

## Obtención de grafeno a partir de *Shewanella oneidensis* para desalinización del agua

### Obtaining graphene from *Shewanella oneidensis* for water desalination

L. Pérez-Torres <sup>a</sup>, L. Ballesteros-Almanza <sup>b</sup>, G. Carbajal De la Torre <sup>c</sup>

<sup>a</sup> Facultad de Química, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, 58030, Morelia, Michoacán.

<sup>b</sup> Facultad de Biología, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, 58030, Morelia, Michoacán.

<sup>c</sup> Facultad de Mecánica, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, 58030, Morelia, Michoacán.

#### Resumen

En los últimos años se ha experimentado con el grafeno. Material derivado del carbono, con estructura 2D, que ofrece la posibilidad de fabricar una membrana mediante la superposición de nano-láminas de grafeno. Una aplicación para la membrana es en la desalinización de agua. El grafeno tiene características físicas y químicas adecuadas para la desalinización. La síntesis del grafeno genera vapores altamente tóxicos. En este trabajo se demostró la obtención de grafeno a partir de *Shewanella oneidensis*. El uso de la bacteria evita la generación de contaminantes tóxicos y es capaz de reducir el OG para obtener rGO. Fue realizada la caracterización del material final, donde el espectro FTIR del rOG muestra bandas en 3448 cm<sup>-1</sup>, 3300 cm<sup>-1</sup>, en 2918 cm<sup>-1</sup>, 2850 cm<sup>-1</sup>, 1636 cm<sup>-1</sup>, 1383 cm<sup>-1</sup>, 1099 cm<sup>-1</sup> y 676 cm<sup>-1</sup> comprobando que *S. oneidensis* puede reducir el OG para obtener grafeno. Esto hace posible la obtención de grafeno de manera sustentable en mayor escala para la fabricación de membranas.

#### Palabras Clave:

Bacteria, Nanomateriales, Biopelícula

#### Abstract

In recent years scientists have been experimenting with graphene. A material derived from carbon, with a 2D structure. It offers the possibility of manufacturing a membrane by superimposing graphene nano-sheets. One application for the membrane is in water desalination. Graphene is a material with physical and chemical characteristics suitable for desalination. The synthesis of graphene generates highly toxic vapors. This work demonstrated that graphene can be obtained from *Shewanella oneidensis*. The use of the bacteria avoids the generation of toxic pollutants and can reduce OG to obtain rGO. The final material was characterized. The rOG FTIR spectrum shows bands at 3448 cm<sup>-1</sup>, 3300 cm<sup>-1</sup>, at 2918 cm<sup>-1</sup>, 2850 cm<sup>-1</sup>, 1636 cm<sup>-1</sup>, 1383 cm<sup>-1</sup>, 1099 cm<sup>-1</sup> and 676 cm<sup>-1</sup> demonstrating that *S. oneidensis* you can reduce OG to obtain graphene. This process makes it possible to obtain graphene in a more sustainable way and on a larger scale for the manufacture of membranes.

#### Keywords:

Bacteria, Nanomaterials, Biofilm

#### 1. Introducción

El grafeno es una estructura de carbono bidimensional constituida por una sola capa de átomos de carbono en hibridación sp<sup>2</sup> en una red hexagonal (Menéndez y Blanco, 2014; Colom *et al.*, 2020), posee distintas propiedades físicas que son adecuadas para aplicaciones ambientales. La investigación se ha centrado principalmente en la fabricación de materiales y sorción química (Liu *et al.*, 2014). Para obtener el grafeno es posible utilizar microorganismos vivos, como bacterias, se descubrió que se

puede reducir a la actividad metabólica y características especiales de algunas bacterias. Una de las bacterias con la capacidad de reducir metales es *Shewanella oneidensis*. Los electrones generados metabólicamente desde *S. oneidensis* se transfieren a un aceptor de electrones externo directamente desde la superficie celular o usando mediadores de electrones auto-secretados (De Silva *et al.*, 2017). Wei y colaboradores mencionan que al apilar las capas de grafeno se puede formar una membrana fina y utilizarse para ablandar el agua, decoloración, eliminación de materia orgánica natural, eliminación de metales pesados y

\*Autor para la correspondencia: lisouli.perez@umich.mx

Correo electrónico: lisouli.perez@umich.mx (Lisouli Pérez-Torres), balmanza@umich.mx (María de Lourdes Ballesteros-Almanza), georgina.carbajal@umich.mx (Georgina Carbajal-De la Torre)

separación de solventes orgánicos y para la desalinización de agua por el proceso de osmosis inversa.

El producir grafeno con bacterias es una forma sustentable, rápida y económica evitando causar problemas ambientales cuando se trata de una producción a gran escala (Tanizawa *et al.*, 2012).

El agua es una necesidad básica para el ser humano; la contaminación, el crecimiento de la población, y el cambio climático han generado la escasez de agua potable. La crisis de agua potable ha encontrado una solución en la desalinización de agua de mar. Existen diversas formas para la obtención de este recurso hídrico tan importante, se utiliza a la naturaleza para su recolección, interviniendo el ciclo del agua. La osmosis inversa es el proceso más eficaz para realizar la desalinización, pero es costoso debido al tipo de membranas utilizadas y a la energía que utiliza (Guerrero, 2016; Yang *et al.*, 2013). Por este motivo se propone el presente trabajo de “obtención de grafeno a partir de *Shewanella oneidensis* para desalinización del agua”.

## 2. Conceptos

### 2.1. Grafeno

El grafeno se ha definido como un hidrocarburo aromático policíclico infinitamente alternadamente de anillos de solo seis átomos de carbono, con estructura de carbono bidimensional constituida por una sola capa de átomos de carbono en hibridación  $sp^2$  en una red hexagonal (Menéndez y Blanco, 2014; Colom *et al.*, 2020). Entre algunas de las propiedades que tiene es: alta movilidad de electrones a temperatura ambiente ( $250,000 \text{ cm}^2 / \text{Vs}$ ), conductividad térmica excepcional ( $5000 \text{ Wm}^{-1} \text{ K}^{-1}$ ) (Singh *et al.*, 2011), soportar tensiones muy elevadas sin deformación (López-Polín, 2016) y una alta capacidad para enlazarse con otros átomos (Arenas, 2017).

### 2.2. *Shewanella oneidensis*

*Shewanella oneidensis* o de forma abreviada *S. oneidensis* es una bacteria que posee una morfología bacilar con un tamaño aproximado de entre 2 y 3  $\mu\text{m}$  de longitud y 0,5-0,6  $\mu\text{m}$  de diámetro. Se trata de una bacteria Gram-negativa, anaerobia facultativa con flagelo polar (García, 2014). *S. oneidensis* ha evolucionado para utilizar materiales inorgánicos como aceptor de electrones durante la respiración anaeróbica. Cuando se proporciona óxido de grafeno (OG), los electrones de *S. oneidensis* reaccionan con los grupos de oxígeno del OG, lo que lleva a una restauración de los orbitales  $sp^2$  que forman la red hexagonal característica del grafeno. (Lehner *et al.*, 2019).

### 2.3. Membranas

Las membranas pueden ser utilizadas en la desalinización de agua por ósmosis inversa al igual que para la purificación y potabilización. Una membrana es una barrera permeo selectiva entre dos medios que permite la transferencia, desde un medio a otro y a través de ella, de ciertos componentes, al mismo tiempo (Gozálvez y Lora, 1998; Dominighini *et al.*, 2012). El consumo de energía mediante la utilización de una membrana de OG es menor al de una membrana comercial, lo cual reduce costos y hace el proceso de desalinización más eficaz (Freire y Pacheco, 2017).

## 3. Metodología

### 3.1 Síntesis de OG

La síntesis de OG por método Hummers modificado fue realizada mezclando 1 g de grafito (99%, Sigma-Aldrich, 325mesh) en polvo, con 0.5 g de  $\text{NaNO}_3$  (Meyer), fueron adicionados 24 ml de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  concentrado (Jalmek) en baño de hielo dentro de una tina de ultrasonido (Branson 1510). Fue empleada una tina de ultrasonido para la homogenización de los reactivos por 5 minutos dentro de un rango de temperatura de 0-10°C. Además, fueron agregados 3 g de  $\text{KMnO}_4$  a la suspensión homogénea, posteriormente fueron adicionados 3 g de  $\text{KMnO}_3$  y 46 mL de agua desionizada y por último fue agregada agua desionizada caliente y 3.5 mL de  $\text{H}_2\text{O}_2$  al 30 %. Los lavados fueron realizados con agua desionizada hasta obtener un pH neutro y se secó en la mufla a 70 °C para la caracterización del material.

### 3.2 Cultivo de *S. oneidensis*

La bacteria *S. oneidensis* (Número ATCC 700550, lote 61771725) fue cultivada en frascos Schott con caldo MacConkey de manera anaerobia y en cajas Petri con agar MacConkey a temperatura de 30 °C, el cultivo fue llevado a cabo en una incubadora con agitación a 120 rpm. El cultivo de *S. oneidensis* fue monitoreado cada 12 horas para observar el crecimiento de ésta. Para observar el cultivo de *S. oneidensis* bajo el microscopio fue efectuada la tinción Gram.

La medición de absorbancia fue realizada con el espectrofotómetro UV/VIS para conocer la densidad bacteriana de *S. oneidensis* cada 12 horas. La densidad bacteriana mínima para realizar la solución de OG con el cultivo de *S. oneidensis* es de  $5 \times 10^6$  CFU (*colony forming unit* por sus siglas en inglés).

### 3.3 Solución OG y *S. oneidensis*

La bacteria fue cultivada en frascos Schott con 200 ml de caldo MacConkey por 24 horas en una incubadora con agitación a 120rpm a una temperatura de 30 °C. Después de 24 hrs, el caldo fue centrifugado a 6000rpm por 5 minutos para obtener una mayor concentración de *S. oneidensis*. Con el fin de reducir el OG, se debe realizar una solución 2:1 de *S. oneidensis* y OG respectivamente. La solución de OG debe tener una concentración de 0.5 mg/mL para ser reducido mediante *S. oneidensis*. Para preparar la solución de OG, fue utilizada agua destilada y OG. El OG se encontraba en polvo, por lo que fue disuelto en agua destilada en la tina de ultrasonido por dos horas para que las escamas alcanzaran a disolverse totalmente. Una vez que se obtuvo la solución de OG, fue esterilizado para la mezcla con el cultivo de *S. oneidensis*. La mezcla fue puesta en agitación a 120 rpm a temperatura ambiente (25 °C) por 5 días. Los cultivos fueron realizados de forma anaerobia por triplicado.

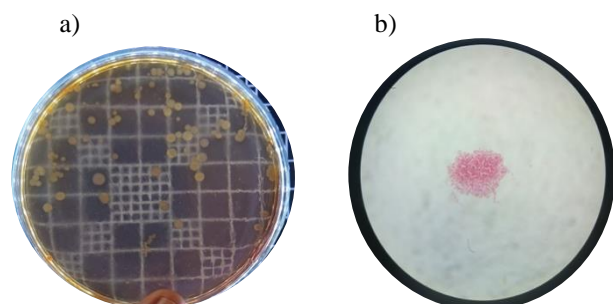
## 4. Análisis de resultados

### 4.1 OG

El grafito fue sintetizado por el método Hummers modificado, el material obtenido fue secado en la mufla a 90 °C y pulverizado con un molino para café de la marca Hamilton Beach para la caracterización.

### 4.2 Crecimiento bacteriano

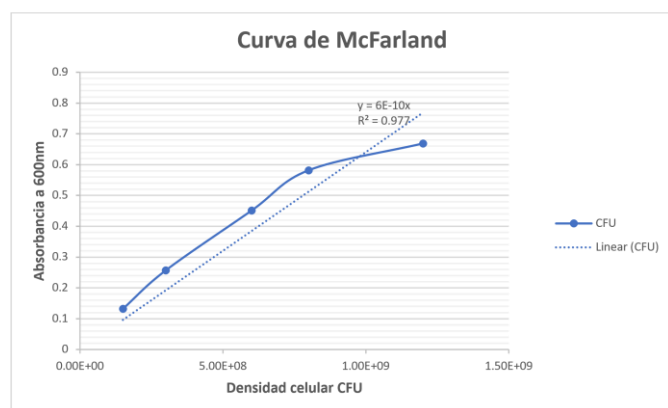
El cultivo de *S. oneidensis* se observó después de 24 horas bajo el microscopio óptico, con el objetivo 100X (ver Figura 1). El cultivo de la bacteria se muestra puro como se observa en las figura 1, no hay señal de algún otro microorganismo. Se observan las bacterias en forma de bacilos, teñidas de color rosa-rojo corroborando que son Gram-negativas.



**Figura 1.** Colonias de *S. oneidensis* (a), Tinción Gram de cultivo de *S. oneidensis* visto bajo microscopio óptico (b).

#### 4.3 Reducción de OG

Una vez cultivada y observada, la bacteria fue realizada una curva de calibración (ver gráfica 1) utilizando la escala McFarland para relacionar la absorbancia medida en el espectrofotómetro con la densidad bacteriana de *S. oneidensis*.



**Gráfica 1.** Curva McFarland

De la curva McFarland se obtuvo la ecuación 1.

$$y = 6E^{-10} * x \quad (1)$$

La absorbancia a OD<sub>600</sub> (medida a 600 nm de número de onda) del cultivo a las 24 horas fue de 0.009 nm, sustituyendo en (1) la densidad final fue  $5 \times 10^8$  CFU, que se encuentra por arriba de la densidad mínima para la realizar la solución de OG con el cultivo de *S. oneidensis*.

La solución de OG y el cultivo de *S. oneidensis* se colocaron en una incubadora con agitación (120 rpm) a temperatura ambiente (25 °C) durante 120 horas. Cada 12 horas fue tomada la absorbancia para medir cualitativamente el crecimiento de la bacteria. En la tabla 1 se muestran las mediciones. La absorbancia del testigo fue de 0.004.

Tabla 1: Absorbancia a una de OD<sub>600</sub> de los frascos de la solución en intervalos de 12 horas

Tiempo (hrs)	Frasco 1 OD <sub>600</sub>	Frasco 2 OD <sub>600</sub>	Frasco 3 OD <sub>600</sub>
0	0.004	0.005	0.004
12	0.015	0.015	0.014
24	0.017	0.016	0.017
36	0.017	0.019	0.018
48	0.019	0.020	0.021
60	0.021	0.022	0.021
72	0.022	0.023	0.023
84	0.023	0.030	0.026
96	0.024	0.030	0.027
108	0.024	0.031	0.027
120	0.024	0.031	0.027

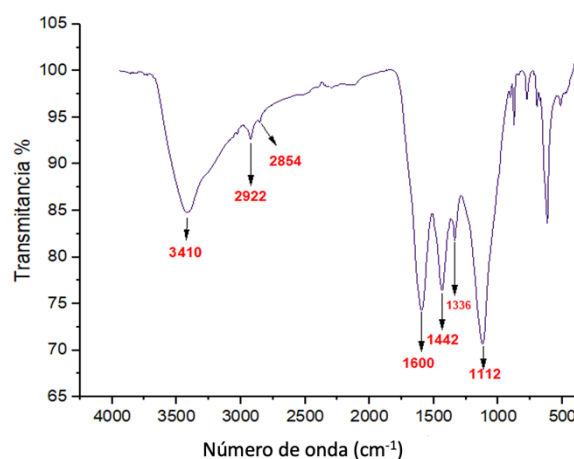
La absorbancia fue en aumento hasta las 84 horas, de las 96 a las 120 horas. Después de transcurrido el tiempo, al no haber cambio en la absorbancia la solución fue retirada de la incubadora. Las mediciones de absorbancia muestran que la bacteria continuó creciendo hasta las 96 horas, para corroborar que la bacteria redujera el OG, el material resultante de la solución fue puesto en la mufla a 70 °C para evaporar el líquido y poder caracterizar el material.

#### 4.4 Caracterización de los materiales

##### 4.4.1 FTIR

Para la caracterización de espectroscopia IR fue realizada en un espectrómetro de infrarrojo marca Bruker, modelo tensor 27, con un rango de 4000 a 400 cm<sup>-1</sup>.

El primer material que fue obtenido de la síntesis de grafito resultó OG, en la figura 2 se presenta el espectro FTIR correspondiente a este material.



**Figura 2.** Espectro FTIR correspondiente al OG

La región del espectro situada entre 4000 y 1400 cm<sup>-1</sup>, es de gran utilidad para la identificación de la mayoría de los grupos

funcionales presentes en las moléculas orgánicas (Mondragon, 2017).

Analizando la figura 2 (en el eje de las ordenadas las transmitancia, contra los datos de número de onda), se muestran algunas bandas en  $3410\text{ cm}^{-1}$ ,  $2922\text{ cm}^{-1}$ , en  $2854\text{ cm}^{-1}$ ,  $1600\text{ cm}^{-1}$ ,  $1442\text{ cm}^{-1}$ ,  $1336\text{ cm}^{-1}$  y  $1112\text{ cm}^{-1}$ . El ancho de la banda en  $3410\text{ cm}^{-1}$  indica la presencia de ácidos carboxílicos, la banda en  $2922$  y  $2854\text{ cm}^{-1}$  indican presencia de alcanos C-H, en  $1600\text{ cm}^{-1}$  hay una presencia de dobles enlaces conjugados C=C indicando presencia del grupo funcional alquenos, de  $1500\text{-}500\text{ cm}^{-1}$  se considera la zona región de la huella dactilar, esta zona indica si el material caracterizado es la banda  $1442\text{ cm}^{-1}$  no es muy intensa por lo que los dobles enlaces pudieran ser aromáticos,  $1336\text{ cm}^{-1}$  indica la presencia de un enlace C-O y  $1112\text{ cm}^{-1}$  indica la presencia de C-O y C-C (Khalili, 2016; Colom *et al.*, 2020). Estas son las bandas características del OG, es decir, que el material obtenido es OG, por lo que el proceso de síntesis para su obtención fue el adecuado.

El segundo material resultante de la solución de OG con el cultivo de *S. oneidensis* fue llevado a análisis IR al igual que el OG, en la figura 3 se presenta el espectro FTIR correspondiente a al óxido de grafeno reducido (rOG).

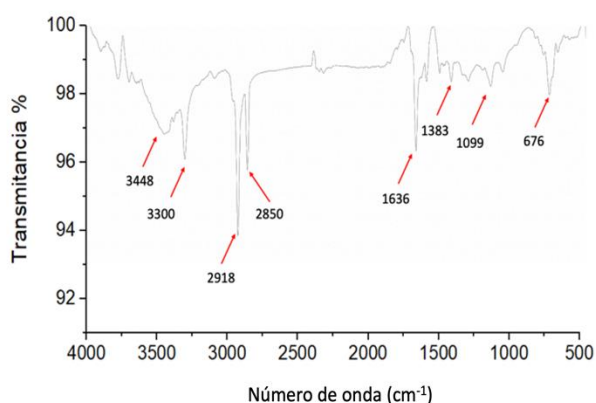


Figura 3. Espectro FTIR correspondiente al rOG

Las bandas más relevantes del espectro FTIR del rOG mostradas en la figura 3 están en  $3448\text{ cm}^{-1}$ ,  $3300\text{ cm}^{-1}$ , en  $2918\text{ cm}^{-1}$ ,  $2850\text{ cm}^{-1}$ ,  $1636\text{ cm}^{-1}$ ,  $1383\text{ cm}^{-1}$ ,  $1099\text{ cm}^{-1}$  y  $676\text{ cm}^{-1}$ . En la banda en  $3448\text{ cm}^{-1}$  es bastante ancho, indica la presencia de ácidos carboxílicos al igual que la banda de  $3300\text{ cm}^{-1}$ , las bandas en  $2918\text{ cm}^{-1}$  y  $28540\text{ cm}^{-1}$  indican presencia de alcanos C-H, en  $1636\text{ cm}^{-1}$  hay una presencia de dobles enlaces conjugados C=C (Colom *et al.*, 2020), en la zona de la huella dactilar las bandas de  $1383\text{ cm}^{-1}$  y  $1099\text{ cm}^{-1}$  no son muy amplias ni intensas pertenecen al grupo carbonilo, la banda en  $676\text{ cm}^{-1}$  indica la presencia de alquinos.

Si se comparan los espectro FTIR del OG y del rOG por la bacteria *S. oneidensis*, las intensidades de las bandas que corresponden a los grupos funcionales que contienen oxígeno disminuyeron en comparación con las intensidades de las bandas del OG. Esto demuestra que bacteria *S. oneidensis* redujo el OG, obteniendo un material más puro "el grafeno".

#### 4.4.2 SEM

La caracterización con la técnica de microscopía electrónica de barrido (SEM), fue realizada con un microscopio de barrido marca JEOL Modelo JSM 7600F.

En la muestra obtenida del primer material se detectaron contenidos de carbono, oxígeno y sodio, que concuerdan con el análisis composicional del OG. Las micrografías SEM (ver Figura 4) de las muestras obtuvieron a magnificaciones de 250X hasta 2,500X, el material que se muestra son partículas de forma irregular y de diferentes tamaños. La terminación de estos prismas se presenta en forma irregular dando con textura rugosa. En las figura 4, *a*, *c* y *e*, se muestran lajas de OG de tamaños diferentes. En las figura 4, *b*, *d* y *f*, se muestra la irregularidad del OG no es liso, muestra ligeras ondulaciones.

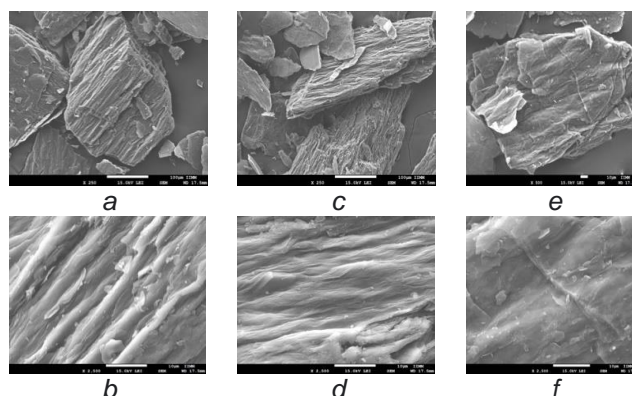


Figura 4. Micrografías del microscopio electrónico de barrido de OG. La figura *a*, *c*, *e* fueron tomadas a una magnificación de 250X y la *b*, *d* y *f* fueron tomadas a una magnificación 2500x.

En la micrografías del segundo material obtenido rGO (ver figura 5) obtenidas por SEM se observa el material rGO, y se observan las bacteria *S. oneidensis*. El material se muestra con menor rugosidad que el OG. En la figura 5, *h* se alcanza a ver las bacterias y en la figura 5, *i* se observa que el material fue adherido a la bacteria dando una forma aserrada en los bordes.

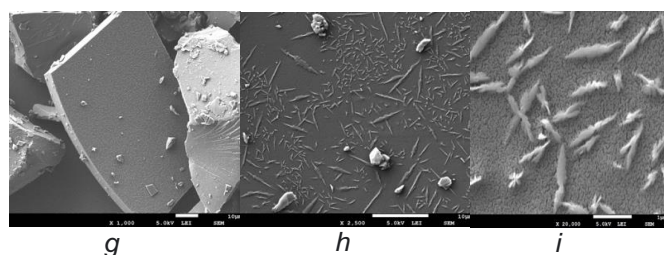


Figura 5. Micrografías del microscopio electrónico de barrido de rOG la figuras *g*, *h*, *i* fueron tomadas a una magnificación de 1000X, 2000x y 20000x respectivamente.

## 5. Conclusiones

Es posible obtener grafeno mediante la reducción de OG con la bacteria *S. oneidensis*. A partir del espectro FTIR se verifico que en el material final se redujo la cantidad de oxígeno después de ser incubado con la bacteria. Del material obtenido se puede elaborar una membrana para ser utilizada en la desalinización del agua mediante osmosis inversa. Con este trabajo se da a conocer la viabilidad de la obtención de grafeno de forma más sustentable donde se pueden evitar procesos que generen contaminantes. Así mismo al ser un material que contiene en su mayoría carbono, presenta un menor impacto ambiental al finalizar su ciclo de vida.

## Agradecimientos

Este trabajo ha sido realizado gracias a la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo por facilitar el uso de los equipos e instalaciones para la realización de la investigación, así como al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por su financiamiento.

## Referencias

- Arenas, A. (2017). Obtención de membranas a partir de óxido de grafeno para la desalinización de agua de producción. Universidad Industrial de Santander. Santander, Colombia.
- Colom, X., Cañavate, J., Lis, M. J., Sanjuan, G. (2020). Análisis estructural de Óxidos de Grafeno (GO) y Óxidos de Grafeno reducidos (rGO) 77, 167-174.
- De Silva, K. H., Huang, H. H., Joshi, R. K., Yoshimura, M. (2017). Chemical reduction of graphene oxide using green reductants. *Carbon* 119, 190–199. DOI: 10.1016/j.carbon.2017.04.025
- Dominighini, C., Cataldi, Z., Olivero, M., Armas, A., Scurati, C., Gottardo, M., Muscia, L., Damiano P. (2012). Análisis de Membranas de Osmosis Inversa para aguas con alto contenido de Arsénico. XVI Safety, Health and Environment World Congress. DOI: 10.14684/shewc.26.2016.123-129
- Freire, T. C., Pacheco, C. V. (2017). Estudio del consumo de energía en el proceso de osmosis inversa utilizando un filtro de membrana de grafeno para la desalinización del agua del mar. Quito: UCE. Ecuador.
- García, L. (2014). Mecanismos moleculares de adaptación a los cambios de temperatura en la bacteria antártica *Shewanella frigidimarina*. Universidad Complutense de Madrid. España.
- Gozálvez, J.M., Lora, J. (1998). Fabricación de membranas de acetato de celulosa para ósmosis inversa y nanofiltración mediante el método de inversión de fase. Universidad Politécnica de Valencia. España.
- Guerrero, I. (2016). Desalinización de agua por membranas de grafeno nanoporoso. Cálculos de primeros principios DOI: 10.13140/RG.2.2.17063.96167
- Khalili, D. (2016). Graphene oxide: A promising carbocatalyst for the regioselective thiocyanation of aromatic amines, phenols, anisols and enolizable ketones by hydrogen peroxide/KSCN in water. *New Journal of Chemistry*. 40, 2547–2553. DOI: 10.1039/C5NJ02314A
- Lehner, B. A. E., Janssen, V. A. E. C., Spiesz, E. M., Benz, D, Brouns, S. J. J., Meyer, A. S., van der Zant, H. S. J. (2019). Creation of Conductive Graphene Materials by Bacterial Reduction Using *Shewanella Oneidensis*. *Chemistry Open*, 7, 888–895. DOI: 10.1002/open.201900186.
- López-Polín, G., Gómez-Navarro, C. (2016). Propiedades mecánicas de membranas de grafeno: consecuencias de la inducción controlada de defectos. Universidad Autónoma de Madrid. España.
- Liu, Y., Dustin Lee, J. H., Xia, Q., Ma, Y., Yu, Y., Lanry Yung, L. Y., Zhou, Z. (2014). A graphene-based electrochemical filter for water purification. *Journal of Materials Chemistry* 39, 16554–16562. DOI: 10.1039/c4ta04006f
- Menéndez R., Blanco, C. (2014). El grafeno. Editorial Catarata. Madrid, España
- Mondragon, P. (2017). Espectroscopia de infrarrojo para todos... y 51 espectros de alimentos consumidos en México. Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco. México.
- Singh, V., Joung, D., Zhai, L., Das, S., Khondaker, S. I., Seal, S. (2011). Graphene based materials: Past, present, and future. *Progress in Materials Science* 56, 1178–1271. DOI: 10.1016/j.pmatsci.2011.03.003
- Tanizawa, Y., Okamoto, Y., Tsuzuki, K., Nagao, Y., Yoshida, N., Tero, R., Sandhu, A. (2012). Microorganism mediated synthesis of reduced graphene oxide films. *Journal of Physics: Conference Series*, 352. DOI: 10.1088/1742-6596/352/1/012011
- Wei, Y., Zhang, Y., Gao, X., Ma, Z., Wang, X., Gao, C. (2018). Multilayered graphene oxide membranes for water treatment: A review. *Carbon* 139, 964–981. DOI: 10.1016/j.carbon.2018.07.040
- Yang, Z., Yan, H., Yang, H., Li, H., Li, A., Cheng, R. (2013). Flocculation performance and mechanism of graphene oxide for removal of various contaminants from water. *Water Research* 47, 3037–3046. DOI: 10.1016/j.watres.2013.03.027