie grafito e)Traslape de las imágenes anteriores.

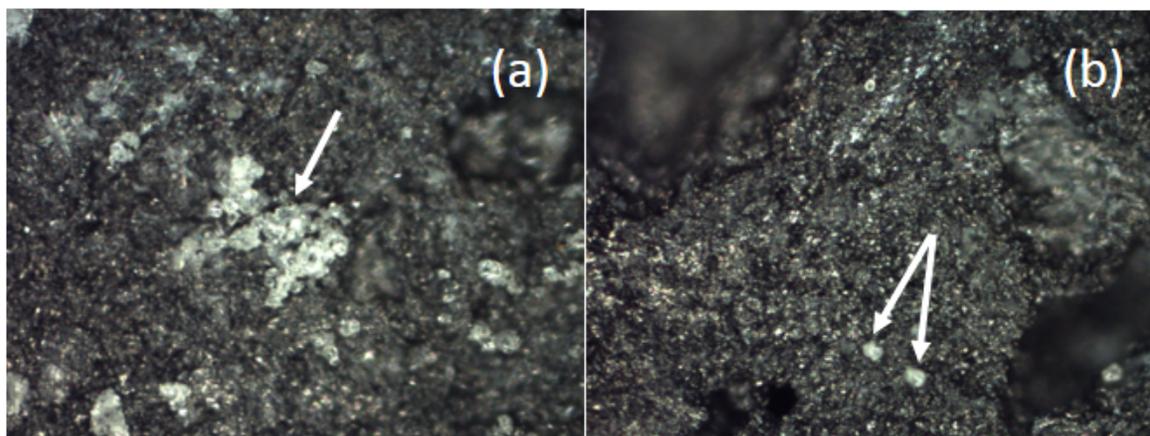
### 5.2.3 Análisis por Espectroscopía Raman

La Figura 5.11 muestra únicamente los espectros obtenidos por Raman los días 1 y 7, esto debido a que los espectros correspondientes a los demás días fueron similares. Las partículas encontradas en la superficie de grafito (Figura 5.12) exhiben picos característicos del azufre elemental (155, 210-220, 244-245, 475  $cm^{-1}$ ) [41,125,127]; también se identificaron picos Raman de polisulfuros (185, 433, 475  $cm^{-1}$ ). Los polisulfuros eran de esperarse debido a la activación del  $S^0$  ( $S_8$ ) a especies lineales reducidas de azufre (RSS), a través de las proteínas de membrana externa de los microorganismos sulfurooxidantes (SOM), como un primer paso de la biooxidación del  $S^0$  [12,39,146]. La principal diferencia entre

ambos espectros es una intensidad menor de los picos del día 7 en comparación con el día 1, esto sugiere que la biooxidación del  $S^0$  incrementa a medida que el tiempo de incubación es más largo.



**Figura 5.11** Evidencia de azufre elemental en grafito mediante análisis Raman. Los espectros corresponden a los días 1 y 7 indicados en la figura. Los picos principales están asociados con las especies químicas correspondientes. Los picos Raman fueron identificados usando la base de datos RRUFF [125] así como otras fuentes. [41,126–129].



**Figura 5.12** Imágenes del bioelectrodo después de 3 días de incubación. Las partículas de azufre adheridas en la superficie del grafito están indicadas con flechas.

Del análisis de la caracterización microscópica de la interfase *ex situ* se concluye lo siguiente:

- El tiempo de formación de una biopelícula en grafito es más lento que en un sulfuro mineral.
- En las imágenes de ESEM de la interfase *ex situ* se observó una biopelícula en el grafito a diferencia de la estrategia *in situ* que se encontraron células dispersas (Figura 5.6).
- La información por CLSM indica cambios en la proporción de EPS hidrofóbicos/exopolisacáridos durante los días de incubación. Hay una mayor cantidad de EPS hidrofóbicos el día 3, mientras que el día 7 hay posiblemente un desprendimiento de células/biopelículas.
- El análisis de Raman demostró  $S^0$  adherido a la superficie de grafito y también polisulfuros como subproductos de la biooxidación.

Después de la caracterización del bioelectrodo mediante técnicas microscópicas, se procedió a caracterizar la interfase del bioelectrodo mediante técnicas electroquímicas con la finalidad de posteriormente correlacionar la información de ambas.

## 5.3 Caracterización electroquímica de la interfase del bioelectrodo *ex situ*

Con la finalidad de caracterizar la interfase sin interferencias y evadir ruido en las mediciones debido al azufre en suspensión, se optó por primero crecer la biopelícula en el grafito (bioelectrodo), como ha sido descrito previamente en la sección 5.2 y; **posteriormente, extraerlo del medio de crecimiento y colocarlo en una celda electroquímica que contiene cultivo fresco, sin  $S^0$  ni células en suspensión.**

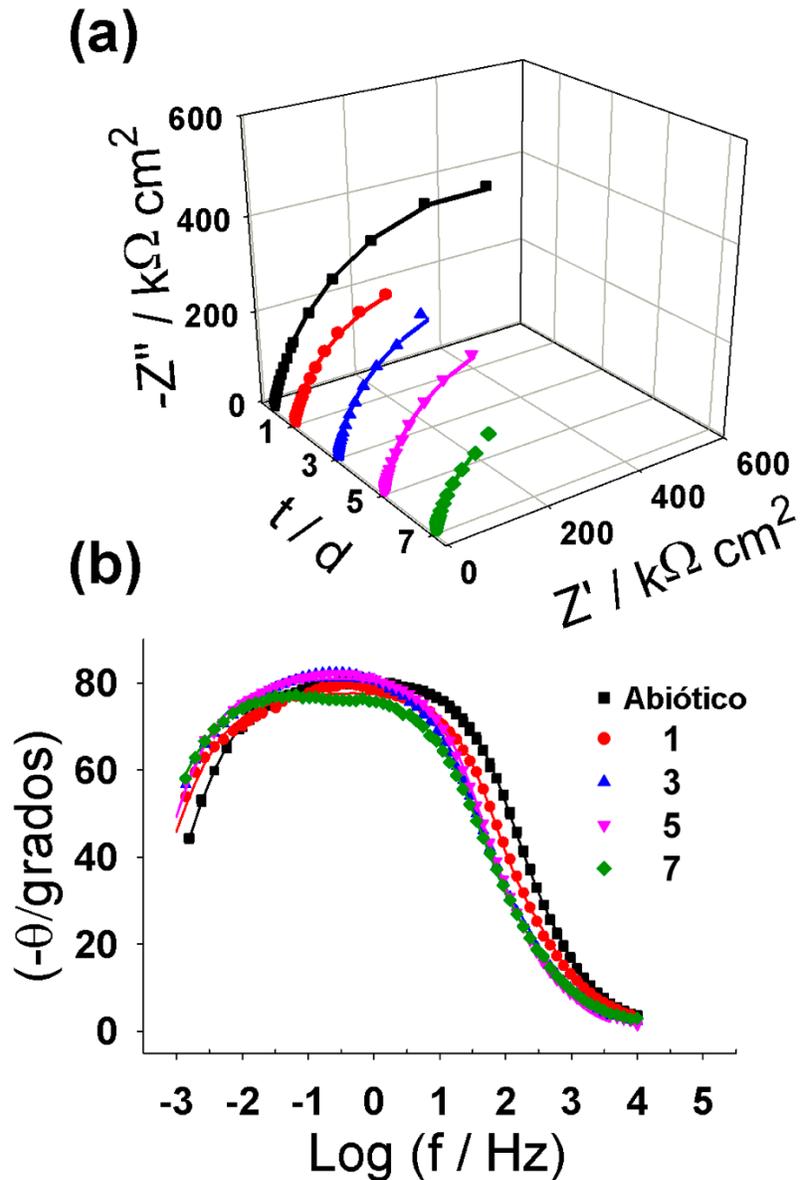
### Condiciones experimentales parte 2: Caracterización electroquímica de la interfase de bioelectrodos *ex situ*

Se realizó un espectro de impedancia a los bioelectrodos tomados del frasco Wheaton durante los días 1, 3, 5 y 7 y fueron colocados en una celda como la descrita en 3.5 con medio de cultivo fresco **sin  $S^0$** . Se realizaron espectros de impedancia los días correspondientes. Al final de cada medición de EIS, se realizó una CV en la misma celda para analizar las propiedades oxidativas-reductoras de la biopelícula, sin y con agitación (100 rpm); iniciando el barrido en dirección positiva a partir del potencial de circuito abierto, con una velocidad de barrido de  $1 \text{ mV s}^{-1}$ . Con el objetivo de evitar el daño a la biopelícula, después de realizar las respectivas pruebas (EIS y CV), el bioelectrodo se discontinuaba y no se regresaba al frasco. Como resultado de esto, cada bioelectrodo es un experimento independiente que sólo corresponde a un día en específico. Los experimentos se realizaron en triplicado.

#### 5.3.1 Resultados de Espectroscopía de Impedancia Electroquímica (EIS)

Cada bioelectrodo con *A. thiooxidans* (con  $S^0$ ) los días 1, 3, 5 y 7 fue colocado en la celda electroquímica con medio de cultivo fresco **sin  $S^0$** . La Figura 5.13 muestra los espectros obtenidos de EIS en el OCP (con una perturbación sinusoidal de  $\pm 10 \text{ mV}$ ). Existen cambios en el espectro de impedancia a partir del día 1, comparado con el control; tanto la componente real e imaginaria decrecientan de forma

significativa, esto significa una modificación en la interfase, posiblemente asociada a compuestos metabólicos o bacterias adheridas de la incubación previa en el frasco. Hasta el séptimo día ambas componentes decrecientan de nuevo, esto también se observa en el diagrama bode ángulo (Figura 5.13 b) donde los espectros muestran un desplazamiento hacia frecuencias más bajas a medida que el tiempo de incubación previo en el frasco, aumenta.

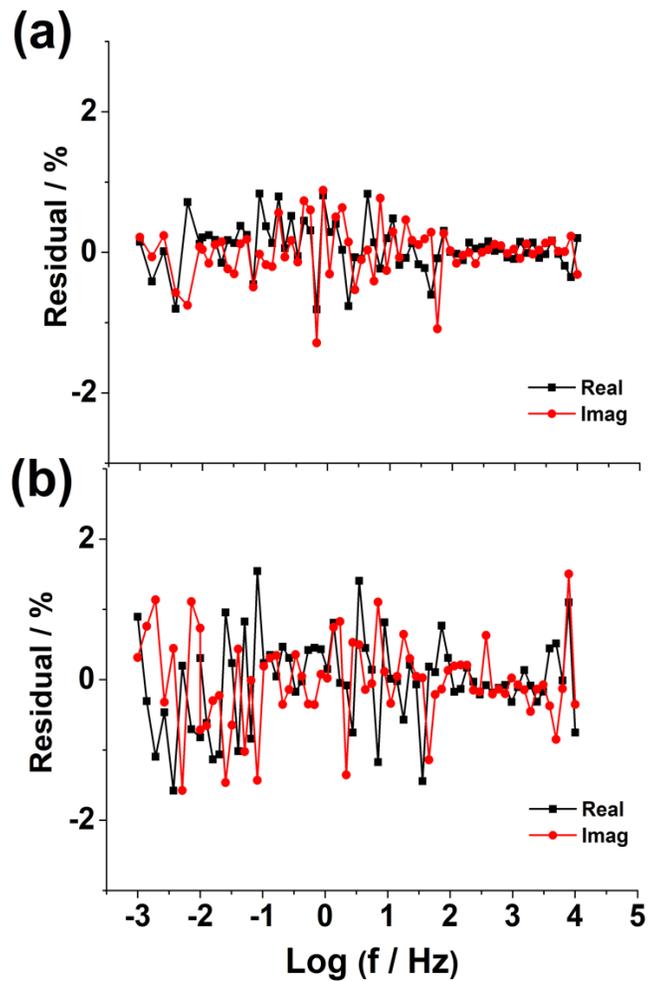


**Figura 5.13** Diagramas de EIS obtenidos en una celda electroquímica con medio de cultivo fresco sin  $S^0$ . Los bioelectrodos con *A. thiooxidans* a diferentes días, como se indica en la figura. Los puntos corresponden a los datos experimentales y la línea continua corresponde al ajuste obtenido mediante el circuito equivalente mostrado en la figura 5.15. a) Diagrama 3D Nyquist. b) Diagrama 2D Bode fase.

Debido a que los microorganismos pueden estar presentes en la superficie del grafito, la validación de los espectros de EIS requieren que los sistemas

electroquímicos mantengan un estado estacionario (lineal, invariante del tiempo y un sistema causal [147]). Considerando estos aspectos, los espectros fueron analizados usando las ecuaciones Kramers-Kronig. En este estudio, el programa Lin-KK Tool [121] fue utilizado para calcular el porcentaje de residuales de los espectros. La Figura 5.14 muestra los porcentajes de los residuales de los espectros de impedancia obtenidos tanto para el control abiótico y el bioelectrodo que corresponde al día 7 de incubación. El porcentaje de residuales de ambas componentes muestra una variación aleatoria y valores entre 1.8 y 0.5% que se ajusta al criterio requerido y confirma el estado estacionario [122,148,149] de la interfase del bioelectrodo y permite los análisis de EIS con un circuito equivalente (*eec*).

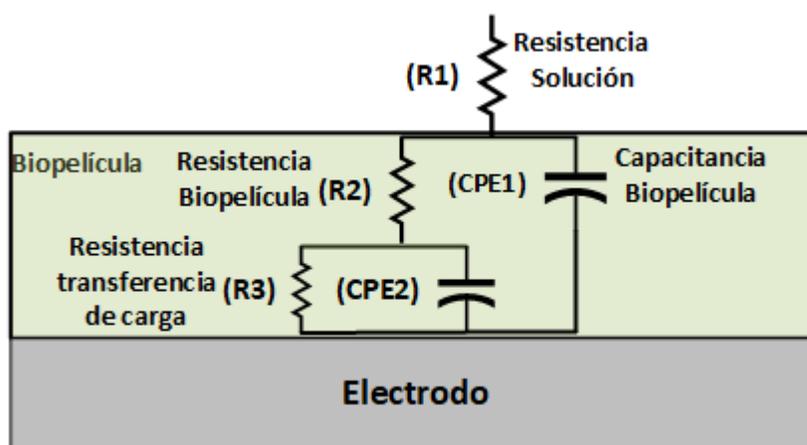
Aunque la técnica de EIS es extensivamente usada en los sistemas bioelectroquímicos como MFCs o caracterización de bioánodos, hay una escasez de información sobre residuales de las ecuaciones de Kramers-Kronig; hasta donde sabemos, sólo Babauta et al. [107] muestran los residuales de una biopelícula de *Geobacter sulfurreducens*, algunos porcentajes alcanzaron valores de un intervalo de -5 a 10%, en un intervalo de frecuencias de 0.01 a 1 Hz; mientras que en el sistema estudiado, se alcanza un estado estacionario hasta 1.5 mHz (0.0015 Hz) con residuales menores al 2% en ambas componentes. Esta diferencia podría estar asociada con la carencia de fuente de energía en el medio de cultivo.



**Figura 5.14** Residuales de las componentes reales e imaginarias evaluadas con el programa Lin KK Tool [121] de los espectros obtenidos en una celda electroquímica con medio fresco sin azufre a) Control Abiótico b) Bioelectrodo tomado del frasco inoculado con *A. thiooxidans* en el día 7.

Para una mejor comprensión del significado físico de los diagramas de EIS y para cuantificar las propiedades de la interfase del bioelectrodo es necesario proponer un circuito equivalente *eec* (Figura 5.15) a partir de los espectros de EIS que representen un comportamiento similar. Debido a la heterogeneidad de la superficie, el elemento de fase constante (CPE) es utilizado en vez de la capacitancia ideal para la simulación y ajuste de los datos (ecuación 3.1). La Figura 5.16 muestra los valores obtenidos de los componentes eléctricos a partir del mejor ajuste de los espectros de EIS con circuito equivalente propuesto. El significado físico de un *eec*

puede ser muy diverso; como primera aproximación se propone  $R_1$  como Resistencia de la solución, como la concentración inicial es lo suficientemente alta ( $10^7$  células/mL) se espera observar algunas bacterias adheridas a la superficie del grafito; por lo tanto  $R_2$  representa la resistencia de la biopelícula y  $CPE_1$  está asociado a la capacitancia de la biopelícula,  $R_3$  está relacionada con la resistencia transferencia de carga; mientras que el significado de  $CPE_2$  es aún controversial en la literatura (se hablará de este parametro más adelante). La calidad del ajuste del espectro de impedancia fue evaluada con valores  $\chi^2$  en el orden de magnitud de  $10^{-4}$  para el control abiótico y  $10^{-3}$  para los bioelectrodos.



**Figura 5.15** Circuito equivalente propuesto para ajustar los diagramas de impedancia experimentales en la interfase del bioelectrodo.; adaptado de [106,107,114].  $R_1$  = resistencia de la solución,  $R_2$  = resistencia de la biopelícula,  $CPE_1$ =capacitancia de la biopelícula representada con un elemento de fase constante,  $R_3$  = resistencia a la transferencia de carga.

La resistencia de la solución del control abiótico ( $R_1$ ) permaneció en  $18.5 \Omega \text{ cm}^2$  mientras que  $R_1$  para el bioelectrodo del día 1 (Figura 5.16 a) muestra un decremento hasta  $14 \Omega \text{ cm}^2$ . Mientras que otros estudios reportan valores constantes en la resistencia de la solución [100,109] aún cuando el electrolito no sea remplazado [107,115] posiblemente por un tiempo de incubación menor. Este decremento en  $R_1$  está asociado a los iones (subproductos de la biooxidación del azufre,  $H^+$  y  $SO_4^{2-}$ ) adheridos al bioelectrodo durante su incubación previa y liberados en el medio de cultivo fresco de la celda electroquímica donde se realizó

el análisis. La resistencia a la solución para tiempos de incubación más largos, permaneció en el mismo intervalo (15 a 12.7  $\Omega \text{ cm}^2$ ). Mientras que  $R_2$  (Figura 5.16 a), comenzó a incrementar desde el día 1 debido a la adherencia y al crecimiento de una biopelícula. A medida que el tiempo de incubación incrementa, la resistencia de la biopelícula alcanza un valor máximo de 38  $\Omega \text{ cm}^2$  en el tercer día y después disminuye los días 5 y 7.

La resistencia de la biopelícula,  $R_2$  incrementa hasta el día 3, debido a que la proporción de compuestos hidrofóbicos/exopolisacáridos en los EPS es mayor (Figura 5.8 fila b) y Figura 5.9b)). Esto puede relacionarse con la naturaleza no conductora de los compuestos hidrofóbicos, como los lípidos [150]. Además los lípidos (Figuras 5.8 y 5.9) pueden incrementar la biooxidación del azufre elemental actuando como un agente humectante [151] y disminuir la tensión interfacial entre el azufre y las células [10,152,153]; también puede inducir la formación de una biopelícula cerca de las partículas de azufre que ya se encuentran adheridas a la superficie del grafito (Figuras 5.8, 5.9 y 5.12).

Mientras tanto, el día 5, la proporción de compuestos hidrofóbicos/exopolisacáridos de EPS decrementa (Figuras 5.8 fila c y 5.9 c); debido a que existen menos compuestos hidrofóbicos en la superficie; por consecuencia, la resistencia de la biopelícula ( $R_2$ ) decrementa (Figura 5.16 a). En el día 7, hay una disminución en ambas señales de fluorescencia (lípidos extracelulares y polisacáridos) sugiriendo una etapa de desorción y que una nueva biopelícula se está formando sobre la superficie del grafito (Figuras 5.8 fila d y 5.9 d).

Adicionalmente, la Resistencia a la transferencia de carga,  $R_3$ , ( Figura 5.16b) es de tres órdenes de magnitud más alta que aquellos valores obtenidos para  $R_1$  y  $R_2$ , también más grande que las resistencias a la transferencia de carga reportadas para sistemas bioelectroquímicos (que operan a cierto potencial, provocando una corriente específica) [100,105,107]. Estos valores de  $R_3$  obtenidos con magnitudes elevadas de transferencia de carga están asociados con las condiciones

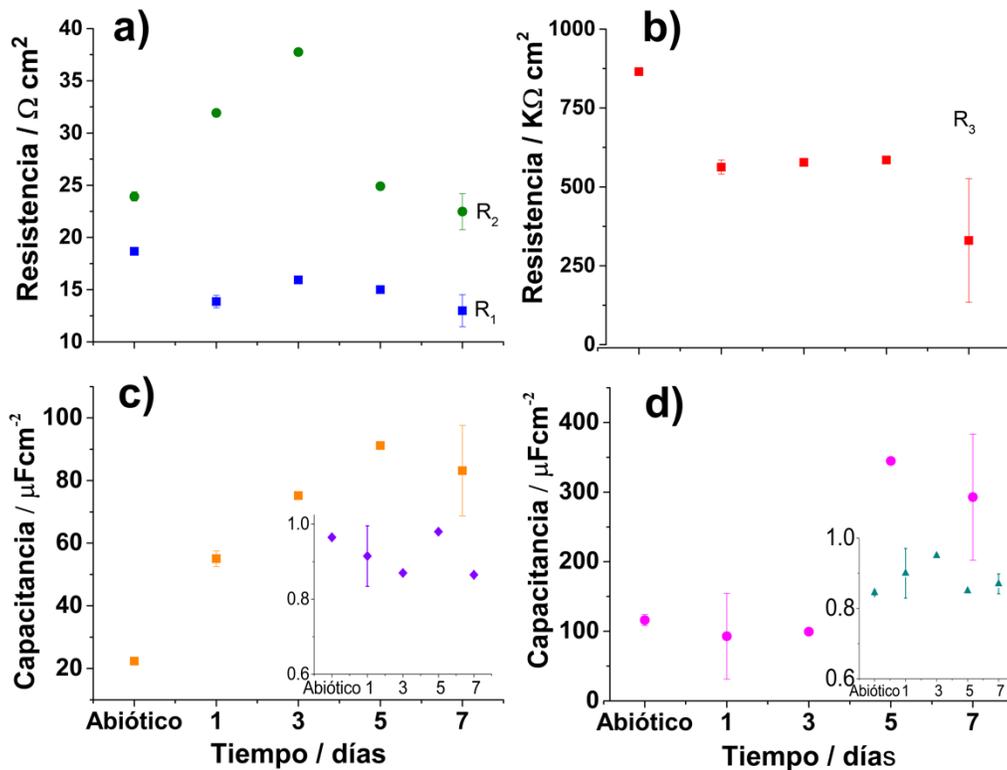
experimentales seleccionadas para el desarrollo de la biopelícula y las mediciones de EIS:

- (i) La biopelícula se desarrolló en ausencia de una perturbación eléctrica (potencial constante o corriente).
- (ii) Los espectros de EIS fueron obtenidos en ausencia de  $S^0$  en el OCP en condiciones aerobias; por lo tanto, las células respiran  $O_2$  y por consecuencia el grafito no es un aceptor de electrones.

El poco decremento en  $R_3$  (Figura 5.16b) puede estar relacionado por la activación del anillo de  $S^0$  (ver sección 2.1.1) hacía especies reducidas de azufre lineales (RSS) que suceden en las proteínas de membrana externa de los microorganismos sulfurooxidantes, como primer paso de la biooxidación del azufre [12,39,146]; sin embargo, más experimentos son necesarios para probar esta hipótesis.

A partir del  $CPE_1$  obtenido del ajuste de *eec*, se estimó la capacitancia con la ecuación 3.1 (sección 3.6). Para el control abiótico se obtuvo un valor de  $20 \mu F cm^{-2}$  que corresponde a la capacitancia asociada a los iones que están en contacto directo con el electrodo, llamada Capacitancia de Helmholtz [154]. La capacitancia del bioelectrodo tiene una tendencia a incrementar hasta  $91 \mu F cm^{-2}$  el día 5 (Figura 5.16c). Varios estudios reportan incremento de capacitancia de electrodos con diferentes tipos de bacteria como *Staphylococcus epidermis*, *Pseudomonas sutzeri* y *Escherichia coli* [110], así como *G. sulfurreducens* [107]. Este incremento en este sistema está directamente relacionado a la adherencia de la bacteria del electrodo y la acumulación de biopolímeros en la superficie de grafito, como proteínas y polisacáridos que tienen un rol crítico en la adhesión [5]. Está reportado que las EPS de *A. thiooxidans* cultivada con  $S^0$  tienen principalmente polisacáridos y ácidos grasos [6]; como ha sido detectado por CLSM (Figuras 5.8 y 5.9); mientras que otros autores han propuesto que las propiedades eléctricas deben de estar principalmente determinadas por un balance de grupos amino y carboxilo de los EPS [5,155]; en este trabajo se propone que estas propiedades están determinadas

por el balance entre los polisacáridos y los compuestos hidrofóbicos (ácidos grasos). De acuerdo a los valores de las constantes dieléctricas de algunos carbohidratos y ácidos grasos (tabla 5.1), los carbohidratos contenidos en el EPS son los responsables del incremento de la capacitancia de la biopelícula. En adición, el potencial zeta de *A. thiooxidans* reportado previamente es  $-0.6$  mV a un pH 2 [5]. El cual se encuentra cerca del punto isoeléctrico, por lo que es de esperarse un pequeño incremento en la capacitancia los primeros 5 días.



**Figura 5.16** Variación de los elementos eléctricos obtenidos para el ajuste con eec de la Figura 10.3 de los espectros de EIS para el control y bioelectrodos a diferentes tiempos de incubación a) Resistencia de la solución ( $R_1$ ) y ( $R_2$ ) de la biopelícula b) Resistencia a la transferencia de carga ( $R_3$ ) c) Capacitancia de la biopelícula y sus respectivos valores de  $n_1$  d)  $C_2$  y sus respectivos valores de  $n_2$ .

**Tabla 5.1** Constantes dieléctricas de algunos compuestos relacionados.

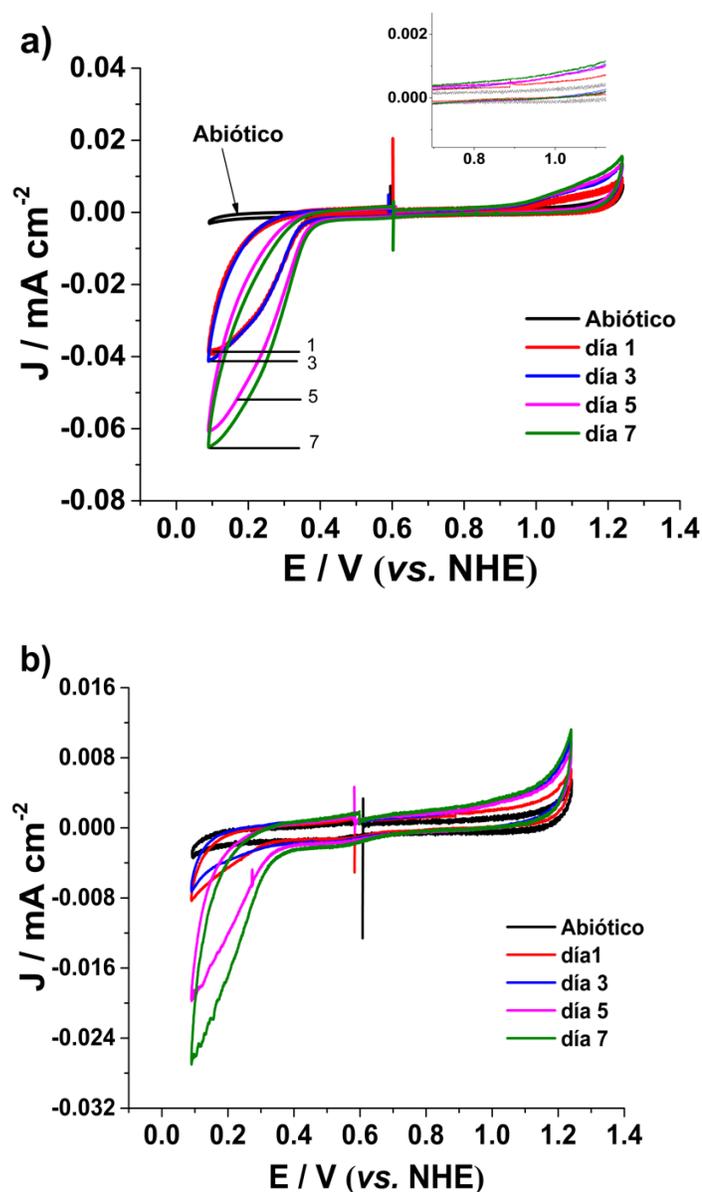
| Compuesto                   | Constante dieléctrica | Temperatura /°C | Referencia |
|-----------------------------|-----------------------|-----------------|------------|
| Agua destilada              | 78                    | 25              | [156]      |
| Glucosa en agua desionizada | 80.1-73.2             | 20-21           | [157]      |
| Glucosa en 0.15M NaCl       | 79.8-71.5             | 20-21           | [157]      |
| D-xilosa                    | 78.3-75.4             | 25              | [158]      |
| Dextrosa 30%                | 70.46                 | 25              | [159]      |
| Sucrosa 10%                 | 76.19                 | 25              | [159]      |
| Sucrosa 30%                 | 70.86                 | 25              | [159]      |
| ácido palmítico             |                       |                 |            |
| $C_{16}H_{32}O_2$           | 2.27                  | 75              | [160]      |
| ácido esteárico             |                       |                 |            |
| $C_{18}H_{36}O_2$           | 2.25                  | 75              | [160]      |
| ácido oléico                |                       |                 |            |
| $C_{18}H_{34}O_2$           | 2.37                  | 25              | [160]      |
| ácido linoleico             | 2.43                  | 25              |            |
| $C_{18}H_{32}O_2$           | 2.41                  | 75              | [160]      |

Para el caso del CPE<sub>2</sub> Babauta et al. (2014) y Huerta-Miranda et. al (2019) [126,127,177] la definieron como la “capacitancia interfacial”. A partir del CPE<sub>2</sub> obtenido del ajuste de eec, también se estimó la capacitancia con la ecuación 3.1; para el control abiótico se obtuvo un valor de 116  $\mu\text{Fcm}^{-2}$ ; la capacitancia del bioelectrodo permanece en estos valores hasta el día 3 y posteriormente incrementa el día 5 y 7 hasta valores de 350-300  $\mu\text{Fcm}^{-2}$  (Figura 5.16d). Los valores mucho

más grandes de esta “capacitancia interfacial” con respecto a la de Helmholtz, cuestiona su significado físico; posiblemente está relacionado con la acumulación de algún producto metabólico.

### **5.3.2. Voltamperometría Cíclica**

Los resultados de la Voltamperometría Cíclica indicaron un bajo incremento de la corriente capacitiva del bioelectrodo comparándolo con el control abiótico (Figura 5.17). Se observa una reducción irreversible que sucede en la zona de potencial de 0.1 a 0.2 V vs. NHE, y la corriente asociada a este proceso incrementa a tiempos de incubación más largos en el frasco, indicando cambios interfaciales. Este comportamiento permanece similar cuando se realiza en agitación (100 rpm; Figura 5.17 b); sin embargo, las magnitudes de corriente son más pequeñas, descartando la reducción de oxígeno. Mientras que el electrodo abiótico no presenta algún proceso rédox visible. Como la CV puede dañar la biopelícula, los bioelectrodos fueron analizados sólo una vez y después fueron descontinuados, como consecuencia, cada bioelectrodo es un experimento independiente que corresponde únicamente a un día en específico.



**Figura 5.17** Voltamperometría cíclica ( $v = 1 \text{ mVs}^{-1}$ ), realizadas en el sistema electroquímico con medio fresco sin  $\text{S}^0$ . El bioelectrodo fue tomado del cultivo de *A. thiooxidans* en los días indicados. El barrido del potencial se inició del OCP en dirección positiva a) sin agitación b) 100 rpm.

Un estudio reciente de *A. thiooxidans* soportado en grafito [1] muestra una corriente capacitiva mayor en el séptimo día, posiblemente por la velocidad de barrido que es muy alta,  $50 \text{ mV s}^{-1}$ , incrementa la contribución de la corriente capacitiva en la corriente total. El proceso irreversible que aparece en el voltamperograma en la zona de potencial entre (0.1 - 0.2 V vs. NHE), y la corriente asociada a esto puede

deberse a la reducción de un intermediario de la biooxidación del azufre embebido en la biopelícula. La activación del  $S^0$  cíclico a linear RSS procede de un ataque nucleofílico de grupos sulfonato (-SH) y glutatión (GSH) que se encuentran en las proteínas de membrana externa de los microorganismos sulfurooxidantes [12]. Entonces el par rédox GSSG/GSH juega un papel importante en la activación del azufre elemental (ver sección 2.1.1) [43]. El potencial de reducción de este par se calculó a pH 1.5 (ver Figura 2.4 y ecuaciones 2.12 y 2.13 ) a partir de otros estudios a pH neutro [44,45]. El valor estimado (0.1 a 0.2 V) coincide con el intervalo de potencial donde se encuentra el pico catódico; posiblemente el proceso de reducción observado en los CVs puede estar asociados a este par rédox. Sin embargo, son necesarios más experimentos para confirmar esta propuesta.

De esta sección se concluye/resumen lo siguiente:

- La hidrofobicidad y porosidad del grafito además de las partículas de  $S^0$  atrapadas en su superficie permitieron la adhesión celular y formación de la biopelícula.
- El porcentaje de residuales mediante las ecuaciones Kramers-Kronig demostró estado estacionario de la interfase del bioelectrodo y permitió los análisis de EIS con un circuito equivalente.

De los parámetros obtenidos del circuito equivalente se resumen:

- $R_1$  está asociado a los iones (subproductos de la biooxidación del azufre,  $H^+$  y  $SO_4^{2-}$ ) para tiempos de incubación más largos, permaneció en el mismo intervalo (15 a 12.7  $\Omega \text{ cm}^2$ ).
- $R_2$ , incrementa hasta el día 3 debido a la biopelícula y a que la proporción de compuestos hidrofóbicos/exopolisacáridos en los EPS es mayor (Figura 5.8 fila b) y Figura 5.9b)). Esto puede relacionarse con la naturaleza no conductora de los compuestos hidrofóbicos, como los lípidos; después disminuye los días 5 y 7, esto también está relacionado con la modificación de la disminución de la proporción de compuestos hidrofóbicos/exopolisacáridos encontrada.

- $R_3$  presenta magnitudes elevadas de transferencia de carga, debido a que los espectros de EIS fueron obtenidos en en el OCP; además *A. thiooxidans* es aerobia y no utiliza el electrodo como aceptor terminal de electrones. El decremento de  $R_3$  está relacionado por la activación del anillo de  $S^0$  (ver sección 2.1.1) hacia especies reducidas de azufre lineales (RSS) que suceden en las proteínas de membrana externa de los microorganismos.
- $C_1$  la capacitancia de la biopelícula tiene una tendencia a incrementar hasta  $91 \mu\text{F cm}^{-2}$  el día 5, la acumulación de biopolímeros como proteínas y polisacáridos pueden ser los responsables. Las propiedades eléctricas deben de estar principalmente determinadas por un balance de grupos amino y carboxilo [5,155].
- De la CV se observa una reducción irreversible que sucede en la zona de potencial de 0.1 a 0.2 V vs. NHE que podría estar relacionado con el par redox GSSG/GSH que juega un papel importante en la activación del azufre elemental

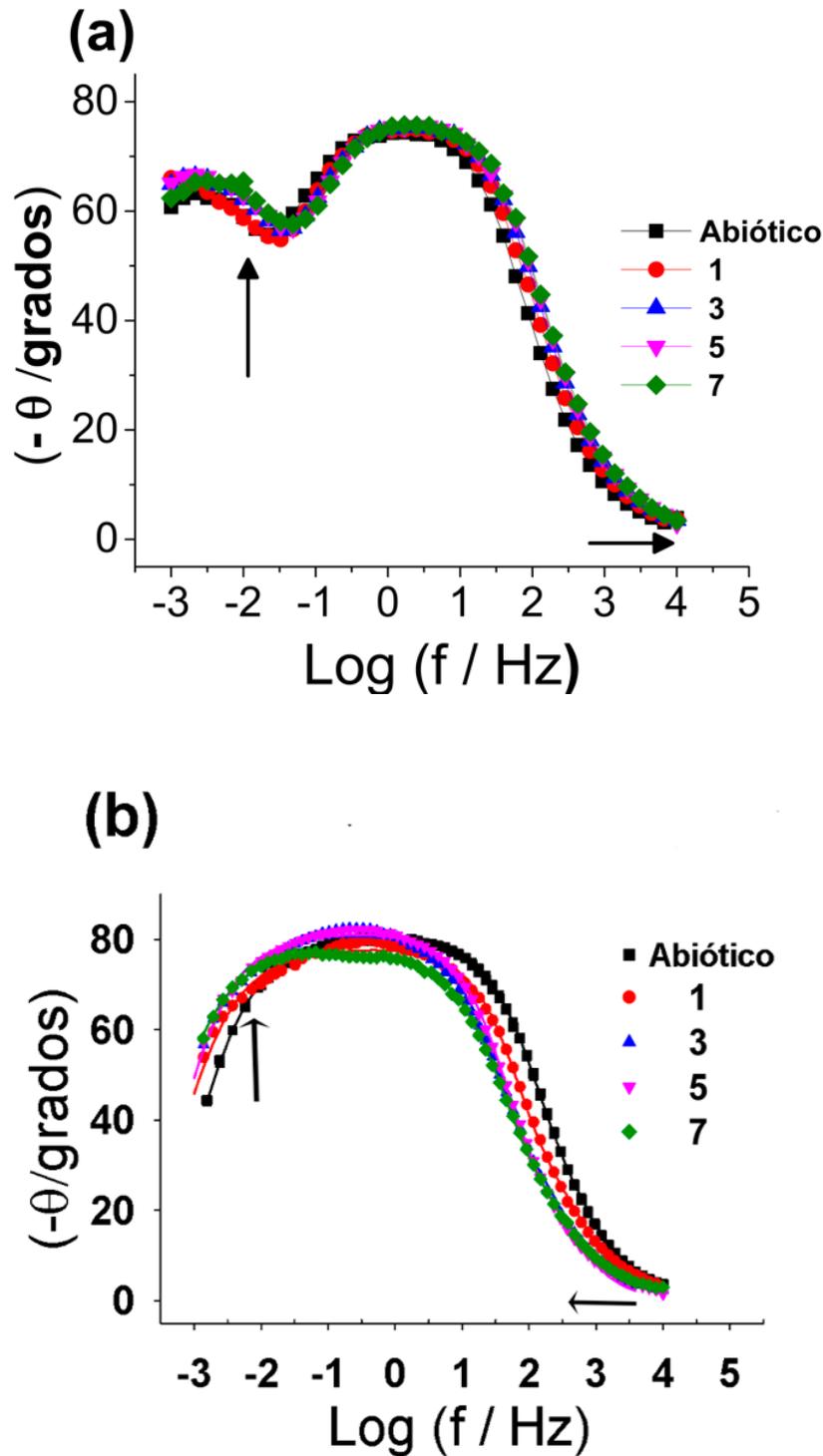
## 5.4 Comparación de las interfases *in situ* y *ex situ*

En la Figura 5.18 se presentan los diagramas de Bode de los bioelectrodos obtenidos *in situ* y *ex situ*, únicamente de los días 1, 3, 5 y 7 y su respectivo control abiótico para ambos. Los espectros muestran dos constantes de tiempo relacionadas con la capacitancia y la porosidad/difusión dentro del material .

Las principales diferencias entre las interfases radican en:

1. En el sistema *ex situ* (Figura 5.18 b) hay un desplazamiento de los espectros hacia frecuencias más bajas, conforme el tiempo de inmersión es mayor, mientras que en el sistema *in situ* (Figura 5.18 a) presenta un comportamiento opuesto desplazándose el espectro hacia frecuencias más altas.
2. En el sistema *ex situ* se observa mejor cómo se modifica el ángulo de fase en la región  $10^{-1}$ - $10^1$  Hz que en el *in situ*.
3. A bajas frecuencias  $10^{-1.5}$ -  $10^{-3}$  Hz aparece un cambio mayor en el sistema *in situ*.

Estas diferencias entre las interfases demuestran el efecto que provocan los productos metabólicos, azufre y las EPS que se encuentran en solución y que se han acumulado durante los 7 días en solución (estrategia *in situ* ), a diferencia de utilizar un medio de cultivo fresco para caracterizar la interfase ( estrategia *ex situ*). Esta situación provoca que los espectros de EIS obtenidos *in situ* para las diferentes réplicas no son reproducibles entre sí, además de que las condiciones para establecer el estado estacionario (análisis de KK) se cumplen en pocos casos, por lo que no fue posible el análisis por *ec* de los espectros obtenidos *in situ*, impidiendo la comparación cuantitativa con los obtenidos en condiciones *ex situ*.



**Figura 5.18** Diagramas de Bode obtenidos de bioelectrodos con *A. thiooxidans* a diferentes tiempos de inmersión a) estrategia *in situ*: celda electroquímica con *A. thiooxidans*, medio de cultivo y  $\text{S}^0$  en suspensión b) estrategia *ex situ*: los bioelectrodos se incubaron en un frasco con *A. thiooxidans* y  $\text{S}^0$ , posteriormente se extrajeron los bioelectrodos y fueron analizados en una celda electroquímica con medio de cultivo fresco sin  $\text{S}^0$ .

## **Capítulo 6 .Conclusiones y perspectivas**

*“Lo esencial es invisible para los ojos “*  
Antoine de Saint-Exupéry

## 6.1 Conclusiones

Generalmente, la formación de biopelículas de *Acidithiobacillus thiooxidans* ha sido estudiada sobre superficies de sulfuros minerales, que además de soporte son la fuente de energía del microorganismo; mientras que estudios relacionados con los fenómenos que suceden en la interfase grafito/bacteria-biopelícula/solución y en condiciones ácidas son muy escasos, y limitados a identificar los procesos redox relacionados con la biopelícula en el electrodo, con la complejidad inherente a la adición de una especie de azufre en la solución como fuente de energía de las bacterias.

Las contribuciones de este trabajo son, por una parte, el establecimiento de las condiciones para formar una biopelícula de *A. thiooxidans* sobre una superficie de grafito, utilizando azufre en suspensión como fuente de energía y en ausencia de perturbación eléctrica. La hidrofobicidad y porosidad del grafito además de las partículas de  $S^0$  atrapadas en su superficie permitieron la adhesión celular y formación de la biopelícula. La otra contribución es la utilizar la EIS como una estrategia para medir el crecimiento y composición de la biopelícula de *A. thiooxidans* sobre el grafito. La información obtenida mediante EIS fue correlacionada con la información de las técnicas microscópicas. Mediante EIS fue posible observar el cambio de las EPS de acuerdo a su tiempo de incubación. Los resultados demuestran que la proporción de compuestos hidrófobos/exopolisacáridos de los EPS puede predecirse mediante el uso de EIS, evitando largos tiempos de preparación de la muestra para su observación por técnicas microscópicas

## 6.2 Perspectivas

Como perspectivas se propone lo siguiente:

1. Estudiar el comportamiento electroquímico del par rédox GSSG/GSH a pHs ácidos para compararlo con el proceso de reducción irreversible obtenido en la caracterización electroquímica de la biopelícula, y de esta manera comprender el proceso de activación del anillo octamérico del azufre.
2. Analizar la composición química y porcentual de las EPS en la biopelícula así como de las EPS y otros productos metabólicos que se acumulan en la solución del medio de cultivo. Esto con la finalidad de correlacionar la información con los fenómenos que se proponen en la interfase *in situ* y *ex situ*.
3. Realizar un estudio de estimulación mediante campo eléctrico de baja intensidad para disminuir el tiempo de biooxidación del  $S^0$ .

## Referencias

- [1] J.S. Fernández-Reyes, J.V. García-Meza, Bioelectrochemical system for the biooxidation of a chalcopyrite concentrate by acidophilic bacteria coupled to energy current generation and cathodic copper recovery, *Biotechnol. Lett.* (2017) 1–11. doi:10.1007/s10529-017-2435-x.
- [2] M.L.K. Sulonen, M.E. Kokko, A.M. Lakaniemi, J.A. Puhakka, Electricity generation from tetrathionate in microbial fuel cells by acidophiles, *J. Hazard. Mater.* 284 (2014) 182–189. doi:10.1016/j.jhazmat.2014.10.045.
- [3] M.L.K. Sulonen, A.M. Lakaniemi, M.E. Kokko, J.A. Puhakka, Long-term stability of bioelectricity generation coupled with tetrathionate disproportionation, *Bioresour. Technol.* 216 (2016) 876–882. doi:10.1016/j.biortech.2016.06.024.
- [4] G. Ni, S. Christel, P. Roman, Z. Lim, M.F.M. Bijmans, M. Dopson, Electricity generation from an inorganic sulfur compound containing mining wastewater by acidophilic microorganisms, *Res. Microbiol.* 167 (2016) 568–575. doi:10.1016/j.resmic.2016.04.010.
- [5] M. Diao, T.A.H. Nguyen, E. Taran, S. Mahler, A. V. Nguyen, Differences in adhesion of *A. thiooxidans* and *A. ferrooxidans* on chalcopyrite as revealed by atomic force microscopy with bacterial probes, *Miner. Eng.* 61 (2014) 9–15. doi:10.1016/j.mineng.2014.03.002.
- [6] K. Harneit, A. Göksel, D. Kock, J.H. Klock, T. Gehrke, W. Sand, Adhesion to metal sulfide surfaces by cells of *Acidithiobacillus ferrooxidans*, *Acidithiobacillus thiooxidans* and *Leptospirillum ferrooxidans*, *Hydrometallurgy.* 83 (2006) 245–254. doi:10.1016/j.hydromet.2006.03.044.
- [7] M. Afzal Ghauri, N. Okibe, D. Barrie Johnson, Attachment of acidophilic bacteria to solid surfaces: The significance of species and strain variations, *Hydrometallurgy.* 85 (2007) 72–80. doi:10.1016/j.hydromet.2006.03.016.
- [8] S. Bellenberg, C.F. Leon-Morales, W. Sand, M. Vera, Visualization of capsular polysaccharide induction in *Acidithiobacillus ferrooxidans*, *Hydrometallurgy.* 129–130 (2012) 82–89. doi:10.1016/j.hydromet.2012.09.002.
- [9] R.H. Lara, D. Valdez-Pérez, A.G. Rodríguez, H.R. Navarro-Contreras, R. Cruz, J. V. García-Meza, Interfacial insights of pyrite colonized by *Acidithiobacillus thiooxidans* cells under acidic conditions, *Hydrometallurgy.* 103 (2010) 35–44. doi:10.1016/j.hydromet.2010.02.014.
- [10] D.M. González, R.H. Lara, K.N. Alvarado, D. Valdez-Pérez, H.R. Navarro-Contreras, R. Cruz, J.V. García-Meza, Evolution of biofilms during the colonization process of pyrite by *Acidithiobacillus thiooxidans*, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 93 (2012) 763–775. doi:10.1007/s00253-011-3465-2.
- [11] R.H. Lara, J.V. García-Meza, I. González, R. Cruz, Influence of the surface speciation on biofilm attachment to chalcopyrite by *Acidithiobacillus thiooxidans*, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 97 (2013) 2711–2724. doi:10.1007/s00253-012-4099-8.

- [12] I. López-Cázares, O. Patrón-Soberano, J. García-Meza, Bioelectrochemical Changes during the Early Stages of Chalcopyrite Interaction with Acidithiobacillus Thiooxidans and Leptospirillum sp., *Minerals*. 7 (2017) 156. doi:10.3390/min7090156.
- [13] H. Ramírez-Aldaba, O.P. Valles, J. Vazquez-Arenas, J.A. Rojas-Contreras, D. Valdez-Pérez, E. Ruiz-Baca, M. Meraz-Rodríguez, F.S. Sosa-Rodríguez, Á.G. Rodríguez, R.H. Lara, Chemical and surface analysis during evolution of arsenopyrite oxidation by Acidithiobacillus thiooxidans in the presence and absence of supplementary arsenic, *Sci. Total Environ.* 566–567 (2016) 1106–1119. doi:10.1016/j.scitotenv.2016.05.143.
- [14] H. Ramírez-Aldaba, J. Vazquez-Arenas, F.S. Sosa-Rodríguez, D. Valdez-Pérez, E. Ruiz-Baca, J.V. García-Meza, G. Trejo-Córdova, R.H. Lara, Assessment of biofilm changes and concentration-depth profiles during arsenopyrite oxidation by Acidithiobacillus thiooxidans, *Environ. Sci. Pollut. Res.* 24 (2017) 20082–20092. doi:10.1007/s11356-017-9619-8.
- [15] B.E. Logan, B. Hamelers, R. Rozendal, U. Schröder, J. Keller, S. Freguia, P. Aelterman, W. Verstraete, K. Rabaey, Microbial Fuel Cells: Methodology and Technology, *Environ. Sci. Technol.* 40 (2006) 1–9. doi:10.1021/es0605016.
- [16] S. Bajracharya, M. Sharma, G. Mohanakrishna, X. Dominguez, D.P.B.T.B. Strik, P.M. Sarma, An overview on emerging bioelectrochemical systems ( BESs ): Technology for sustainable electricity , waste remediation , resource recovery , chemical production and beyond, *Renew. Energy.* 98 (2016) 153–170. doi:10.1016/j.renene.2016.03.002.
- [17] K. Rabaey, R.A. Rozendal, Microbial electrosynthesis - Revisiting the electrical route for microbial production, *Nat. Rev. Microbiol.* 8 (2010) 706–716. doi:10.1038/nrmicro2422.
- [18] K.Y. Cheng, G. Ho, R. Cord-Ruwisch, Novel methanogenic rotatable bioelectrochemical system operated with polarity inversion, *Environ. Sci. Technol.* 45 (2011) 796–802. doi:10.1021/es102482j.
- [19] K.P. Gregoire, J.G. Becker, Design and characterization of a microbial fuel cell for the conversion of a lignocellulosic crop residue to electricity, *Bioresour. Technol.* 119 (2012) 208–215. doi:10.1016/j.biortech.2012.05.075.
- [20] C.T. Wang, F.Y. Liao, K.S. Liu, Electrical analysis of compost solid phase microbial fuel cell, *Int. J. Hydrogen Energy.* 38 (2013) 11124–11130. doi:10.1016/j.ijhydene.2013.02.120.
- [21] S.V. Mohan, K. Chandrasekhar, Solid phase microbial fuel cell (SMFC) for harnessing bioelectricity from composite food waste fermentation: Influence of electrode assembly and buffering capacity, *Bioresour. Technol.* 102 (2011) 7077–7085. doi:10.1016/j.biortech.2011.04.039.
- [22] B. Cercado, L.F. Cházaro-Ruiz, V. Ruiz, I. de J. López-Prieto, G. Buitrón, E. Razo-Flores, Biotic and abiotic characterization of bioanodes formed on oxidized carbon electrodes as a basis to predict their performance, *Biosens. Bioelectron.* 50 (2013) 373–381. doi:10.1016/j.bios.2013.06.051.
- [23] B. Cercado, L.F. Cházaro-Ruiz, G. Trejo-Córdova, G. Buitrón, E. Razo-Flores, Characterization of oxidized carbon foil as a low-cost alternative to carbon felt-based electrodes in bioelectrochemical systems, *J. Appl. Electrochem.* 46 (2016) 217–227. doi:10.1007/s10800-015-0906-0.

- [24] S. Carbajosa, M. Malki, R. Caillard, M.F. Lopez, F.J. Palomares, J.A. Martín-Gago, N. Rodríguez, R. Amils, V.M. Fernández, A.L. De Lacey, Electrochemical growth of *Acidithiobacillus ferrooxidans* on a graphite electrode for obtaining a biocathode for direct electrocatalytic reduction of oxygen, *Biosens. Bioelectron.* 26 (2010) 877–880. doi:10.1016/j.bios.2010.07.037.
- [25] H. Tributsch, J.A. Rojas-Chapana, Metal sulfide semiconductor electrochemical mechanisms induced by bacterial activity, *Electrochim. Acta.* 45 (2000) 4705–4716. doi:10.1016/S0013-4686(00)00623-X.
- [26] G. Levicán, J.A. Ugalde, N. Ehrenfeld, A. Maass, P. Parada, Comparative genomic analysis of carbon and nitrogen assimilation mechanisms in three indigenous bioleaching bacteria: Predictions and validations, *BMC Genomics.* 9 (2008) 1–19. doi:10.1186/1471-2164-9-581.
- [27] M.A. Diaz, I.U. De Ranson, B. Dorta, I.M. Banat, M.L. Blazquez, F. Gonzalez, J.A. Muñoz, A. Ballester, Metal Removal from Contaminated Soils Through Bioleaching with Oxidizing Bacteria and Rhamnolipid Biosurfactants, *Soil Sediment Contam.* 24 (2015) 16–29. doi:10.1080/15320383.2014.907239.
- [28] R. Naresh Kumar, R. Nagendran, Fractionation behavior of heavy metals in soil during bioleaching with *Acidithiobacillus thiooxidans*, *J. Hazard. Mater.* 169 (2009) 1119–1126. doi:10.1016/j.jhazmat.2009.04.069.
- [29] E. Lee, Y. Han, J. Park, J. Hong, R.A. Silva, S. Kim, H. Kim, Bioleaching of arsenic from highly contaminated mine tailings using *Acidithiobacillus thiooxidans*, *J. Environ. Manage.* 147 (2014) 124–131. doi:10.1016/j.jenvman.2014.08.019.
- [30] M.S. Ko, H.S. Park, K.W. Kim, J.U. Lee, The role of *Acidithiobacillus ferrooxidans* and *Acidithiobacillus thiooxidans* in arsenic bioleaching from soil, *Environ. Geochem. Health.* 35 (2013) 727–733. doi:10.1007/s10653-013-9530-2.
- [31] K.Y. Lee, K.W. Kim, Heavy metal removal from shooting range soil by hybrid electrokinetics with bacteria and enhancing agents, *Environ. Sci. Technol.* 44 (2010) 9482–9487. doi:10.1021/es102615a.
- [32] Y. Hong, M. Valix, Bioleaching of electronic waste using acidophilic sulfur oxidising bacteria, *J. Clean. Prod.* 65 (2014) 465–472. doi:10.1016/j.jclepro.2013.08.043.
- [33] H. Brandl, R. Bosshard, M. Wegmann, Computer-munching microbes: Metal leaching from electronic scrap by bacteria and fungi, *Process Metall.* 9 (1999) 569–576. doi:10.1016/S1572-4409(99)80146-1.
- [34] J. Wang, J. Bai, J. Xu, B. Liang, Bioleaching of metals from printed wire boards by *Acidithiobacillus ferrooxidans* and *Acidithiobacillus thiooxidans* and their mixture, *J. Hazard. Mater.* 172 (2009) 1100–1105. doi:10.1016/j.jhazmat.2009.07.102.
- [35] R.L. Starkey, Concerning the physiology of *Thiobacillus Thiooxidans*, an autotrophic bacterium oxidizing sulfur under acid conditions, *J. Ser. New Jersey Agric. Exp. Station.* 189 (1924) 135–163.
- [36] P. Ramírez, N. Guiliani, L. Valenzuela, S. Beard, C.A. Jerez, Differential Protein Expression during Growth of *Acidithiobacillus ferrooxidans* on Ferrous Iron, Sulfur Compounds, or Metal Sulfides, *Appl. Environ. Microbiol.* 70

- (2004) 4491–4498. doi:10.1128/AEM.70.8.4491.
- [37] F.H. Müller, T.M. Bandejas, T. Urich, M. Teixeira, C.M. Gomes, A. Kletzin, Coupling of the pathway of sulphur oxidation to dioxygen reduction: Characterization of a novel membrane-bound thiosulphate:quinone oxidoreductase, *Mol. Microbiol.* 53 (2004) 1147–1160. doi:10.1111/j.1365-2958.2004.04193.x.
- [38] C.G. Friedrich, F. Bardischewsky, D. Rother, A. Quentmeier, J. Fischer, Prokaryotic sulfur oxidation, *Curr. Opin. Microbiol.* 8 (2005) 253–259. doi:10.1016/j.mib.2005.04.005.
- [39] R.A. Bobadilla Fazzini, M.P. Cortés, L. Padilla, D. Maturana, M. Budinich, A. Maass, P. Parada, Stoichiometric modeling of oxidation of reduced inorganic sulfur compounds (Riscs) in *Acidithiobacillus thiooxidans*, *Biotechnol. Bioeng.* 110 (2013) 2242–2251. doi:10.1002/bit.24875.
- [40] H. Yin, X. Zhang, X. Li, Z. He, Y. Liang, X. Guo, Q. Hu, Y. Xiao, J. Cong, L. Ma, J. Niu, X. Liu, Whole-genome sequencing reveals novel insights into sulfur oxidation in the extremophile *Acidithiobacillus thiooxidans*, *BMC Microbiol.* 14 (2014) 1–14. doi:10.1186/1471-2180-14-179.
- [41] B. Meyer, Elemental Sulfur, *Chem. Rev.* 76 (1975) 367–388. doi:10.1021/cr60301a003.
- [42] I. Suzuki, Oxidation of inorganic sulfur compounds: Chemical and enzymatic reactions, *Can. J. Microbiol.* 45 (1999) 97–105. doi:10.1139/w98-223.
- [43] T. Rohwerder, W. Sand, The sulfane sulfur of persulfides is the actual substrate of the sulfur-oxidizing enzymes from *Acidithiobacillus* and *Acidiphilium* spp, *Microbiology.* 149 (2003) 1699–1709. doi:10.1099/mic.0.26212-0.
- [44] F.Q. Schafer, G.R. Buettner, Redox Environment of the Cell As Viewed Through the, *Free Radic. Biol. Med.* 30 (2001) 1191–1212. doi:10.1016/S0891-5849(01)00480-4.
- [45] M. Deponete, Glutathione catalysis and the reaction mechanisms of glutathione-dependent enzymes, *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* 1830 (2013) 3217–3266. doi:10.1016/j.bbagen.2012.09.018.
- [46] H.R. Watling, The bioleaching of sulphide minerals with emphasis on copper sulphides - A review, *Hydrometallurgy.* 84 (2006) 81–108. doi:10.1016/j.hydromet.2006.05.001.
- [47] J. Zhu, Q. Li, W. Jiao, H. Jiang, W. Sand, J. Xia, X. Liu, W. Qin, G. Qiu, Y. Hu, L. Chai, Adhesion forces between cells of *Acidithiobacillus ferrooxidans*, *Acidithiobacillus thiooxidans* or *Leptospirillum ferrooxidans* and chalcopyrite, *Colloids Surfaces B Biointerfaces.* 94 (2012) 95–100. doi:10.1016/j.colsurfb.2012.01.022.
- [48] T. Rohwerder, W. Sand, Mechanisms and biochemical fundamentals of bacterial metal sulfide oxidation, in: *Microb. Process. Met. Sulfides*, 2007: pp. 35–58. doi:10.1007/1-4020-5589-7\_2.
- [49] W. Sand, T. Gehrke, Extracellular polymeric substances mediate bioleaching/biocorrosion via interfacial processes involving iron(III) ions and acidophilic bacteria, *Res. Microbiol.* 157 (2006) 49–56. doi:10.1016/j.resmic.2005.07.012.
- [50] W. Sand, T. Gehrke, Analysis and Function of the EPS from the Strong

- Acidophile *Thiobacillus ferrooxidans*, in: J.W. et al. (eds.) (Ed.), *Microb. Extracell. Polym. Subst. Charact. Funct.*, Springer-Verlag Berlin Heidelberg 1999, 1999: pp. 127–141. doi:10.1007/978-3-642-60147-7\_7.
- [51] C. Michel, C. Bény, F. Delorme, L. Poirier, P. Spolaore, D. Morin, P. D'Hugues, New protocol for the rapid quantification of exopolysaccharides in continuous culture systems of acidophilic bioleaching bacteria, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 82 (2009) 371–378. doi:10.1007/s00253-008-1824-4.
- [52] B.R.L. Weiss, Attachment of Bacteria to Sulphur in Extreme Environments, *J. Gen. Microbiol.* (1973) 501–507.
- [53] R.H. García-Meza, J. Viridiana, Lara-Castro, 7 . Biofilms and mining : Microorganisms behind macro-mining processes, in: A. Lodeiro (Ed.), *Bact. Popul. Basic Appl. Asp. Their Struct. Evol.*, 2010: pp. 117–141.
- [54] A. Aertsen, C.W. Michiels, Stress and how bacteria cope with death and survival, *Crit. Rev. Microbiol.* 30 (2004) 263–273. doi:10.1080/10408410490884757.
- [55] P. Watnick, R. Kolter, Biofilm, *City of Microbes*, *J. Bacteriol.* 182 (2000) 2675–2679.
- [56] J.T. Harrison, J.T. Raymond, L.L.R. Marques, Ceri;Howard, Biofilms: A new understanding of these microbial communities is driving a revolution that may transform the science of microbiology, *Sigma Xi, Sci. Res. Soc.* 93 (2005) 508–515.
- [57] P.S. Stewart, GUEST COMMENTARIES-Diffusion in Biofilms, *J. Bacteriol.* 185 (2003) 1485–1491. doi:10.1128/JB.185.5.1485.
- [58] M.E. Davey, G.A. O'toole, Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics., *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 64 (2000) 847–867. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11104821><http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC99016>.
- [59] K. Lewis, MINIREVIEW Riddle of Biofilm Resistance, *Antimicrob. Agents Chemother.* 45 (2001) 999–1007. doi:10.1128/AAC.45.4.999.
- [60] M.G. Dodds, K.J. Grobe, P.S. Stewart, Modeling biofilm antimicrobial resistance, *Biotechnol. Bioeng.* 68 (2000) 456–465. doi:10.1002/(SICI)1097-0290(20000520)68:4<456::AID-BIT11>3.0.CO;2-Z.
- [61] J.R. Lawrence, G.M. Wolfaardt, D.R. Korber, Determination of Diffusion Coefficients in Biofilms by Confocal Laser Microscopy, *Appl. Environ. Microbiol.* 60 (1994) 1166–1173.
- [62] L. Hall-Stoodley, J.W. Costerton, P. Stoodley, Bacterial biofilms: From the natural environment to infectious diseases, *Nat. Rev. Microbiol.* 2 (2004) 95–108. doi:10.1038/nrmicro821.
- [63] B.D. Kanematsu H, ed., *Biofilm and Materials Science*, Springer, 2015. doi:10.1007/s13398-014-0173-7.2.
- [64] H.-C. Flemming, J. Wingender, The biofilm matrix, *Nat. Rev. Microbiol.* 8 (2010) 623–633. doi:10.1080/0892701031000072190.
- [65] Y.Q. Li, D.S. Wan, S.S. Huang, F.F. Leng, L. Yan, Y.Q. Ni, H.Y. Li, Type IV Pili of *Acidithiobacillus ferrooxidans* are necessary for sliding, twitching motility, and adherence, *Curr. Microbiol.* 60 (2010) 17–24. doi:10.1007/s00284-009-9494-8.
- [66] X. Dominguez-Benetton, Biocomplexity and Bioelectrochemical Influence of

- Biofilms in Carbon Steel Deterioration A Transmission Line Approach for Electrochemical Impedance Analysis, Instituto Mexicano del Petróleo, 2007.
- [67] H.A. Videla, Manual of biocorrosion, Lewis Publishers, New York, 1996.
- [68] J.C. Bennett, H. Tributsch, Bacterial leaching patterns on pyrite crystal surfaces, *J. Bacteriol.* 134 (1978) 310–317.
- [69] Y. Konishi, S. Asai, H. Katoh, Bacterial dissolution of pyrite by *Thiobacillus ferrooxidans*, *Bioprocess Eng.* 5 (1990) 231–237. doi:10.1007/BF00376230.
- [70] A. Mahmoud, P. Cézac, A.F.A. Hoadley, F. Contamine, P. D'Hugues, A review of sulfide minerals microbially assisted leaching in stirred tank reactors, *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 119 (2017) 118–146. doi:10.1016/j.ibiod.2016.09.015.
- [71] M. Rodríguez-Leiva, H. Tributsch, Morphology of bacterial leaching patterns by *Thiobacillus ferrooxidans* on synthetic pyrite, *Arch Microbiol.* 149 (1988) 401–405.
- [72] L.E. Murr, V.K. Berry, Direct Observations of Selective Attachment of bacteria on Low-Grade Sulfide Ores and Other Mineral Surfaces, *Hydrometallurgy.* 2 (1976) 11–24.
- [73] P. Hiltunen, A. Vuorinen, O.H. Tuovinen, Bacterial Pyrite Oxidation: Release of Iron and Scanning Electron Microscopic Observations, *Hydrometallurgy.* 7 (1981) 147–157.
- [74] T. Gehrke, J. Telegdi, D. Thierry, W. Sand, Importance of Extracellular Polymeric Substances from *Thiobacillus ferrooxidans* for Bioleaching Importance of Extracellular Polymeric Substances from *Thiobacillus ferrooxidans* for Bioleaching, *Appl. Environ. Microbiol.* 64 (1998) 2743–2747.
- [75] J. Wingender, T.R. Neu, H.-C. Flemming, What are Bacterial Extracellular Polymeric Substances?, in: J. Wingender (Ed.), *Microb. Extracell. Polym. Subst.*, Springer-Verlag Berlin Heidelberg 1999, 1999: pp. 1–19. doi:10.1007/978-3-642-60147-7\_1.
- [76] L. Su, W. Jia, C. Hou, Y. Lei, Microbial biosensors: A review, *Biosens. Bioelectron.* 26 (2011) 1788–1799. doi:10.1016/j.bios.2010.09.005.
- [77] E. Blázquez, D. Gabriel, J.A. Baeza, A. Guisasola, Evaluation of key parameters on simultaneous sulfate reduction and sulfide oxidation in an autotrophic biocathode, *Water Res.* 123 (2017) 301–310. doi:10.1016/j.watres.2017.06.050.
- [78] Y. Gong, A. Ebrahim, A.M. Feist, M. Embree, T. Zhang, D. Lovley, K. Zengler, Sulfide-Driven Microbial Electrosynthesis, *Environ. Sci. Technol.* 47 (2013) 568–573. doi:dx.doi.org/10.1021/es303837j.
- [79] D.E. Holmes, D.R. Bond, D.R. Lovley, Electron Transfer by *Desulfobulbus propionicus* to Fe ( III ) and Graphite Electrodes, *Appl. Environ. Microbiol.* 70 (2004) 1234. doi:10.1128/AEM.70.2.1234.
- [80] T. Zhang, T.S. Bain, M.A. Barlett, S.A. Dar, O.L. Snoeyenbos-West, K.P. Nevin, D.R. Lovley, Sulfur oxidation to sulfate coupled with electron transfer to electrodes by *Desulfuromonas* strain TZ1, *Microbiol. (United Kingdom).* 160 (2014) 123–129. doi:10.1099/mic.0.069930-0.
- [81] F. Zhao, N. Rahunen, J.R. Varcoe, A. Chandra, C. Avignone-Rossa, A.E. Thumser, R.C.T. Slade, Activated carbon cloth as anode for sulfate removal in a microbial fuel cell, *Environ. Sci. Technol.* 42 (2008) 4971–4976. doi:10.1021/es8003766.

- [82] K. Rabaey, K. Van De Sompel, L. Maignien, N. Boon, P. Aelterman, P. Clauwaert, L. De Schamphelaire, H.T. Pham, J. Vermeulen, M. Verhaege, P. Lens, W. Verstraete, Microbial fuel cells for sulfide removal, *Environ. Sci. Technol.* 40 (2006) 5218–5224. doi:10.1021/es060382u.
- [83] F. Zhao, N. Rahunen, J.R. Varcoe, A.J. Roberts, C. Avignone-Rossa, A.E. Thumser, R.C.T. Slade, Factors affecting the performance of microbial fuel cells for sulfur pollutants removal, *Biosens. Bioelectron.* 24 (2009) 1931–1936. doi:10.1016/j.bios.2008.09.030.
- [84] M.L.K. Sulonen, A.M. Lakaniemi, M.E. Kokko, J.A. Puhakka, The effect of anode potential on bioelectrochemical and electrochemical tetrathionate degradation, *Bioresour. Technol.* 226 (2017) 173–180. doi:10.1016/j.biortech.2016.12.023.
- [85] M.L.K. Sulonen, M.E. Kokko, A.M. Lakaniemi, J.A. Puhakka, Simultaneous removal of tetrathionate and copper from simulated acidic mining water in bioelectrochemical and electrochemical systems, *Hydrometallurgy.* 176 (2018) 129–138. doi:10.1016/j.hydromet.2018.01.023.
- [86] J. Klahre, Monitoring of biofouling in papermill process waters, *Water Res.* 34 (2000) 3657–3665. doi:10.1016/s0043-1354(00)00094-4.
- [87] A. Tamachkiarow, H.C. Flemming, On-line monitoring of biofilm formation in a brewery water pipeline system with a fibre optical device, *Water Sci. Technol.* 47 (2003) 19–24.
- [88] H. V As, P. Lens, Use of H-1-NMR to Study Transport Processes in Porous Biosystems, *J.Ind.Microbiol.Biotechnol.* 26 (2001) 43–52.
- [89] P. Tinham, T.R. Bott, Biofouling assessment using an infrared monitor, *Water Sci. Technol.* 47 (2003) 39–43.
- [90] J.W.N.M. Kappelhof, H.S. Vrouwenvelder, M. Schaap, J.C. Kruithof, D. Van Der Kooij, J.C. Schippers, An in situ biofouling monitor for membrane systems, *Water Sci. Technol. Water Supply.* 3 (2003) 205–210.
- [91] J. Kang, T. Kim, Y. Tak, J.H. Lee, J. Yoon, Cyclic voltammetry for monitoring bacterial attachment and biofilm formation, *J. Ind. Eng. Chem.* 18 (2012) 800–807. doi:10.1016/j.jiec.2011.10.002.
- [92] A. Bressel, J.W. Schultze, W. Khan, G.M. Wolfaardt, H.P. Rohns, R. Irmscher, M.J. Schöning, High resolution gravimetric, optical and electrochemical investigations of microbial biofilm formation in aqueous systems, *Electrochim. Acta.* 48 (2003) 3363–3372. doi:10.1016/S0013-4686(03)00406-7.
- [93] H. Richter, K.P. Nevin, H. Jia, D.A. Lowy, D.R. Lovley, L.M. Tender, Cyclic voltammetry of biofilms of wild type and mutant *Geobacter sulfurreducens* on fuel cell anodes indicates possible roles of OmcB, OmcZ, type IV pili, and protons in extracellular electron transfer, *Energy Environ. Sci.* 2 (2009) 506–516. doi:10.1039/b816647a.
- [94] J. Babauta, R. Renslowa, Z. Lewandowskib, H. Beyenala, Electrochemically active biofilms: facts and fiction. A review Jerome, *Biofouling.* 28 (2012) 789–812. doi:10.1080/08927014.2012.710324.Electrochemically.
- [95] M.S. Gião, M.I. Montenegro, M.J. Vieira, Monitoring biofilm formation by using cyclic voltammetry - Effect of the experimental conditions on biofilm removal and activity, *Water Sci. Technol.* 47 (2003) 51–56.
- [96] M.J. Vieira, I.A. Pinho, S. Gião, M.I. Montenegro, The Use of Cyclic

- Voltammetry to Detect Biofilms formed by *Pseudomonas fluorescens* on Platinum Electrodes, *Biofouling*. 19 (2003) 215–222. doi:10.1080/08927010310000100800.
- [97] T. Matsunaga, T. Nakajima, Electrochemical classification of gram-negative and gram-positive bacteria, *Appl. Environ. Microbiol.* 50 (1985) 238–242.
- [98] H.S. Park, B.H. Kim, H.S. Kim, H.J. Kim, G.T. Kim, M. Kim, I.S. Chang, Y.K. Park, H.I. Chang, A novel electrochemically active and Fe(III)-reducing bacterium phylogenetically related to *Clostridium butyricum* isolated from a microbial fuel cell, *Anaerobe*. 7 (2001) 297–306. doi:10.1006/anae.2001.0399.
- [99] A. Jain, X. Zhang, G. Pastorella, J.O. Connolly, N. Barry, R. Woolley, S. Krishnamurthy, E. Marsili, Electron transfer mechanism in *Shewanella loihica* PV-4 biofilms formed at graphite electrode, *Bioelectrochemistry*. 87 (2012) 28–32. doi:10.1016/j.bioelechem.2011.12.012.
- [100] X. Zhang, M. Epifanio, E. Marsili, Electrochemical characteristics of *Shewanella loihica* on carbon nanotubes-modified graphite surfaces, *Electrochim. Acta*. 102 (2013) 252–258. doi:10.1016/j.electacta.2013.04.039.
- [101] E. Marsili, J.B. Rollefson, D.B. Baron, R.M. Hozalski, D.R. Bond, Microbial biofilm voltammetry: Direct electrochemical characterization of catalytic electrode-attached biofilms, *Appl. Environ. Microbiol.* 74 (2008) 7329–7337. doi:10.1128/AEM.00177-08.
- [102] S. Becerro, J. Paredes, M. Mujika, E. Pérez Lorenzo, S. Arana, Electrochemical Real-Time Analysis of Bacterial Biofilm Adhesion and Development by Means of Thin-Film Biosensors, *IEEE Sens. J.* 16 (2016) 1856–1864. doi:10.1109/JSEN.2015.2504495.
- [103] A.A. Carmona-Martinez, F. Harnisch, L.A. Fitzgerald, J.C. Biffinger, B.R. Ringeisen, U. Schröder, Cyclic voltammetric analysis of the electron transfer of *Shewanella oneidensis* MR-1 and nanofilament and cytochrome knock-out mutants, *Bioelectrochemistry*. 81 (2011) 74–80. doi:10.1016/j.bioelechem.2011.02.006.
- [104] W.S. Repository, L.A. Meitl, C.M. Eggleston, P.J.S. Colberg, N. Khare, C.L. Reardon, L. Shi, Electrochemical interaction of *Shewanella oneidensis* MR-1 and its outer membrane cytochromes OmcA and MtrC with hematite electrodes, *Geochim. Cosmochim. Acta*. 73 (2009) 5292–5307. doi:10.1016/j.gca.2009.06.021.
- [105] S. Bayouth, A. Othmane, L. Ponsonnet, H. Ben Ouada, Electrical detection and characterization of bacterial adhesion using electrochemical impedance spectroscopy-based flow chamber, *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.* 318 (2008) 291–300. doi:10.1016/j.colsurfa.2008.01.005.
- [106] J.T. Babauta, H. Beyenal, Use of a small overpotential approximation to analyze *Geobacter sulfurreducens* biofilm impedance, *J. Power Sources*. 356 (2017) 549–555. doi:10.1016/j.jpowsour.2017.03.021.
- [107] J.T. Babauta, H. Beyenal, Mass transfer studies of *Geobacter sulfurreducens* biofilms on rotating disk electrodes, *Biotechnol. Bioeng.* 111 (2014) 285–294. doi:10.1002/bit.25105.
- [108] D. Bevilacqua, I. Díez-Perez, C.S. Fugivara, F. Sanz, A. V. Benedetti, O. Garcia, Oxidative dissolution of chalcopyrite by *Acidithiobacillus ferrooxidans* analyzed by electrochemical impedance spectroscopy and atomic force

- microscopy, *Bioelectrochemistry*. 64 (2004) 79–84. doi:10.1016/j.bioelechem.2004.01.006.
- [109] T. Kim, J. Kang, J.H. Lee, J. Yoon, Influence of attached bacteria and biofilm on double-layer capacitance during biofilm monitoring by electrochemical impedance spectroscopy, *Water Res.* 45 (2011) 4615–4622. doi:10.1016/j.watres.2011.06.010.
- [110] H. Ben-Yoav, A. Freeman, M. Sternheim, Y. Shacham-Diamand, An electrochemical impedance model for integrated bacterial biofilms, *Electrochim. Acta*. 56 (2011) 7780–7786. doi:10.1016/j.electacta.2010.12.025.
- [111] L. Yang, C. Ruan, Y. Li, Detection of viable *Salmonella typhimurium* by impedance measurement of electrode capacitance and medium resistance, *Biosens. Bioelectron.* 19 (2003) 495–502. doi:10.1016/S0956-5663(03)00229-X.
- [112] E.J. Pérez, R. Cabrera-Sierra, I. González, F. Ramírez-Vives, Influence of *Desulfovibrio* sp. biofilm on SAE 1018 carbon steel corrosion in synthetic marine medium, *Corros. Sci.* 49 (2007) 3580–3597. doi:10.1016/j.corsci.2007.03.034.
- [113] A.K. Lee, M.G. Buehler, D.K. Newman, Influence of a dual-species biofilm on the corrosion of mild steel, *Corros. Sci.* 48 (2006) 165–178. doi:10.1016/j.corsci.2004.11.013.
- [114] G.A. Huerta-Miranda, A.I. Arroyo-Escoto, X. Burgos, K. Juárez, M. Miranda-Hernández, Influence of the major pilA transcriptional regulator in electrochemical responses of *Geobacter sulfurreducens* PilR-deficient mutant biofilm formed on FTO electrodes, *Bioelectrochemistry*. 127 (2019) 145–153. doi:10.1016/j.bioelechem.2019.02.006.
- [115] S. Srikanth, E. Marsili, M.C. Flickinger, D.R. Bond, Electrochemical characterization of *Geobacter sulfurreducens* cells immobilized on graphite paper electrodes, *Biotechnol. Bioeng.* 99 (2008) 1065–1073. doi:10.1002/bit.21671.
- [116] A.J. Bard, L.R. Faulkner, *Electrochemical Methods Fundamentals and Applications*, second, John Wiley & Sons, INC, 2001. doi:10.1016/B978-0-08-098353-0.00003-8.
- [117] D. Bevilacqua, H.A. Acciari, F.A. Arena, A. V. Benedetti, C.S. Fugivara, G.T. Filho, O.G. Júnior, Utilization of electrochemical impedance spectroscopy for monitoring bornite ( $\text{Cu}_5\text{FeS}_4$ ) oxidation by *Acidithiobacillus ferrooxidans*, *Miner. Eng.* 22 (2009) 254–262. doi:10.1016/j.mineng.2008.07.010.
- [118] R.A. Illsley, S.G. Roscoe, E.D. Jackson, T.J. Hughes, An electrochemical investigation of the fouling of a model surface by a coliform bacterium, *Biofouling*. 11 (1997) 191–199. doi:10.1080/08927019709378330.
- [119] G.J. Brug, A.L.G. van den Eeden, M. Sluyters-Rehbach, J.H. Sluyters, The analysis of electrode impedances complicated by the presence of a constant phase element, *J. Electroanal. Chem.* 176 (1984) 275–295. doi:10.1016/S0022-0728(84)80324-1.
- [120] M.E. Orazem, B. Tribollet, *Electrochemical Impedance Spectroscopy*, John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ, USA, 2017. doi:10.1002/9781119363682.
- [121] M. Schönleber, D. Klotz, E. Ivers-Tiffée, A Method for Improving the

- Robustness of linear Kramers-Kronig Validity Tests, *Electrochim. Acta.* 131 (2014) 20–27. doi:10.1016/j.electacta.2014.01.034.
- [122] B.A. Boukamp, A Linear Kronig-Kramers Transform Test for Immittance Data Validation, *J. Electrochem. Soc.* 142 (1995) 1885. doi:10.1149/1.2044210.
- [123] <http://www.iwe.kit.edu/Lin-KK.php>, (n.d.).
- [124] L.C. María Irene, Estudio bioelectroquímico y espectroscópico durante el proceso de biooxidación de calcopirita mediada por microorganismos sulfuro y ferroxidantes, Universidad Autónoma de San Luis Potosí, 2016.
- [125] B. Lafuente, R.T. Downs, H. Yang, N. Stone, The power of databases: The RRUFF project, *Highlights Mineral. Crystallogr.* (2015) 1–29. doi:10.1515/9783110417104-003.
- [126] J.R. Mycroft, G.M. Bancroft, N.S. McIntyre, J.W. Lorimer, I.R. Hill, Detection of sulfur and polysulfides on electrochemically oxidized pyrite surfaces by x-ray photoelectron spectroscopy and Raman spectroscopy, *J. Electroanal. Chem. Interfacial Electrochem.* 292 (1990) 139–152. doi:10.1016/0022-0728(90)87332-E.
- [127] G. V. Bondarenko, Y.E. Gorbaty, In situ Raman spectroscopic study of sulfur-saturated water at 1000 bar between 200 and 500°C, *Geochim. Cosmochim. Acta.* 61 (1997) 1413–1420. doi:10.1016/S0016-7037(97)00020-3.
- [128] V. Toniazzo, C. Mustin, J.M. Portal, B. Humbert, R. Benoit, R. Erre, Elemental sulfur at the pyrite surfaces: speciation and quantification, *Appl. Surf. Sci.* 143 (1999) 229–237. doi:10.1016/S0169-4332(98)00918-0.
- [129] P.R. Holmes, F.K. Crundwell, Polysulfides do not cause passivation: Results from the dissolution of pyrite and implications for other sulfide minerals, *Hydrometallurgy.* 139 (2013) 101–110. doi:10.1016/j.hydromet.2013.07.006.
- [130] A. Echeverría-Vega, C. Demergasso, Copper resistance, motility and the mineral dissolution behavior were assessed as novel factors involved in bacterial adhesion in bioleaching, *Hydrometallurgy.* 157 (2015) 107–115. doi:10.1016/j.hydromet.2015.07.018.
- [131] Y. Konishi, S. Asai, N. Yoshida, Growth kinetics of *Thiobacillus thiooxidans* on the surface of elemental sulfur, *Appl. Environ. Microbiol.* 61 (1995) 3617–3622.
- [132] Lizama Hector, I. Suzuki, Kinetics of sulfur and pyrite oxidation by *Thiobacillus thiooxidans*. Competitive inhibition by increasing concentrations of cells, *Can. J. Microbiol.* 37 (1991) 182–187. <http://dx.doi.org/10.1021/cm071412a>.
- [133] R. Gourdon, N. Funtowicz, Kinetic model of elemental sulfur oxidation by *Thiobacillus thiooxidans* in batch slurry reactors: Effects of surface characteristics and suspended solid concentration, *Bioprocess Eng.* 18 (1998) 241–249. doi:10.1007/s004490050437.
- [134] D.W. Shiers, D.E. Ralph, H.R. Watling, Batch culture of *Acidithiobacillus caldus* on tetrathionate, *Biochem. Eng. J.* 54 (2011) 185–191. doi:10.1016/j.bej.2011.02.018.
- [135] A.P. Wood, D.P. Kelly, P.R. Norris, Autotrophic growth of four *Sulfolobus* strains on the tetrathionate and effect of organic nutrients, *Arch Microbiol.* 2 (1987) 382–389.
- [136] W. Hazeu, W. Bijleveld, J.T.C. Grotenhuis, E. Kakes, Kinetics and energetics of reduced sulfur oxidation by chemostat cultures of *Thiobacillus ferrooxidans*,

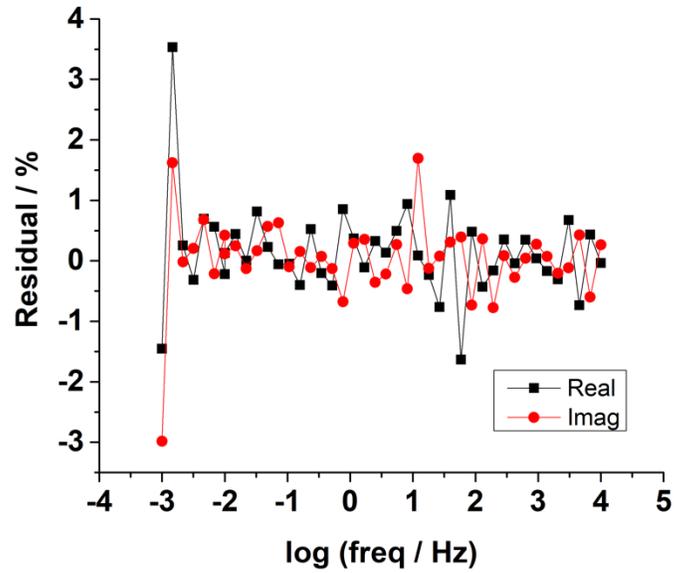
- Antonie Van Leeuwenhoek. 52 (1986) 507–518. doi:10.1007/bf00423411.
- [137] G.K. Druschel, R.J. Hamers, G.W. Luther, J.F. Banfield, Kinetics and mechanism of trithionate and tetrathionate oxidation at low pH by hydroxyl radicals, *Aquat. Geochemistry*. 9 (2003) 145–164. doi:10.1023/B:AQUA.0000019495.91752.d7.
- [138] G.K. Druschel, R.J. Hamers, G.W. Luther, J.F. Banfield, Kinetics and mechanism of polythionate oxidation to sulfate at low pH by O<sub>2</sub> and Fe<sup>3+</sup>, *Geochim. Cosmochim. Acta*. 67 (2003) 4457–4469. doi:0016-7037/03.
- [139] C. a. Thorogood, G.G. Wildgoose, A. Crossley, R.M.J. Jacobs, J.H. Jones, R.G. Compton, Differentiating between ortho- and para -Quinone Surface Groups on Graphite, Glassy Carbon, and Carbon Nanotubes Using Organic and Inorganic Voltammetric and X-ray Photoelectron Spectroscopy Labels, *Chem. Mater*. 19 (2007) 4964–4974. doi:10.1021/cm071412a.
- [140] B. Hirschorn, M.E. Orazem, On the Sensitivity of the Kramers–Kronig Relations to Nonlinear Effects in Impedance Measurements, *J. Electrochem. Soc.* 156 (2009) C345. doi:10.1149/1.3190160.
- [141] V.F. Lvovich, *Impedance Spectroscopy Applications to Electrochemical and Dielectric Phenomena*, John Wiley & Sons, INC, New Jersey, 2012.
- [142] E. Bouleghlimat, P.R. Davies, R.J. Davies, R. Howarth, J. Kulhavy, D.J. Morgan, The effect of acid treatment on the surface chemistry and topography of graphite, *Carbon N. Y.* 61 (2013) 124–133. doi:10.1016/j.carbon.2013.04.076.
- [143] P. Vilímová, J. Tokarský, P. Peikertová, K. Mamulová Kutlákova, T. Plaček, Influence of thermal and UV treatment on the polypropylene/graphite composite, *Polym. Test.* 52 (2016) 46–53. doi:10.1016/j.polymertesting.2016.03.025.
- [144] R.S. Renslow, J.T. Babauta, P.D. Majors, H. Beyenal, Diffusion in biofilms respiring on electrodes, *Energy Environ. Sci.* 6 (2013) 595–607. doi:10.1039/C2EE23394K.
- [145] R. Quatrini, L. V. Escudero, A. Moya-Beltrán, P.A. Galleguillos, F. Issotta, M. Acosta, J.P. Cárdenas, H. Nuñez, K. Salinas, D.S. Holmes, C. Demergasso, Draft genome sequence of *Acidithiobacillus thiooxidans* CLST isolated from the acidic hypersaline Gorbea salt flat in northern Chile, *Stand. Genomic Sci.* 12 (2017) 1–8. doi:10.1186/s40793-017-0305-8.
- [146] S. Mangold, J. Valdés, D.S. Holmes, M. Dopson, Sulfur metabolism in the extreme acidophile *Acidithiobacillus caldus*, *Front. Microbiol.* 2 (2011) 1–18. doi:10.3389/fmicb.2011.00017.
- [147] J. Illig, M. Ender, T. Chrobak, J.P. Schmidt, D. Klotz, E. Ivers-Tiffée, Separation of Charge Transfer and Contact Resistance in LiFePO<sub>4</sub>-Cathodes by Impedance Modeling, *J. Electrochem. Soc.* 159 (2012) A952–A960. doi:10.1149/2.030207jes.
- [148] J.M. Esteban, M.E. Orazem, On the Application of the Kramers-Kronig Relations to Evaluate the Consistency of Electrochemical Impedance Data, *J. Electrochem. Soc.* 138 (1991) 67. doi:10.1149/1.2085580.
- [149] M. Agarwal, Pankaj, Orazem, Application of Measurement Models to Impedance Spectroscopy, *J. Electrochem. Soc.* 142 (1995) 4159. doi:10.1149/1.2048479.

- [150] M. Heim, G. Cevc, R. Guckenberger, H.F. Knapp, W. Wiegräbe, Lateral electrical conductivity of mica-supported lipid bilayer membranes measured by scanning tunneling microscopy, *Biophys. J.* 69 (1995) 489–497. doi:10.1016/S0006-3495(95)79922-2.
- [151] W.W. Schaeffer, W.I., Holbert, P.E., Umbreit, Attachment of Thiobacillus Thiooxidans to Sulfur Crystals, 5 (1962) 5–8.
- [152] P. Devasia, K.A. Natarajan, International Journal of Mineral Processing Adhesion of Acidithiobacillus ferrooxidans to mineral surfaces, *Int. J. Miner. Process.* 94 (2010) 135–139. doi:10.1016/j.minpro.2010.02.003.
- [153] J. V. García-Meza, J.J. Fernández, R.H. Lara, I. González, Changes in biofilm structure during the colonization of chalcopyrite by Acidithiobacillus thiooxidans, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 97 (2013) 6065–6075. doi:10.1007/s00253-012-4420-6.
- [154] M.A. Pope, I.A. Aksay, Four-Fold Increase in the Intrinsic Capacitance of Graphene through Functionalization and Lattice Disorder, *J. Phys. Chem. C.* 119 (2015) 20369–20378. doi:10.1021/acs.jpcc.5b07521.
- [155] P.K. Sharma, A. Das, K. Hanumantha Rao, K.S.E. Forssberg, Surface characterization of Acidithiobacillus ferrooxidans cells grown under different conditions, *Hydrometallurgy.* 71 (2003) 285–292. doi:10.1016/S0304-386X(03)00167-1.
- [156] C.G. Malmberg, A.A. Maryott, Dielectric constant of water from 0 to 100 C, *J. Res. Natl. Bur. Stand.* (1934). 56 (1956) 1. doi:10.6028/jres.056.001.
- [157] G. Yoon, Dielectric properties of glucose in bulk aqueous solutions: Influence of electrode polarization and modeling, *Biosens. Bioelectron.* 26 (2011) 2347–2353. doi:10.1016/j.bios.2010.10.009.
- [158] H. Shekaari, Y. Mansoori, A. Kazempour, Conductance behavior of ionic liquids, 1-alkyl-3-methylimidazolium bromide, in aqueous d-xylose solutions, *Electrochim. Acta.* 67 (2012) 104–108. doi:10.1016/j.electacta.2012.02.006.
- [159] C.G. Malmberg, A.A. Maryott, Dielectric constants of aqueous solutions of dextrose and sucrose, *J. Res. Natl. Bur. Stand.* (1934). 45 (1950) 299. doi:10.6028/jres.045.030.
- [160] H. Lizhi, K. Toyoda, I. Ihara, Dielectric properties of edible oils and fatty acids as a function of frequency, temperature, moisture and composition, *J. Food Eng.* 88 (2008) 151–158. doi:10.1016/j.jfoodeng.2007.12.035.
- [161] R. Antaño López, Aplicación de un algoritmo basado en un “modelo de medición” para la detección de errores en las medidas experimentales de impedancia, Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa, 1997. <http://tesiuami.izt.uam.mx/uam/asp/am/presentatesis.php?recno=665&docs=UAM0665.PDF>.
- [162] R. López, Relaciones de estructura-reactividad de materiales anódicos en la electrocombustión de derivados fenólicos por radicales hidroxilo en medio acuoso, Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa, 2017.
- [163] S. Techniques, Chapter 2 Techniques for Oral Microbiology, in: *Atlas Oral Microbiol.*, Elsevier Inc., 2015: pp. 15–40. doi:10.1016/B978-0-12-802234-4.00002-1.
- [164] A. López-Macay, J. Fernández-Torres, A. Zepeda, Principios y aplicaciones de la microscopia láser confocal en la investigación biomédica, *Investig. En*

Discapac. 5 (2016) 156–164. [www.medigraphic.org.mx](http://www.medigraphic.org.mx).

# Anexos

## Anexo 1 Datos experimentales adicionales

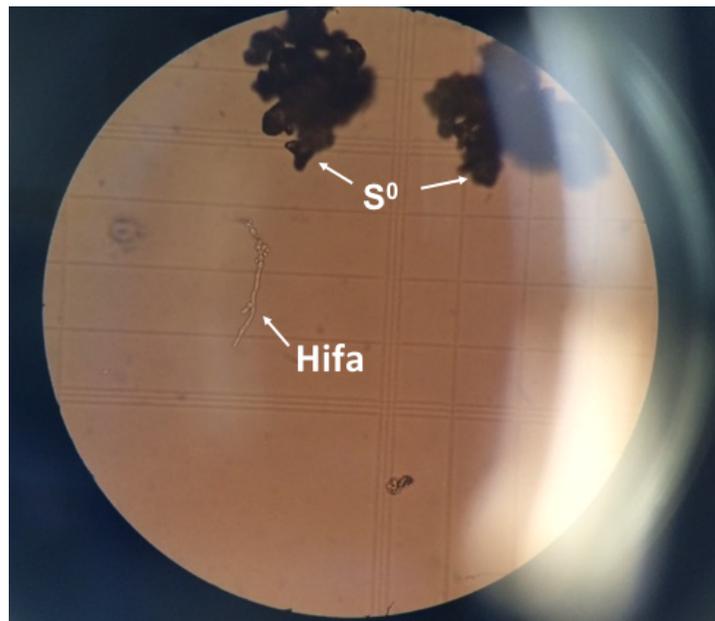


**Figura A1.1** Residuales de las componentes reales e imaginarias evaluadas con el programa Lin KK Tool [121] del espectro obtenido del día 7 de la estrategia *in situ* en una celda electroquímica con *A. thiooxidans* y medio de cultivo con  $S^0$  en suspensión.

## Anexo 2 Recomendaciones e influencia de contaminación del sistema y su respuesta electroquímica

### Ajuste de pH

Un aspecto importante a considerar cuando se cultiva *A. thiooxidans*, es que es necesario que el potenciómetro que se utilice para el ajuste de pH del medio de cultivo se encuentre perfectamente limpio y esterilizado con alcohol etílico. El uso de un potenciómetro de uso común del laboratorio del W-003, contaminó los cultivos con hongos (Figura A2.1), se recomienda un potenciómetro de uso exclusivo que se limpie cada mes con soluciones especializadas para remover residuos de proteínas, compuestos inorgánicos entre otros.

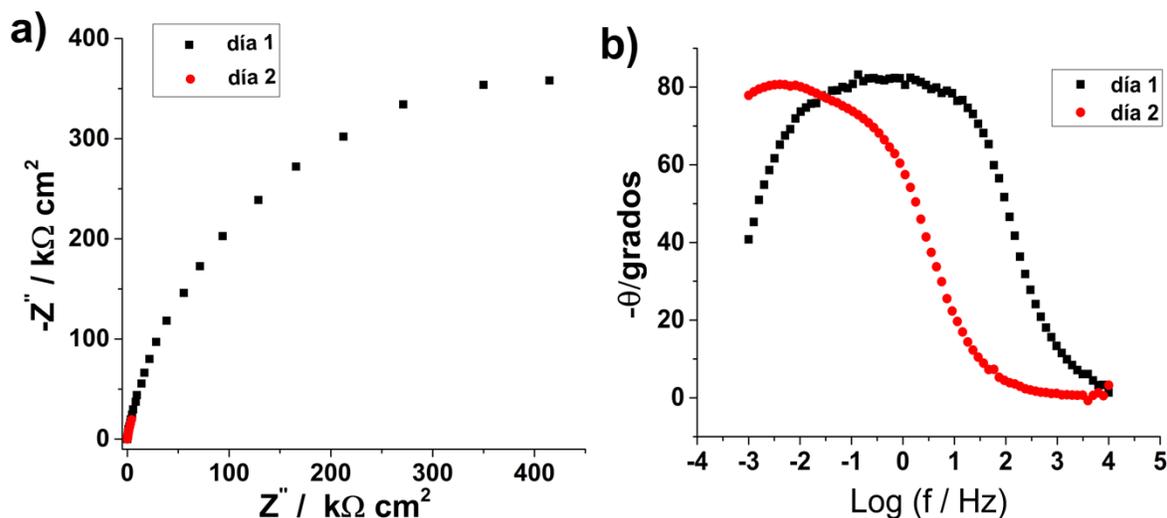


**Figura A2.1** Imagen obtenida con el microscopio óptico durante un conteo de número de células con la cámara de Neubauer a 40x.

### Contaminación durante la medición de EIS

En experimentos posteriores realizados con el sistema abiótico, se observó que el primer día se tenía un comportamiento típico con valores de magnitudes de impedancia esperados, sin cambios importantes en la interfase. No obstante, en uno de los experimentos permaneció una burbuja de aire en el capilar de Luggin (cerca de la punta de platino) que desapareció el día 2, esto coincide con el espectro obtenido ese día donde se observó una disminución muy importante en ambas componentes del espectro y un desplazamiento

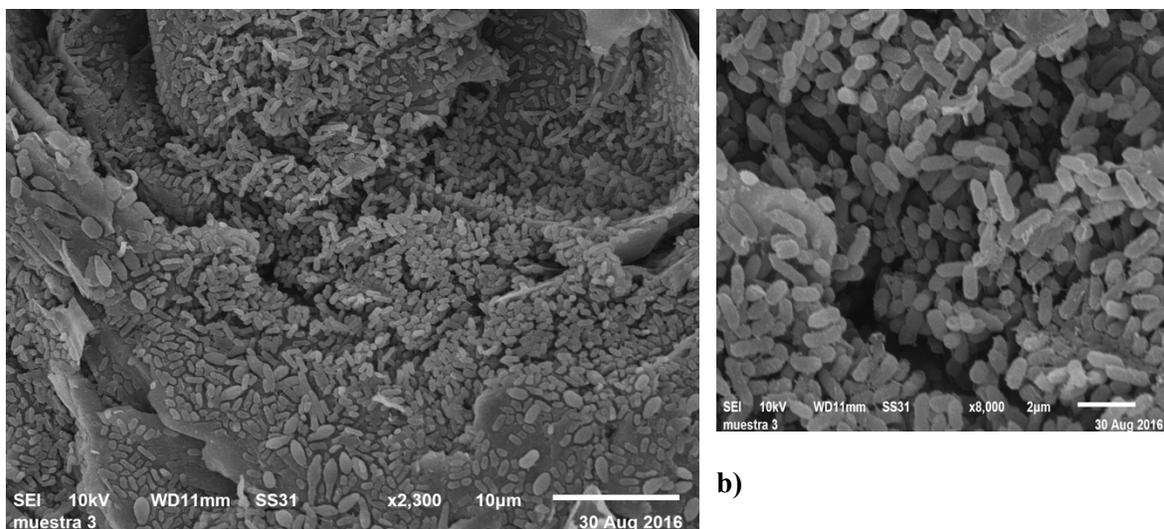
de las frecuencias (Figura A2.2), demostrando que la solución saturada (KCl) que contiene el capilar de Luggin debe ser esterilizada en autoclave y después someter por una hora el electrodo de referencia a la luz UV para evitar problemas de contaminación y falsos positivos. Esto demuestra la alta sensibilidad que tiene la técnica electroquímica para detectar cambios en la interfase.



**Figura A2.2.** Espectros de EIS de un sistema abiótico en medio de cultivo sin  $S^0$  en el día 1 y 2, posible contaminación del sistema durante el día 2. a) Diagrama de Nyquist b) Diagrama de Bode ángulo.

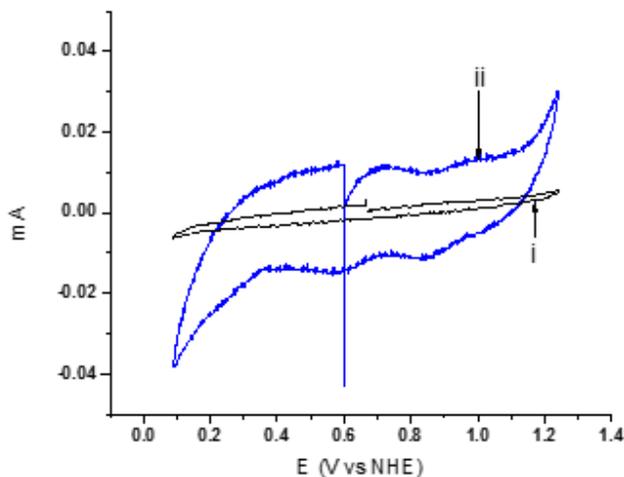
## Contaminación en el sistema *in situ*

En una ocasión se contaminó el sistema con hongos/levaduras (Figura A2.3) y la respuesta de la CV fue completamente distinta, se observan dos procesos de oxidación y reducción (Figura A2.4) que inicialmente fueron adjudicados a *A. thiooxidans*, no obstante, cuando se tuvo que reemplazar la cepa, no fue posible obtener la misma respuesta electroquímica. Por lo que se necesita tener cuidado suficiente al momento de armar la celda y esterilizar todo lo que se vaya a utilizar. Dado que en el laboratorio del W003 se trabajan con diversas aguas residuales y residuos mineros, de preferencia, se sugiere esterilizar todo el material dos veces en autoclave, mismo caso para desactivar una celda que ya fue utilizada.



a)

**Figura A2.3.** Imágenes obtenidas por ESEM de la biopelícula de *A. thiooxidans* formada sobre la superficie de grafito (cara rugosa) al séptimo día de haber inoculado la celda electroquímica. a) Imagen panorámica del bioelectrodo b) ampliación de hueco completamente colonizado.

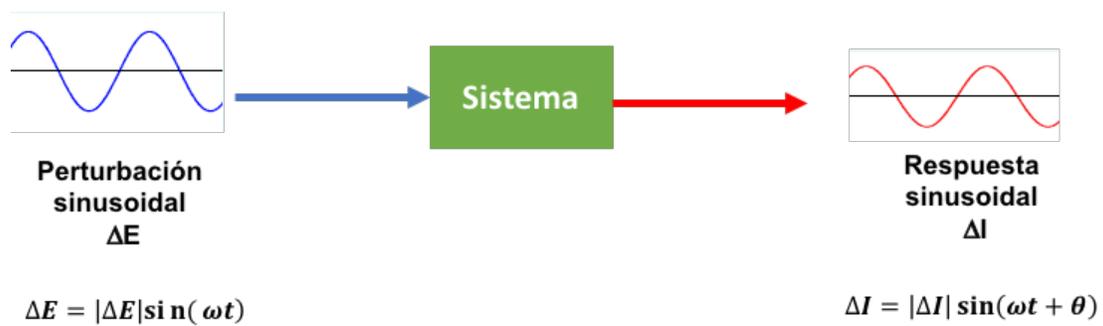


**Figura A2.4** Caracterización de la biopelícula. a) Voltamperometría Cíclica ( $v = 1 \text{ mVs}^{-1}$ ) obtenida en el electrodo en medio de cultivo con  $\text{S}^0$  al finalizar el séptimo día. i) En ausencia (sistema abiótico) y ii) presencia (sistema biótico) de *A. thiooxidans* (bioelectrodo contaminado) El barrido de potencial se inicia desde el OCP en dirección positiva.

## Anexo 3 Espectroscopía de impedancia electroquímica (EIS)

La técnica de espectroscopía de Impedancia Electroquímica (EIS), puede ser utilizada para calcular no sólo la resistencia global, sino descomponerla en la resistencia de la solución y en otros elementos eléctricos [161,162]. La impedancia electroquímica, requiere que el electrodo de trabajo, se encuentre en estado estacionario. Consiste en aplicar una perturbación eléctrica sinusoidal (ya sea de corriente o potencial), de baja amplitud al electrodo de trabajo, y medir la respuesta (corriente, si se perturbó con un potencial y potencial, si se perturbó aplicando una corriente) ver Figura A3.1. Esta perturbación sinusoidal se aplica secuencialmente a varias frecuencias (de ahí el nombre de espectroscopia), iniciando con frecuencias altas (típicamente  $10^5$  Hz), hasta frecuencias del orden de  $10^{-3}$  Hz. A cada frecuencia de perturbación se obtienen dos parámetros que caracterizan la respuesta del sistema: la magnitud de la impedancia ( $|Z|$ ), y el ángulo de fase ( $\theta$ ). La respuesta (medida como  $|Z|$  y  $\theta$ ) del sistema electrodo-solución depende de la velocidad inherente de los procesos en el sistema, y se manifiestan según la frecuencia de la perturbación. A frecuencias altas se manifiestan los procesos más rápidos y a bajas frecuencias los más lentos. El análisis de los espectros de impedancia, permite cuantificar diversos parámetros con significado físico de los sistemas, siendo el único inconveniente de la técnica, que la asociación de dichos parámetros, con la respuesta de impedancia, requiere de auxilio de otras técnicas químicas cualitativas, cuantitativas y espectroscópicas. Una de las formas de abordar el análisis de los espectros de impedancia, consiste en asociar los procesos que ocurren en la celda electroquímica, con elementos simples de circuitos eléctricos: resistencias, capacitores, inductores, elementos de Warbug y elementos de fase constante (capacitores no ideales). Con ellos se propone un circuito eléctrico equivalente al sistema real, y se ajustan los datos de impedancia experimentales a dichos elementos eléctricos.

$$Z(\omega) = \frac{\Delta E}{\Delta I} \quad (\text{A3.1})$$



**Figura A3.1** EIS: aplicación de un potencial sinusoidal a una determinada frecuencia y su respuesta como corriente.

## **Anexo 4 Microscopía confocal láser de barrido (CLSM)**

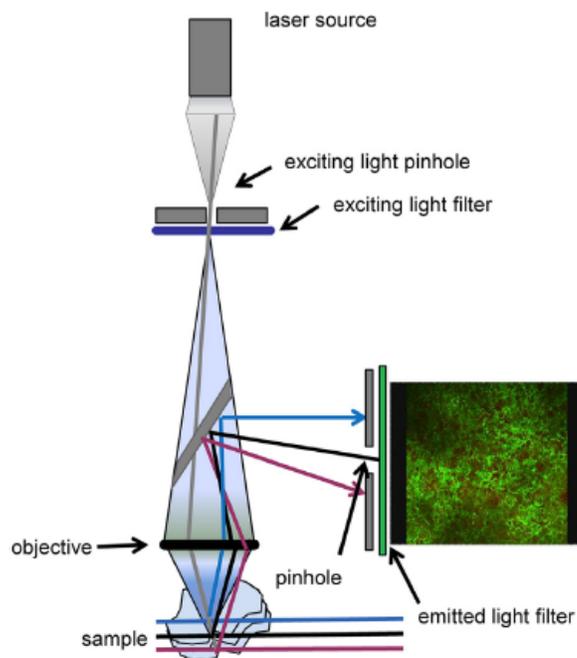
La microscopia confocal laser de barrido (CLSM) fue desarrollada a finales de la década de 1980. Con las ventajas de la alta resolución, grabación dinámica sin dañar las células vivas y la adquisición de imágenes tridimensionales, CLSM se ha vuelto ampliamente utilizada en la mayoría de las áreas de la medicina y biología [163].

La microscopia confocal hace uso de la fluorescencia convencional, pero introduce el principio de confocalidad, que se refiere a la colimación de un punto de luz en un plano particular de una muestra, aunque hay diferencias importantes entre la microscopia convencional de fluorescencia y la confocal [164]. Así que se describirá brevemente en que consiste la microscopía de fluorescencia para después presentar los principios de la microscopía confocal. La microscopia de fluorescencia convencional es aquella que utiliza una fuente de luz, generalmente una lámpara de mercurio, xenón o diodos emisores de luz (LEDs) para excitar los electrones de moléculas fluorescentes contenidos en una muestra. Estas moléculas absorben una parte de la energía proporcionada por la luz y emiten fotones que se filtran en un intervalo específico de longitud de onda para ser captados por el observador en una longitud de onda específica. El resultado permite visualizar estructuras microscópicas, naturalmente fluorescentes o pre-marcadas con diversos fluorocromos en células y tejidos de plantas o animales [164].

### **Principio del sistema de CLSM**

La microscopia confocal forma parte de las técnicas de microscopia de luz fluorescente. No obstante, los microscopios confocales, a diferencia de los de fluorescencia convencional, emplean láseres como fuente de luz. Un microscopio confocal laser de barrido está conformado del sistema óptico, láseres, sistema de detección y el dispositivo de escaneo. La óptica detrás de este tipo de imágenes consiste en lo siguiente: un láser emitido de la fuente de luz se vuelve un haz paralelo de diámetro expandido cuando atraviesa la apertura “pinhole”, el haz de luz

es reflejado 90° cuando choca con el Espejo dicromático y se dirige hacia el plano focal deseado en la muestra cuando pasa a través del objetivo del lente. La fluorescencia de la muestra se emite en todas las direcciones bajo la excitación proveniente del láser. Parte de la fluorescencia se enfoca en el punto focal del objetivo una vez que pasa a través de los lentes del objetivo, espejo dicromático y lente de enfoque. La luz fluorescente del punto focal pasa a través de un pinhole donde es recolectada por el detector. Cuando el láser escanea la muestra punto por punto, el tubo fotomultiplicador detrás del “pinhole” recibe punto por punto la correspondiente imagen óptica. Los diferentes planos focales dentro de la muestra y las imágenes transversales (también conocidas como secciones ópticas múltiples del plano Z) pueden ser analizadas una para una para formar un “z-stack” que contiene la información del grosor de toda la muestra con una alta resolución espacial [163,164]. Usando procesamiento de imágenes por computadora y la reconstrucción tridimensional de imágenes de software, se obtiene una imagen tridimensional de alta resolución. El camino óptico de un microscopio confocal láser de barrido es mostrado en la Figura A4.1



**Figura A4.1** Camino óptico de un microscopio confocal láser de barrido [163].



Casa abierta al tiempo  
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

ACTA DE DISERTACIÓN PÚBLICA

Nº. 00163  
Matrícula: 2143805709

FORMACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE BIOPELÍCULAS DE ACIDITHIOBACILLUS THIOOXIDANS SOPORTADAS EN GRAFITO.

En la Ciudad de México, se presentaron a las 10:30 horas del día 28 del mes de octubre del año 2019 en la Unidad Iztapalapa de la Universidad Autónoma Metropolitana, los suscritos miembros del jurado:

DR. IGNACIO GONZALEZ MARTINEZ  
DRA. MARGARITA MIRANDA HERNANDEZ  
DRA. BIBIANA CERCADO QUEZADA  
DR. GERMAN BUITRON MENDEZ



MARCELA MENDEZ TOVAR  
ALUMNA

Bajo la Presidencia del primero y con carácter de Secretario el último, se reunieron a la presentación de la Disertación Pública cuya denominación aparece al margen, para la obtención del grado de:

DOCTORA EN CIENCIAS (QUIMICA)

DE: MARCELA MENDEZ TOVAR

y de acuerdo con el artículo 78 fracción IV del Reglamento de Estudios Superiores de la Universidad Autónoma Metropolitana, los miembros del jurado resolvieron:

APROBAR

Acto continuo, el presidente del jurado comunicó a la interesada el resultado de la evaluación y, en caso aprobatorio, le fue tomada la protesta.

REVISÓ

MTRA. ROSALBA SERRANO DE LA PAZ  
DIRECTORA DE SISTEMAS ESCOLARES

DIRECTOR DE LA DIVISIÓN DE CBI

DR. JESUS ALBERTO OCHOA TAPIA

PRESIDENTE

DR. IGNACIO GONZALEZ MARTINEZ

VOCAL

DRA. MARGARITA MIRANDA HERNANDEZ

VOCAL

DRA. BIBIANA CERCADO QUEZADA

SECRETARIO

DR. GERMAN BUITRON MENDEZ