



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS
DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**

UNIDAD SALTILLO

**“Desarrollo de catalizadores carbonosos para
celdas de combustible microbianas”**

T E S I S

Que presenta

OMAR JOSÉ DUARTE URBINA

Para obtener el grado de

MAESTRO EN CIENCIAS

EN

**SUSTENTABILIDAD DE LOS RECURSOS NATURALES Y
ENERGÍA**

Directores de la Tesis:

Dr. Francisco Javier Rodríguez Varela

Dr. Fabián Fernández Luqueño

Ramos Arizpe, Coahuila

NOVIEMBRE, 2018

“No dejes apagar el entusiasmo, virtud tan valiosa como necesaria;
trabaja, aspira, tiende siempre hacia la altura”

Rubén Darío
(1867-1916)
Príncipe de las Letras Castellanas

Agradecimientos

A Dios por protegerme durante todo este tiempo y darme la sabiduría para superar obstáculos y dificultades presentes a lo largo de mi vida.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (Conacyt) por la beca de maestría brindada y el apoyo financiero para la investigación otorgado a través del proyecto 241526.

Al Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (Cinvestav-IPN), Unidad Saltillo, por facilitar las instalaciones del Laboratorio de Sistemas Alternativos de Energía, Laboratorio de Interacciones Planta-Suelo-Microorganismos y Laboratorios Generales donde se realizó esta investigación.

A mis directores de tesis, Dr. Francisco Javier Rodríguez Varela y Dr. Fabián Fernández Luqueño, por su valioso apoyo, asesoría y lecciones de vida.

Al comité de investigación, integrado por Dr. Salvador Carlos Hernández y Dr. Iván Escalante, por sus comentarios y observaciones.

A la Dra. Ivonne Alonso Lemus por sus comentarios y observaciones para el desarrollo de los catalizadores carbonosos.

Al Dr. Eddie López Honorato por su apoyo durante los primeros 6 meses de la maestría.

A Carlos Cobos Reyes por su ayuda en las implementaciones para la fabricación de ánodos, bioánodos y montajes de pruebas electroquímicas.

A la Dra. Beatriz Escobar Morales por facilitar el uso de equipos de caracterización fisicoquímica como difracción de rayos x, espectroscopía de infrarrojo y espectroscopía Raman (obtenidos con el apoyo del proyecto Conacyt 253986), en la Unidad de Energía Renovable del Centro de Investigación Científica de Yucatán.

A los técnicos del Laboratorio de Microscopía, Martha Rivas y Miguel Aguilar, por sus asesorías en la obtención de imágenes en el microscopio electrónico de barrido.

A mis compañeros de maestría y amigos mexicanos por hacerme sentir en familia con todas sus atenciones. Gracias a todas las personas que ayudaron directa e indirectamente en la realización de este trabajo.

Dedicatoria

A la memoria de mi abuelita, María Luisa Mejía, que ha cuidado y guiado desde el cielo y ha sido uno de mis motores para ser una persona útil en esta vida.

A mis padres, Minerva y Juan Manuel, por todo su apoyo, confianza y sus ejemplos de perseverancia y constancia que me han enseñado a luchar por mis sueños.

A mi hermano Pavel y cuñada Benjania cuyas sus palabras de aliento y consejos han permitido mejorar mi vida cotidiana.

A mi hermana Nadeska y sobrinos, Matías y Marina, para demostrarles que todo sueño se logra con esfuerzo y dedicación.

A mis amigos quienes con su ayuda, cariño, comprensión y tiempo compartido han sido parte fundamental de mi vida.

A todos los estudiantes nicaragüenses que han entregado su vida y a los que todavía resisten en la lucha por una Nicaragua Libre.

Contenido

Resumen.....	XI
Abstract.....	XII
Capítulo 1. Introducción	1
Capítulo 2. Antecedentes	2
2.1. Fundamentos de una celda de combustible microbiana	3
2.2. Desempeño de las celdas de combustible microbianas.....	5
2.3. Ánodos para celdas de combustible microbianas.....	7
2.4. Cátodo en celdas de combustible microbianas.....	10
2.5. Microorganismos para celdas de combustible microbianas.....	11
2.6. Sustratos para celdas de combustible microbianas	14
Capítulo 3. Justificación	17
Capítulo 4. Objetivos	18
4.1. Objetivo General	18
4.2. Objetivos Específicos.....	18
Capítulo 5. Metodología	19
5.1. Reactivos.....	19
5.2. Residuos de cebolla.....	19
5.3. Agua Residual Farmacéutica.....	20
5.4. Microorganismo	20
5.5. Síntesis de catalizadores carbonosos.....	20
5.5.1. Grafeno dopado con nitrógeno y azufre	20
5.5.2. Biocarbón a partir de residuos de cebolla.....	21
5.5.3. Funcionalización de catalizadores carbonosos	21
5.6. Fabricación de ánodos y cátodos.....	21

5.7.	Formación de bioánodos	22
5.8.	Caracterización fisicoquímica.....	22
5.9.	Caracterización electroquímica en media celda.....	23
5.10.	Caracterización electroquímica en celda completa	24
5.10.1.	Montaje de la CCM.....	24
5.10.2.	Curvas de polarización y de densidad de potencia.....	25
5.10.3.	Pruebas de larga duración en la CCM.....	25
5.11.	Caracterización de ARF	25
Capítulo 6. Resultados y discusión		27
6.1.	Rendimientos de síntesis de los catalizadores.....	27
6.2.	Propiedades fisicoquímicas de catalizadores	28
6.2.1.	Análisis de composición química	28
6.2.2.	Difracción de rayos x	29
6.2.3.	Espectroscopía Raman.....	31
6.2.4.	Análisis por espectroscopía infrarroja	32
6.2.5.	Análisis termogravimétrico.....	33
6.2.6.	Análisis de morfología por Microscopía Electrónica de Barrido	35
6.2.7.	Adsorción de gases	36
6.3.	Análisis de morfología de ánodos	38
6.4.	Caracterización electroquímica en media celda.....	40
6.5.	Caracterización del desempeño de la celda de combustible microbiana	43
6.6.	Caracterización morfológica de bioánodos.....	46
6.6.1.	Bioánodos después de inoculación	46
6.6.2.	CCA8F + <i>B. subtilis</i> antes y después de evaluación en celda completa... ..	48
6.7.	Análisis de agua residual farmacéutica.....	50

Conclusiones.....	52
Referencias bibliográficas.....	53

Lista de Tablas

Tabla 2.1. Comparación de TAR a partir de CCM y lodos activados en términos energéticos, económicos y ambientales [8].....	2
Tabla 2.2. Estudios en los que se ha empleado B. subtilis como MEA en CCMs.....	13
Tabla 2.3. Desempeño de CCMs con diferentes aguas residuales. Modificado de [7].....	15
Tabla 2.4. Uso de ARFs como sustrato en CCMs.	16
Tabla 5.1. Reactivos con sus respectivos proveedores y usos.	19
Tabla 5.2. Análisis para las muestras de la prueba de larga duración en la CCM.	26
Tabla 6.1. Rendimientos de la síntesis de los catalizadores.	27
Tabla 6.2. Composición elemental de los catalizadores carbonosos funcionalizados y sus fuentes de carbono.	28
Tabla 6.3. Propiedades texturales de los catalizadores carbonosos funcionalizados.....	38
Tabla 6.4. Parámetros energéticos durante la operación de la CCM.	44
Tabla 6.5. Estudios que emplearon B. subtilis como MEA en CCM de cámara doble.	45
Tabla 6.6. Análisis de ARF en el día inicial, 1, 7 y final de operación de la CCM.....	51

Lista de Figuras

Figura 2.1. Estructura típica de una CCM de cámara doble.	3
Figura 2.2. Curva de polarización voltaje vs densidad de una celda de combustible, mostrando las principales pérdidas por irreversibilidades.	4
Figura 2.3. Línea de tiempo de los principales desarrollos de ánodos en CCM [29].	8
Figura 2.4. Materiales tradicionales de carbono usados en CCMs: (A) papel de carbono, (B) placa de grafito, (C) tela de carbono, (D) malla de carbono, (E) grafito granular, (F) brocha de carbono, (G) fieltro de carbono y (H) carbón vítreo reticulado [30].	9
Figura 2.5. Esquema de tres mecanismos de TEE utilizados por MEA: (a) transferencia directa de electrones, (b) lanzaderas electrónicas y (c) matriz sólida conductora. En cada mecanismo, se indican por número los procesos cinéticos relevantes para la producción de corriente en la respiración bacteriana: (1), uso del sustrato; (2) producción de electrones; (3a) transporte de lanzadera de electrones entre el MEA y el ánodo; (3b) transporte de electrones a través de una matriz conductora sólida; y (4) interfaz de transferencia de electrones al ánodo [56].	12
Figura 5.1. Estructura de una CCM: 1) Bioánodo, 2) Sustrato (ARF), 3) N ₂ , 4) Cátodo, 5) Electrolito (KOH), 6) O ₂ , 7) MIP. Se muestra también el montaje para su caracterización: 8) Resistencia variable, 9) Potenciostato. En el diagrama de la izquierda se presenta la configuración del bioánodo.	24
Figura 6.1. Patrones de difracción de los catalizadores carbonosos y sus fuentes de carbono: (a) grafito, GNS y GNSF y (b) RC, CCA y CCAF.	30
Figura 6.2. Espectros Raman de los catalizadores carbonosos y sus fuentes de carbono: (a) Grafito, GNS y GNSF y (b) RC, CCA y CCAF.	32
Figura 6.3. Espectros IR de las fuentes de carbono y sus catalizadores carbonosos: (a) Grafito, GNS y GNSF; (b) RC, CCA y CCAF.	33
Figura 6.4. Curvas de ATG de catalizadores carbonosos y sus fuentes de carbono: (a) Grafito y GNS; (b) RC y CCA.	34
Figura 6.5. Micrografías de catalizadores carbonosos funcionalizados: (a) GNSF, (b) CCA4F, (c) CCA6F y (d) CCA8F.	35
Figura 6.6. Isotherma de adsorción (a) y distribución de tamaño de poro (b) de GNSF.	36

Figura 6.7. Isotermas de adsorción (a) y distribución de tamaño de poro (b) de los catalizadores CCAF.	37
Figura 6.8. Micrografías de ánodos de catalizadores carbonosos funcionalizados: (a-d) vista superficial, (e-h) vista transversal.	39
Figura 6.9. VCs de (a) Soporte y Soporte con biopelícula de <i>B. subtilis</i> ; ánodos y bioánodos con biopelícula de <i>B. subtilis</i> : (b) GNSF, (c) CCA4F, (d) CCA6F y (e) CCA8F. Electrolito: ARF; velocidad de barrido: 20 mV s ⁻¹	41
Figura 6.10. Curvas de polarización V _{celda} -j _a a) y curvas Pa-j _a b) de la CCM a temperatura ambiente. Bioánodo: CCA8F + <i>B. subtilis</i> . Electrolito: ARF satura con N ₂ . Cátodo: Pt/C en KOH con pH=9.2, con burbujeo de O ₂ . Membrana: Nafión® 117 modificada.	43
Figura 6.11. Comportamiento de V _{celda} tiempo durante los 14 días de operación de la CCM. Resistencia externa: 10 kΩ.	45
Figura 6.12. Morfología de bioánodos con capa catalítica de catalizadores carbonosos funcionalizados y biopelícula de <i>B. subtilis</i> . Micrografías tomadas después de inoculación por 6 días.	47
Figura 6.13. Micrografías de un corte transversal de bioánodo CCA8F + <i>B. subtilis</i> antes de su evaluación en la CCM.	48
Figura 6.14. Morfología de bioánodo CCA8F + <i>B. subtilis</i> después de la prueba de larga duración en la CCM: a-d) vista superior y e-f) vista de corte transversal.	49

Glosario de términos

ARF	Agua residual farmacéutica
ATG	Análisis termogravimétrico
ATP	Adenosín trifosfato
BEA	Biopelícula electroquímicamente activa
CCA	Biocarbón activado a partir de residuos de cebolla
CCA4	CCA a 400°C
CCA6	CCA a 600°C
CCA8	CCA a 800°C
CCAF	CCA funcionalizado
CCA4F	CCA4 funcionalizado
CCA6F	CCA6 funcionalizado
CCA8F	CCA8 funcionalizado
CCM	Celda de combustible microbiana
COT	Carbono orgánico total
DBO	Demanda bioquímica de oxígeno
DQO	Demanda química de oxígeno
DRX	Difracción de rayos X
EDS	Espectroscopía de energía dispersiva
Fem	Fuerza electromotriz
FTIR	Espectroscopía de infrarrojo con transformada de Fourier
GNS	Grafeno dopado con nitrógeno y azufre
GNSF	GNS funcionalizado
HA	Heteroátomos
I	Corriente
j_a	Densidad de corriente por unidad de área de ánodo
j_v	Densidad de corriente por unidad de volumen de sustrato
MEA	Microorganismos electroquímicamente activos
MEB	Microscopía/Microscopio electrónico de barrido
MGP	Metales del grupo del platino

MIP	Membrana de intercambio protónico
P	Potencia
P_a	Densidad de potencia por unidad de área de ánodo
P_v	Densidad de potencia por unidad de volumen de sustrato
RC	Residuos secos de cebolla morada
RHE	Electrodo reversible de hidrógeno
RRO	Reacción de reducción de oxígeno
RTA	Reflexión total atenuada
TAR	Tratamiento de aguas residuales
TEE	Transferencia extracelular de electrones
VC	Voltamperometría cíclica/voltamperogramas cíclicos
VCA	Voltaje de circuito abierto
VSS	Volumen de sólidos sedimentados

Resumen

En esta investigación se reporta la síntesis, funcionalización con microondas y caracterización de carbones basados en grafeno (GNSF) y residuos de cebolla (CCAF) activados a tres diferentes temperaturas (CCA4F, CCA6F y CCA8F para 400, 600 y 800 °C, respectivamente), utilizados como catalizadores anódicos en CCMs.

El tratamiento mecanoquímico del grafito en presencia de tiourea y ZnCl_2 modificó la estructura cristalina produciendo el catalizador GNS dopados con heteroátomos, mientras que los catalizadores CCAF presentaron una estructura amorfa autodopada con heteroátomos de N y S. Por su parte, la funcionalización con calentamiento intermitente por microondas promovió desorden estructural en catalizadores con estructuras cristalinas (GNSF) a diferencia de catalizadores con estructuras amorfas (CCAF); sin embargo, la formación de grupos funcionales en los catalizadores no fue favorecida. Además, la activación con ZnCl_2 formó estructuras mesoporosas con un tamaño de poros promedio desde 2 (CCAF) hasta 11.38 nm (GNSF). Sin embargo, el área superficial de CCA4F, CCA6F y CCA8F (1468, 1611 y 1269 $\text{m}^2 \text{g}^{-1}$, respectivamente) fueron superiores alrededor de 20 veces más en comparación con GNSF (69.7 $\text{m}^2 \text{g}^{-1}$).

Durante la caracterización electroquímica se utilizó como sustrato agua residual farmacéutica (ARF) altamente recalcitrante. La densidad de corriente (j) incrementó en ánodos con capa catalítica (en el orden CCA8F>CCA6F>GNSF>CCA4F) en comparación con ánodos sin capa catalítica. Por otra parte, una biopelícula de *Bacillus subtilis* (*B. subtilis*) crecida sobre los ánodos mejoró la actividad electroquímica en comparación con otras investigaciones.

En particular, CCA8F con una biopelícula de *B. subtilis* fue el bioánodo más activo y la generación de energía eléctrica aumentó durante la operación en la CCM, obteniendo una densidad de potencia máxima de 30.72 mW m^{-2} . Después de la operación en la CCM, se analizó la morfología del bioánodo, donde se mostró una biopelícula de bacterias del ARF y la estabilidad de la capa catalítica. Por lo tanto, CCA8F y *B. subtilis* pueden ser considerados para aplicaciones anódicas en CCMs con generación de energía eléctrica y tratamiento de sustratos recalcitrantes simultáneamente.

Abstract

In this research, the synthesis, microwave-assisted functionalization and characterization of graphene (GNSF) and onion waste-based (CCAF) activated at three different temperatures (CCA4F, CCA6F y CCA8F for 400, 600 y 800 °C, respectively) carbons used as anode catalysts in MFCs have been reported.

The results showed that the mechanochemical treatment of graphite in presence of thiourea and ZnCl_2 modified its crystalline structure producing the heteroatoms (HA)-doped GNS catalyst, while CCA catalysts presented a self-doped amorphous structure with N and S HA. The structural disorder was promoted with functionalization of intermittent microwave heating to catalysts with crystalline structures (GNSF) unlike catalysts with amorphous structures (CCAF); however, the formation of functional groups was not favored. In addition, activation with ZnCl_2 promoted the formation of mesoporous structures with average pore size from 11.38 (GNSF) to around 2 nm (CCAF). However, specific surface areas of CCA4F, CCA6F and CCA8F (1468, 1611 and 1269 $\text{m}^2 \text{g}^{-1}$, respectively) were about 20 times higher than GNSF (69.7 $\text{m}^2 \text{g}^{-1}$).

Highly recalcitrant pharmaceutical wastewater (PWW) was used as substrate during the electrochemical characterization. The current density (j) increased at anodes containing catalyst layers (in the order CCA8F>CCA6F>GNSF>CCA4F) compared to anodes without catalytic layer. On the other hand, a biofilm of *Bacillus subtilis* (*B. subtilis*) grown on the anodes improved the electrochemical activity in comparison with other research.

CCA8F with a biofilm of *B. subtilis* was the most active bioanode and the generation of electric power increased during MFC operation, obtaining a maximum power density of 30.72 mW m^{-2} . After of MFC operation, a biofilm of PWW microorganism grown on the catalyst and preservation of catalytic layer of bioanode was observed. Therefore, CCA8F and *B. subtilis* can be considered for anodic applications in MFCs with power generation and treatment of recalcitrant substrates, simultaneously.

Capítulo 1. Introducción

La creciente demanda energética para el tratamiento de aguas residuales (TAR) representa una problemática compleja e interrelacionada con otros aspectos urbanos para muchos gobiernos locales, debido al crecimiento demográfico y el alto nivel de vida que demanda la población [1]. En particular, las aguas residuales farmacéuticas (ARFs) son generalmente tóxicas y contienen compuestos recalcitrantes difíciles de remover con procesos biológicos tradicionales, los cuales son costosos y demandan energía [2]. Una solución a estas limitantes es la implementación de sistemas alternativos sustentables para disminuir el uso y contaminación de los combustibles fósiles [3].

Las celdas de combustible microbianas (CCMs) son dispositivos que convierten la materia orgánica de las aguas residuales en energía eléctrica, mediante el uso de bacterias [4]. Existen microorganismos electroquímicamente activos (MEA), capaces de degradar aguas residuales generando energía eléctrica y efluentes tratados [5]. La conversión directa de energía química a eléctrica aumenta la eficiencia de conversión de las CCMs comparadas con los motores de combustión interna [6]; además, ofrece otras ventajas en términos energéticos, ambientales, económicos y operacionales [7]. Sin embargo, todavía se requieren avances adicionales para promover esta tecnología a gran escala.

Las investigaciones sobre CCMs han permitido el desarrollo de nuevas arquitecturas de la celda, catalizadores de bajo costo y la integración con otras tecnologías de remediación, para aumentar su desempeño [8]. En años recientes, se han desarrollado catalizadores utilizados como ánodos, debido a que es ahí donde se lleva a cabo la transferencia de electrones que posteriormente son transportado hacia el cátodo. El uso de catalizadores carbonosos tratados termoquímicamente, y en su caso dopados con heteroátomos (HA), permite obtener las características deseadas para promover las reacciones bioelectroquímicas, resultando ser una forma efectiva para mejorar el rendimiento de las CCMs [9].

Por tal razón, en esta investigación se desarrollaron catalizadores carbonosos funcionalizados a partir de: i) grafeno dopado con HA de N y S (GNSF); y ii) residuos de cebolla (CCAF). Empleando tales catalizadores, se fabricaron bioánodos con *B. subtilis* como MEA. Los bioánodos se utilizaron en una CCM como dispositivo bioelectroquímico para generar energía eléctrica y remediar ARF de forma simultánea.

Capítulo 2. Antecedentes

Las CCMs se basan en el uso de MEA para degradar la materia orgánica contenida en un sustrato y producir energía eléctrica, por lo que se consideran una fuente de energía prometedora para el TAR. Los beneficios de las CCMs, con respecto a las tecnologías tradicionales de TAR, pueden expresarse en términos energéticos, ambientales, económicos y operacionales. Por ejemplo, en la Tabla 2.1 se presenta una comparación de TAR a partir de CCMs y lodos activados en términos energéticos, económicos y ambientales.

Tabla 2.1. Comparación de TAR a partir de CCM y lodos activados en términos energéticos, económicos y ambientales [8].

	Beneficios	CCM	Lodos activados
Energéticos	Energía generada (kWh/ kg-DQO)	0.1	0
	Energía consumida (kWh/ kg-DQO)	0.04	0.55
Económicos	Costos de inversión (\$/ kg-DQO)	3	0.1
	Costos de operación (\$/ kg-DQO)	0.0005	0.12
Ambientales	Rendimiento de lodos (VSS/ g-DQO)	0.1	0.6

Hernández-Fernández *et al.* [10] describieron que las principales ventajas de las CCMs, cuando se implementan en el TAR son: (a) conversión directa de energía del sustrato a electricidad; (b) menor producción de lodos en comparación con los procesos de digestión anaeróbica y lodos activados; (c) resistencia al estrés ambiental y monitoreo en tiempo real; (d) producción de energía limpia sin necesidad de separación, purificación y conversión de los productos energéticos; (e) ahorro de energía, ya que consumen alrededor del 10% de la energía producida para su operación; y (f) aplicación generalizada en lugares con infraestructura eléctrica insuficiente. Además, las CCMs se pueden integrar como unidad de pretratamiento, postratamiento o de forma paralela con otros sistemas de tratamientos para mejorar la eficiencia de remoción de contaminantes y producir energía eléctrica [11].

Por otro lado, las CCMs son una tecnología incipiente presentando diversas áreas de oportunidades y desafíos en sus componentes. Logan y Rabaey [12] mencionan que el principal desafío para el escalamiento de una CCM es la baja producción de energía eléctrica y, además, la comercialización se ve limitada debido al elevado costo de los electrodos y materiales asociados.

2.1. Fundamentos de una celda de combustible microbiana

En la Figura 2.1 se presenta el esquema típico de una CCM de cámara doble tipo H (utilizada para evaluaciones de los componentes a escala de laboratorio), la cual está compuesta por una cámara anódica y una catódica, separadas por una membrana de intercambio protónico (MIP) [13]. Cabe destacar que existen otros diseños de las CCMs que pueden operar a mayor escala en modo continuo y por lotes, pero se necesitan utilizar catalizadores más selectivos.

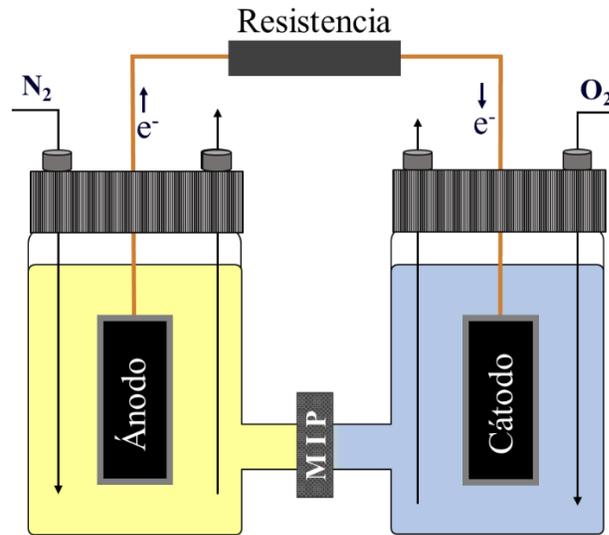
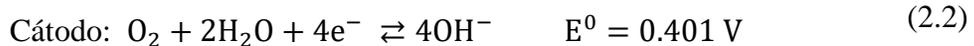


Figura 2.1. Estructura típica de una CCM de cámara doble.

Los electrones son generados por la respiración de los MEA y se transfieren a la superficie del ánodo, lo cual puede ocurrir por diferentes mecanismos de transferencia extracelular de electrones (TEE) [14]. Estos electrones fluyen a través de un circuito externo y reaccionan en el cátodo durante la reacción de reducción de oxígeno (RRO).

Las ecuaciones (2.1) y (2.2) muestran las reacciones electroquímicas de ánodo y cátodo que tienen lugar en una CCM que utiliza glucosa como sustrato en la cámara anódica y oxígeno disuelto en un electrolito alcalino de la cámara catódica, con sus respectivos potenciales estándar:



La descarga de electrones y generación de energía eléctrica en las CCMs se rige por varios factores físicos, biológicos y operativos. El voltaje experimental de estas celdas es inferior a su valor termodinámico por tres tipos de irreversibilidades: polarización por activación, pérdidas óhmicas y polarización por concentración [15]. En la Figura 2.2 se presenta una curva de polarización idealizada, utilizada para comprender la influencia de las resistencias externas e internas que provocan las pérdidas irreversibles.

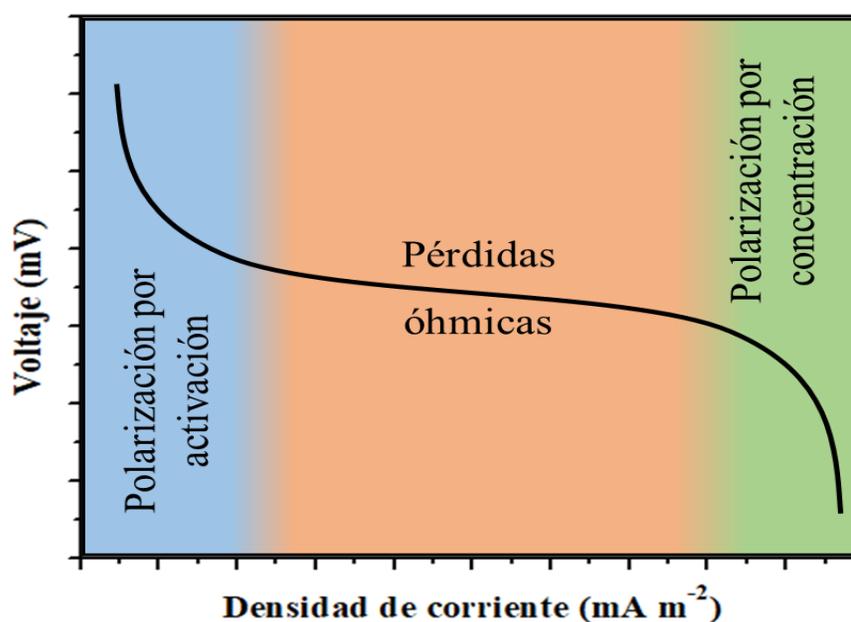


Figura 2.2. Curva de polarización voltaje vs densidad de una celda de combustible, mostrando las principales pérdidas por irreversibilidades.

De acuerdo con Oliveira *et al.* [16], la polarización por activación es dominante a bajas densidades de corriente como resultado de la energía de activación necesaria para que las especies reaccionen. En el caso de las CCMs, se genera una barrera de energía o polarización por activación inducida por la dificultad que poseen los microorganismos para transferir electrones al ánodo. Dicha barrera puede minimizarse mediante la mejora de la biocompatibilidad, aumento en el espacio bacteriano y aumento de la transferencia de electrones con catalizadores alternativos para el ánodo [17].

Al alcanzar un rango medio de densidades de corriente, las pérdidas predominantes son las óhmicas, debido principalmente a la resistencia iónica y eléctrica. Estas pérdidas pueden reducirse acortando la distancia entre los electrodos, aumentando la conductividad iónica de los electrolitos y minimizando resistencias de contacto entre los diversos elementos de la celda [18]. Por otra parte, las principales pérdidas a densidades de corriente altas son resultado de la polarización por concentración, provocada por la incapacidad para mantener la concentración inicial del sustrato y las limitaciones de transporte de masa. Esta pérdida se puede reducir con la agitación, incrementando la presión de gases y optimizando el diseño de la CCM [16].

Las diferentes condiciones de operación también tienen influencia significativa sobre el rendimiento de las CCMs. Con respecto al efecto de la temperatura, Li *et al.* [19] reportaron que valores de aproximadamente 38 °C son ventajosos, especialmente al inicio del proceso y posteriormente la CCM puede operar a temperaturas más bajas sin una reducción considerable del rendimiento.

También, las CCMs deben operar a una tasa de carga orgánica óptima para evitar la producción de metano y conseguir un mejor desempeño. Además, un aumento en el flujo del sustrato induce a un incremento en la potencia de salida, pero provoca una disminución del tiempo de retención hidráulica, y por ende, una disminución de la eficiencia de eliminación de la demanda química de oxígeno (DQO) [20].

Oliveira *et al.* [16] reportaron que un ánodo acidificado puede afectar la estabilidad de la biopelícula y, por consiguiente, la potencia de la celda. En general, se considera que una ventana de pH comprendida entre 6 y 9 es adecuada para el crecimiento de biopelículas estables y electroquímicamente activas; sin embargo, existen microorganismos que presentan mejor desempeño fuera de el intervalo mencionado. De manera opuesta, una disminución en el pH (al considerar un electrolito con pH cercano a la neutralidad) de la cámara catódica beneficia la RRO, y consecuentemente, la CCM genera mayor densidad de corriente.

2.2. Desempeño de las celdas de combustible microbianas

El desempeño de las CCMs se puede determinar evaluando parámetros energéticos como voltaje de circuito abierto (VCA), potencia (P) y corriente (I); y parámetros de eficiencia de

tratamiento biológico como remoción de DQO, demanda bioquímica de oxígeno (DBO) o carbono orgánico total (COT) [21].

Las curvas de polarización caracterizan las celdas de combustible en términos de generación de energía. El término polarización representa el cambio del voltaje desde su estado de equilibrio debido al flujo de corriente. Zhao *et al.* [22] detallaron cuatro opciones para la obtención de curvas de polarización o voltaje de la celda-corriente ($V_{\text{celda}}-I$): (a) variación de resistencia externa, (b) polarización potenciodinámica, (c) descarga galvanostática, y (d) descarga potencioestática. Sin embargo, la primera opción es la más empleada para obtener las curvas de polarización, que permiten determinar el VCA e I de las CCMs.

El VCA es la fuerza electromotriz (F_{em}) de la celda que se mide cuando el ánodo y el cátodo no están conectados entre sí; es decir, es el voltaje máximo que se obtiene de una celda con resistencia infinita y sin flujo de corriente [23]. No obstante, cuando la CCM es conectada a una resistencia externa de valor conocido R genera una corriente I que se calcula utilizando la ley de Ohm, ecuación (2.3):

$$I = \frac{V_{\text{celda}}}{R} \quad (2.3)$$

Por su parte, el V_{celda} (cuyo valor varía en función de la resistencia R aplicada) se mide directamente de la diferencia de potencial entre el ánodo y el cátodo de la celda, obteniendo así una curva de polarización. A partir de estas curvas de polarización $V_{\text{celda}}-I$ se pueden obtener curvas de potencia $P-I$, la cual permite comparar el desempeño de celdas de combustible [24].

Sin embargo, los parámetros de I y P se deben normalizar con respecto al área geométrica del ánodo ($A_{\text{ánodo}}$) o el volumen de sustrato (v_{sustrato}). De este modo, se obtienen densidades de corriente y de potencia geométricas o volumétricas (j_a y j_v ; P_a y P_v , respectivamente). Esto se lleva a cabo para realizar cálculos ingenieriles de escalamiento y comparar el desempeño de celdas con diferentes configuraciones y volúmenes [21]. Estos parámetros se calculan empleando las ecuaciones (2.4 - 2.7).

$$j_a = \frac{V_{\text{celda}}}{R * A_{\text{ánodo}}} \quad (2.4)$$

$$j_v = \frac{V_{\text{celda}}}{R * v_{\text{sustrato}}} \quad (2.5)$$

$$P_a = j_a * V_{\text{celda}} \quad (2.6)$$

$$P_v = j_v * V_{\text{celda}} \quad (2.7)$$

También, se pueden utilizar otras técnicas electroquímicas para comprender los fenómenos que ocurren en la CCM y así mejorar su desempeño. Por ejemplo, las técnicas voltamperométricas se utilizan para deducir los mecanismos de transferencia de electrones entre los MEAs y el ánodo, para la caracterización de biopelículas y evaluar las cinéticas de las reacciones bioelectroquímicas [25].

2.3. Ánodos para celdas de combustible microbianas

El ánodo es el electrodo que recibe los electrones generados por el metabolismo de los MEA, a partir de la oxidación de los compuestos orgánicos. El crecimiento de microorganismos en la superficie del ánodo depende de la biocompatibilidad entre ambos, de esta manera, el ánodo puede aceptar los electrones con la menor resistencia [26].

Por lo tanto, la selección de un catalizador adecuado mejora la transferencia de electrones entre los MEA y el ánodo, e incrementa la eficiencia de generación de energía eléctrica en la CCM [27].

Los catalizadores usados como ánodos deben ser conductores eléctricos, además de tener alta resistencia a la corrosión, biocompatibilidad, estabilidad química con el sustrato y área superficial elevada [15].

Diversos materiales carbonosos y metálicos poseen dichas características. Por ejemplo, los materiales carbonosos son atractivos por su bajo costo y biocompatibilidad [28]; mientras que los materiales metálicos son conductores, robustos y en algunos casos relativamente económicos, aunque todavía presentan algunos desafíos para mejorar su resistencia a la corrosión [29]. En la Figura 2.3 se presenta una línea de tiempo de los avances que se han realizados en el desarrollo de ánodos.

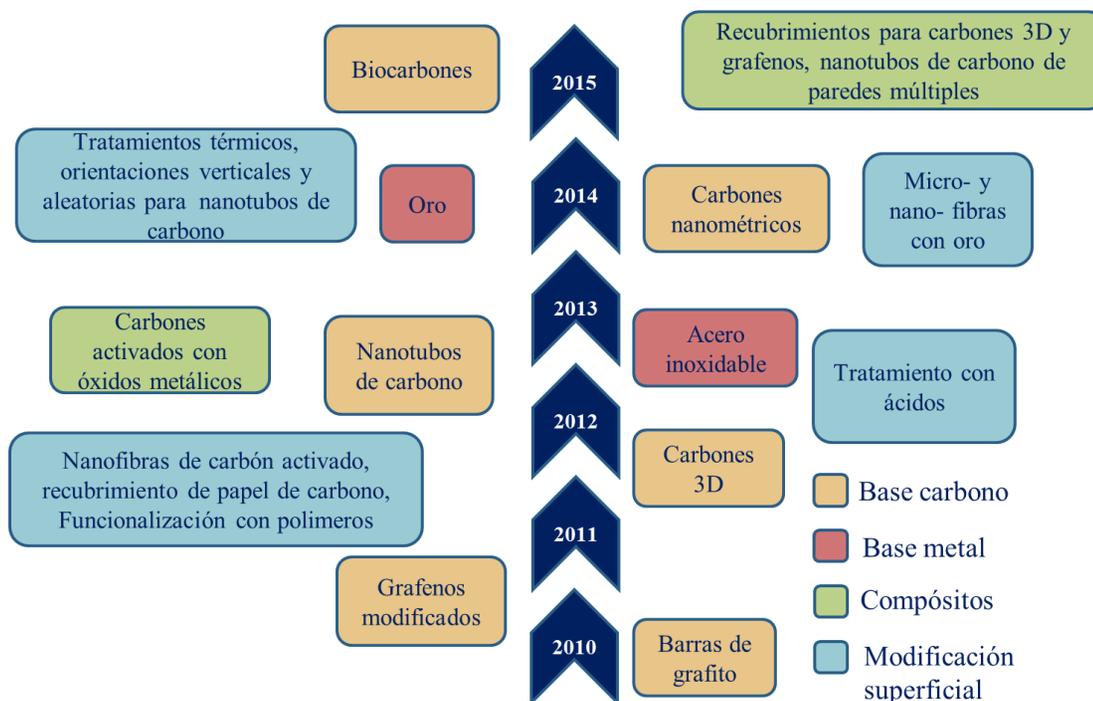


Figura 2.3. Línea de tiempo de los principales desarrollos de ánodos en CCM [29].

En la Figura 2.4 se exhiben los materiales tradicionales de carbono que se han utilizado como ánodos en CCMs [30]. Una desventaja de los materiales tradicionales es que poseen baja porosidad y reducida área superficial, por lo que se han utilizado como soporte para catalizadores carbonosos que posean las características deseadas, y así, mejorar la TEE y el rendimiento de las CCMs [31].

La presencia de heteroátomos (HA) y polímeros conductores en los catalizadores mejoran la biocompatibilidad, debido a que los grupos funcionales poseen cargas que favorecen la interacción con los MEA [32]. También, los tratamientos térmicos incrementan el área superficial y rugosidad, que en principio proveen más espacio para el crecimiento de los MEA y una TEE más rápida [33]. Otra modificación para mejorar el rendimiento de una CCM consiste en la funcionalización de catalizadores carbonosos con una solución de metanol y tratamiento térmico en un horno de microondas [34, 35].

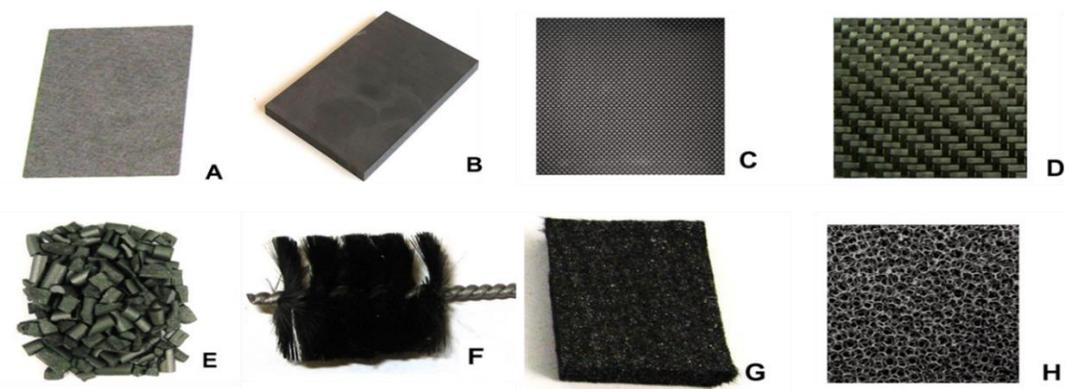


Figura 2.4. Materiales tradicionales de carbono usados en CCMs: (A) papel de carbono, (B) placa de grafito, (C) tela de carbono, (D) malla de carbono, (E) grafito granular, (F) brocha de carbono, (G) fieltro de carbono y (H) carbón vítreo reticulado [30].

2.3.1. Grafeno

El grafeno, descubierto por Novoselov *et al.* [36], es un material plano bidimensional de un átomo de espesor conformado por átomos de carbono con hibridación sp^2 , dispuestos en una celosía de panal de abeja. Una monocapa de grafeno es conocida por aglomerarse y formar multicapas a través de interacciones de Van der Waals con características sobresalientes como gran área superficial y excelente resistencia mecánica, que pueden aumentar la biocompatibilidad con los MEA [37]. Además, los grafenos pueden modificarse con tratamientos térmicos y funcionalización química para obtener sitios activos que mejoran el rendimiento catalítico y la TEE [33].

Por otra parte, los grafenos dopados con HA representan una alternativa conveniente debido a su estabilidad química, desempeño electroquímico y viabilidad económica sobre los costosos catalizadores basados en Pt [38]. Cabe destacar que los grafenos codopados (por lo general, con dos HA) presentan mayor actividad catalítica que los dopados con un HA [39]. Además, estos beneficios se realzan al utilizar un método de síntesis verde (por ejemplo, síntesis mecanoquímica) para la fabricación de estructuras novedosas con propiedades químicas mejoradas [40].

Yi y Shen [41] discutieron diversos métodos para producir grafenos. En particular, destacan que la molienda por bolas es adecuada para la exfoliación de hojuelas de grafito, dando lugar a la síntesis de grafeno.

2.3.2. Biocarbones

Recientemente, ánodos tridimensionales han mostrado mejor rendimiento que los ánodos bidimensionales debido a su área superficial [42]. Diversos residuos de biomasa pueden ser transformados en carbón (biocarbón) con estructura tridimensional porosa, lo que mejora su biocompatibilidad para aplicación en CCMs; al mismo tiempo, resuelve en parte el problema de disposición de desechos sólidos [43]. Los biocarbones son candidatos prometedores a catalizadores para ánodos; además son de menor costo que catalizadores como Pt o Pd, aunque todavía requieren más evaluaciones [44].

En este grupo se clasifican los residuos de cebolla. De esta biomasa la piel, las primeras capas y los extremos contienen flavonoides, carbohidratos, compuestos azufrados, azúcares, vitaminas, aminoácidos, ácidos fenólicos, ácidos orgánicos y minerales [45]. Esta composición podría brindar propiedades catalíticas interesantes a los biocarbones obtenidos a partir de estos residuos.

Esto es relevante, ya que Sharma *et al.* [46] establecieron que los residuos de cebolla presentan un problema para la industria procesadora porque: (i) no son adecuados como forraje para animales debido a su fuerte olor acre característico; (ii) no se pueden utilizar como fertilizantes debido al rápido desarrollo de agentes fitopatógenos como *Sclerotium cepivorum*; y (iii) su eliminación en vertederos resulta en altos costos económicos y de un impacto ambiental severo.

De acuerdo con la literatura, se ha empleado cebolla entera para sintetizar catalizadores carbonosos dopados para ánodos [47] y cátodos de CCMs [47, 48]; por otro lado, la piel de la cebolla se ha utilizado para sintetizar biocarbones con aplicación como adsorbentes de metales pesados [49, 50], colorantes [51] y catalizadores tipo núcleo-coraza para la RRO [52]. El único estudio donde se han utilizado residuos de cebolla con un objetivo similar al de esta investigación, presentó la síntesis de puntos cuánticos de carbono fluorescente [53].

2.4. Cátodo en celdas de combustible microbianas

El cátodo también es un componente determinante en el desempeño de las CCMs ya que como se mencionó, en este electrodo tiene lugar la RRO. Los catalizadores utilizados en cátodos se pueden clasificar en tres grupos: i) metales del grupo del platino (MGP), ii)

catalizadores carbonosos o libres de metal; y iii) catalizadores libres de MGP [31]. Los MGP son los catalizadores con mayor actividad catalítica para la RRO a valores de pH muy alcalinos o muy ácidos, aunque se ha planeado limitar su uso debido a su alto costo [7]. Por su parte, los compuestos nanoestructurados de carbono son considerados como una alternativa prometedora por su actividad catalítica y las características que se mencionan en la sección 2.3 [54].

También se han desarrollado biocátodos (electrodos que utilizan microorganismos como biocatalizadores para la reacción catódica) que mejora la viabilidad económica y ambiental de las CCM [5, 15]. El uso de biocátodos ha permitido la expansión de aplicaciones de las CCMs como la producción de hidrógeno, remediación de compuestos recalcitrantes, fijación de CO₂, remoción de nutrientes y recuperación de metales, entre otros [55].

2.5. Microorganismos para celdas de combustible microbianas

La mayoría de los microorganismos usan la respiración para convertir la energía bioquímica en adenosín trifosfato (ATP) por medio de una serie de reacciones intercelulares, en las cuales ciertas proteínas actúan como intermediarios para transferir electrones hacia el aceptor final de electrones.

Por su parte, los MEAs emplean la TEE como mecanismo de transferencia de electrones a la superficie de un aceptor sólido, como el ánodo. Torres *et al.* [56] detallaron los fundamentos y la cinética de los mecanismos de TEE: (a) transferencia directa de electrones, (b) metabolitos intermedios como lanzaderas de electrones a través de pares redox; y (c) matriz sólida conductora que transportan los electrones (Figura 2.5).

Los MEA son un componente importante en el desempeño de una CCM, y es fundamental que formen una biopelícula en la superficie del ánodo (biopelícula electroquímicamente activa, BEA), para promover la transferencia de los electrones y la actividad bioelectrogénica [26].

Con base en Zhang *et al.* [11] las biopelículas son agregados de células vivas y muertas, sustancias poliméricas extracelulares y numerosas materias orgánicas e inorgánicas formadas por redes bioquímicas complejas.

Proceso cinético	Ecuación	Fórmula	Categoría
①	Monod	$j = j_{max} \frac{S}{K_{s,app} + S}$	Pérdidas de potencial intracelular
②	Nernst-Monod	$j = j_{max} \left(\frac{1}{1 + \exp[-F/RT(E_{MO} - E_{KA})]} \right)$	
③a	Ley de Fick	$j = nF \frac{D_{Lanz} \Delta C_{Lanz}}{L}$	Pérdidas de potencial extracelular
③b	Ley de Ohm	$j = -\frac{\kappa_{bio}(E_{MO} - E_{interface})}{\Delta z}$	
④	Butler-Volmer	$j = -j_0 \exp \left[\frac{nF(1 - \alpha)(E_{ánodo} - E^0)}{RT} \right]$	

Figura 2.5. Esquema de tres mecanismos de TEE utilizados por MEA: (a) transferencia directa de electrones, (b) lanzaderas electrónicas y (c) matriz sólida conductora. En cada mecanismo, se indican por número los procesos cinéticos relevantes para la producción de corriente en la respiración bacteriana: (1), uso del sustrato; (2) producción de electrones; (3a) transporte de lanzadera de electrones entre el MEA y el ánodo; (3b) transporte de electrones a través de una matriz conductora sólida; y (4) interfaz de transferencia de electrones al ánodo [56].

Una biopelícula relativamente gruesa puede dificultar el flujo de electrones; por lo tanto, para generar una mayor potencia de salida en una CCM se requiere un espesor óptimo de biopelícula [15]. Hasta el momento, el espesor óptimo no se ha determinado.

Existen MEA que pueden ser encontrados en efluentes industriales y ambientes naturales. Una parte de estos microorganismos se pueden cultivar en laboratorio y emplearse como monocultivos o como cultivos mixtos. Por ejemplo, algunos estudios se han realizado con monocultivos de *Geobacter sulfurreducens*, *Rhodospirillum rubrum*, *Aeromonas hydrophila*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas otitis*, *Escherichia coli*, *Shewanella oneidensis* y *Shewanella haliotus*; mientras los cultivos mixtos son obtenidos principalmente de biorreactores anaeróbicos [57].

En particular, *Bacillus subtilis* (*B. subtilis*) es una bacteria Gram positiva (BGP) no patógena, considerada como organismo modelo para la investigación fundamental y aplicada, ya que posee la capacidad de esporular, formar biopelículas y adaptarse a las condiciones fluctuantes durante cambios ambientales [58].

La pared celular de BGP está generalmente compuesta de 90% de peptidoglicano y 10% de ácido teicoico. Este ácido permite que el microorganismo se adhiera a la superficie del ánodo, contribuyendo a la formación de la biopelícula [59]. En la Tabla 2.2 se presenta un resumen de las investigaciones donde se ha empleado *B. subtilis* como MEA en CCMs.

Tabla 2.2. Estudios en los que se ha empleado *B. subtilis* como MEA en CCMs.

Sustrato	Tipo de CCM	Ref.
Glucosa	Cámara doble	[60, 61]
Glucosa	Cámara simple	[62]
2, 4-diclorofenol	Cámara doble	[63]
Glicerol	Cámara simple	[64]
Agua Sintética	Cámara simple	[59]
Agua Sintética	Cámara doble	[65]
Agua Residual Doméstica	Cámara doble con flujo ascendente	[66]
Agua Residual Farmacéutica	Cámara doble	[67]
Agua Residual Farmacéutica	Cámara doble	[68]

Nimje *et al.* [60], [61] demostraron por primera vez el uso de *B. subtilis* en una CCM de cámara doble utilizando glucosa como sustrato. También, Nimje *et al.* [62] utilizaron glucosa como sustrato para que *B. subtilis* produjera energía eléctrica. De acuerdo al reporte de Hassan *et al.* [63] *B. subtilis* es una bacteria potencialmente exoelectrogénica al usar un sustrato de 2,4 diclorofenol. El glicerol también se ha utilizado como sustrato en una CCM de cámara simple [64].

Por otra parte, agua residual sintética ha sido empleada como sustrato en CCMs de cámara simple y doble por Modestra y Mohan [59] y Liu *et al.* [65], respectivamente. Sin embargo, Ismail y Jaeel [66] reportaron el primer trabajo utilizando agua residual doméstica y *B. subtilis*. Recientemente, Carrillo-Rodríguez *et al.* [67] y Garcia-Mayagoita [68] emplearon *B. subtilis* para evaluar la generación de energía eléctrica a partir de un sustrato complejo como ARF.

2.6. Sustratos para celdas de combustible microbianas

Diversos compuestos orgánicos pueden utilizarse como sustratos en las CCMs para la generación de energía eléctrica. Los principales combustibles metabólicos (carbohidratos, ácidos grasos y aminoácidos) son monómeros de las aguas residuales complejas. El uso de sustratos simples ha sido la elección de investigadores que se centran en diferentes aspectos fundamentales de las CCMs que operan con monocultivos.

Pandey *et al.* [7] enlista algunos de los principales sustratos simples que se han utilizado: hexosas, pentosas, derivados de azúcares, alcoholes, polialcoholes, aminoácidos, compuestos heterocíclicos nitrogenados, ácidos orgánicos, entre otros.

Por su parte, las aguas sintéticas (de composición química controlada) son sustratos simples que contienen micronutrientes, entre otros compuestos. Por otro lado, las aguas residuales (por ejemplo, las aguas residuales farmacéuticas, ARFs) están conformadas por una variedad de compuestos orgánicos entre otros elementos, algunos de los cuales podrían disminuir el rendimiento de las CCMs.

De acuerdo con Wang y Ren [69], el primer estudio de CCMs que utilizó aguas residuales como sustrato fue reportado en 2004, y desde entonces se han publicado diversos estudios que muestran la producción de energía eléctrica a partir de una gran variedad de aguas residuales. En la Tabla 2.3 se resumen algunos estudios desarrollados por diversos grupos de investigación empleando varios tipos de aguas residuales en CCMs, así como otros elementos en su configuración.

Cabe destacar que las ARFs pueden contener solventes orgánicos, catalizadores, aditivos, reactivos, intermediarios, materias primas e ingredientes farmacéuticos activos, que aumentan la carga de DQO, salinidad y toxicidad [70]. La presencia de estas sustancias tóxicas y recalcitrantes resulta en una baja eficiencia de remoción de DQO al utilizar métodos biológicos tradicionales, como lodos activados [71].

Tabla 2.3. Desempeño de CCMs con diferentes aguas residuales. Modificado de [7].

Agua residual	Inóculo	Tipo de CCM	Ánodo//Cátodo	Pa (mWm ⁻²)	Rem DQO (%)
Residuos acidogénicos lixiviados	Lodo anaerobio	Cámara doble	Fieltro de carbón	432	> 87
Destilería de alcohol	Agua residual de destilería	Cámara doble	Papel de carbono	124	88.4
Cervecería	Agua residual de cervecería	Cámara simple	Fibra de carbono//Pt/C	669	20.7
Molino de yuca	Cultivo mixto	Cámara doble	Placas de grafito	1771	72
Celulosa	Agua residual doméstica	Cámara simple	Papel de carbono//Pt/C	1070	70
Industria láctea	Cultivo de caldo aislado	Cámara doble	Placas de grafito	202	71.8
Doméstica	Lodos activados	Membrana de flujo ascendente	Brocha de fibra de carbono	481	77.9
Industria de alimentos	Lodo activado	Cámara doble	Placas de grafito	230	86
Melaza	Lodo anaerobio	Reactor de flujo ascendente	Grafito granular//Papel de carbono	1410	53.2
Aceite de palma	Pseudo-monas	Cámara doble	Grafito	451	3
Industria porcina	Agua residual porcina	Cámara simple	Papel de carbono	228	84
Farmacéutica recalcitrante	Consorcio anaerobio	Cámara simple	Placas de grafito	205	85
Matadero	Lodo anaerobio	Cámara doble	Tela de carbón//Malla de Ti y Pt	578	93

Sin embargo, la concentración elevada de DQO permite que las ARFs sean un candidato potencial para tratarlas en las condiciones anaeróbicas de CCMs. En la Tabla 2.4 se resumen las investigaciones que han utilizado ARFs como sustrato en CCMs.

Tabla 2.4. Uso de ARFs como sustrato en CCMs.

Sustrato	Inóculo	Tipo de CCM	Ref.
ARF sintética	Consorcio anaeróbico	Cámara simple	[72]
ARF	Consorcio anaeróbico	Cámara simple	[73]
ARF	Consorcio anaeróbico	Cámara simple	[74]
ARF	Consorcio anaeróbico	Cámara simple	[75]
ARF	<i>B. subtilis</i>	Cámara doble	[67]
ARF	<i>B. subtilis</i>	Cámara doble	[68]

Wen *et al.* [72] han reportado que la materia orgánica tóxica y biorefractaria contenida en las ARFs podría ser utilizada como sustrato en una CCM, con una mezcla sintética de glucosa y penicilina. Por otra parte, un efluente industrial farmacéutico recalcitrante, caracterizado por su composición compleja y alta toxicidad fue utilizado como sustrato en una CCM de cámara simple con inóculo de consorcio anaeróbico [73]. También fue reportado el uso de ARF obtenida de la producción de fármacos esteroideos [74].

Velvizhi y Mohan [75] reportaron un sistema de CCM que mejoró el tratamiento de ARF de baja biodegradabilidad con relación al tratamiento anaeróbico convencional. Igualmente, Carrillo-Rodríguez *et al.* [67] y Garcia-Mayagoita [68] han reportado el uso de ARF como sustrato para la generación de energía eléctrica en una CCM de cámara doble con bioánodos de *B. subtilis*, como se describió en el apartado 2.5.

Capítulo 3. Justificación

El tratamiento de aguas residuales es la necesidad de saneamiento más básica para proteger el ambiente y las reservas de agua, que sirven como fuentes de agua potable para la población. Los procesos de tratamientos de agua residuales actuales son energéticamente demandantes, liberan gases del efecto invernadero y producen un excedente de lodos, los cuales deben tratarse o disponerse adecuadamente [76].

Actualmente, la sociedad es cada vez más consciente de que las aguas residuales podrían ser una fuente valiosa de energía (contienen entre 3 y 10 veces más energía que la necesaria para su tratamiento) en lugar de “desperdicio” [16].

En particular, las ARFs pueden tener un impacto negativo sobre el ambiente y la salud humana, ya que contienen una variedad de compuestos recalcitrantes que los procesos biológicos tradicionales en las plantas de tratamiento de aguas residuales (TAR) no pueden eliminar. Sin embargo, se ha demostrado que las CCM poseen una buena eficiencia de remoción de DQO y generación de energía eléctrica al tratar ARFs.

Por su parte, *B. subtilis* es una bacteria electroquímicamente activa, aunque sigue siendo necesario conocer su efectividad al utilizar sustratos de composición compleja como ARF. Por otro lado, muchos de los beneficios ambientales y energéticos de la CCM aún no se han demostrado en instalaciones reales debido a la baja generación de potencia, al uso de materiales costosos y con baja eficiencia catalítica de las reacciones involucradas; es decir, existen diversas áreas de oportunidad para lograr la comercialización de las CCMs. Una de éstas es el desarrollo de catalizadores anódicos que mejoren el desempeño de las CCMs y que sean de bajo costo.

Por tal razón, es de interés el desarrollo de catalizadores carbonosos basados en grafeno y biocarbón obtenido de residuos de cebolla que podrían presentar las características deseadas como ánodos, para una CCM que opera con ARF y *B. subtilis*.

Capítulo 4. Objetivos

4.1. Objetivo General

Desarrollar ánodos basados en catalizadores carbonosos modificados superficialmente mediante métodos térmicos, mecánicos y de funcionalización química para la generación de energía eléctrica y el tratamiento de ARF en una CCM.

4.2. Objetivos Específicos

- Evaluar la actividad catalítica de ánodos con catalizadores carbonosos y bioánodos con biopelícula de *B. subtilis* mediante técnicas electroquímicas utilizando ARF como electrolito.
- Analizar el desempeño del bioánodo más activo en una prueba de larga duración en una CCM para la generación de energía eléctrica y el tratamiento de ARF.

Capítulo 5. Metodología

5.1. Reactivos

En la Tabla 5.1 se presentan los reactivos empleados durante el desarrollo de esta investigación con sus respectivos proveedores y usos.

Tabla 5.1. Reactivos con sus respectivos proveedores y usos.

Reactivo	Proveedor	Uso
HCl (37 %)	Sigma-Aldrich	Síntesis de catalizadores
Hojuelas de grafito (malla 100)		
Tiourea (99 %)		
ZnCl ₂ (98 %)		
Peptona de caseína	BDBioxon	Preparación de medio de cultivo
Extracto de levadura		
Agar	Sigma-Aldrich	
NaCl (99 %)		
Gas nitrógeno (99%)	Infra	Caracterización electroquímica
Gas oxígeno (99%)		
Electrodo de difusión de gas	BASF	
2-propanol (99.9 %)	Baker	Preparación de electrodos
Nafión (5% p/v)	Sigma-Aldrich	
Pt/C (relación catalizador:soporte de 20:80 % e.p.)	E-TEK	
Membrana de Nafión [®] 117	Ion Power	Activación de membrana
H ₂ O ₂ (30 %)	Baker	
KOH (90%)	Sigma-Aldrich	
H ₂ SO ₄ (95 %)		
Agua desionizada	Suminorte	Preparación de soluciones

5.2. Residuos de cebolla

Los residuos de cebolla conformados por la piel, las primeras capas y los extremos; fueron separados de cebollas moradas obtenidas en un mercado local de Ramos Arizpe, México. Posteriormente, los residuos fueron secados a 105 °C por 24 h y luego fueron triturados en un procesador de alimentos para reducir el tamaño. Estos residuos de cebolla morada (RC) se utilizaron como materia prima para obtener los biocarbones.

5.3. Agua Residual Farmacéutica

El agua residual farmacéutica (ARF) se recolectó empleando el método de muestra compuesta establecido en la Norma Mexicana “Aguas Residuales-Muestreo” (NMX-AA-003-1980). Las muestras se obtuvieron del efluente directo de la fábrica (sin tratamiento previo), las cuales fueron trasladadas al laboratorio en un baño de hielo y se almacenaron en un congelador a $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$. Tres días antes de utilizar el ARF, la muestra fue descongelada y almacenada a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Antes de usar una porción de la muestra compuesta se equilibró térmicamente a temperatura ambiente y se midió el pH (obteniendo un valor de 9.2) para realizar cálculos descritos en próximas secciones.

5.4. Microorganismo

Se empleó *B. subtilis* como MEA. Las colonias de *B. subtilis* se sembraron en placas Petri desechables con agar nutritivo LB (composición: 10 g L^{-1} peptona de caseína, 5 g L^{-1} extracto de levadura, 10 g L^{-1} NaCl, 15 g L^{-1} agar, pH final 7 ± 0.2) a $30 \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 48 h. Enseguida, las colonias aisladas de la placa Petri fueron inoculadas en un matraz Erlenmeyer con caldo nutritivo LB (composición: 10 g L^{-1} peptona de caseína, 5 g L^{-1} extracto de levadura, 10 g L^{-1} NaCl, pH final 7 ± 0.2) y se encubaron aeróbicamente con movimiento orbital y temperatura de $28 \pm 2\text{ }^{\circ}$ durante 72 h. El agar y caldo nutritivo se esterilizaron a $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 15 min antes de sembrar *B. subtilis*.

5.5. Síntesis de catalizadores carbonosos

5.5.1. Grafeno dopado con nitrógeno y azufre

Para la síntesis de grafeno dopado con nitrógeno y azufre (GNS) se pulverizó una mezcla de hojuelas de grafito, tiourea y ZnCl_2 con una relación en peso 1:1:1 en un molino de bolas (Retsch PM200) a 300 rpm durante 8 h, con pausas de 30 min por cada hora de molienda [77]. La relación en peso entre bolas y mezcla fue de 15:1, respectivamente. Posteriormente, el polvo recuperado fue pirolizado a $500\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 1 h, con una rampa de calentamiento de $10\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$. El polvo obtenido fue lavado con una solución de HCl 1 M y agua desionizada, filtrado al vacío y secado a $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 24 h.

5.5.2. Biocarbón a partir de residuos de cebolla

El biocarbón a partir de residuos de cebolla se sintetizó de la siguiente manera: los residuos secos de cebolla morada (RC) se carbonizaron a 400 °C durante 90 min con una rampa de calentamiento de 5 °C min⁻¹ en atmósfera de N₂. Los RC carbonizados se mezclaron con ZnCl₂ en una relación en peso de 1:2, respectivamente, y se adicionaron 50 mL de agua desionizada por cada gramo de RC carbonizado [78]. La mezcla se mantuvo en agitación constante durante 4 h a 60 °C.

Posteriormente, la pasta obtenida fue secada a 110 °C durante 18 h. La mezcla seca se pirolizó durante 2 h con una rampa de calentamiento de 10 °C min⁻¹ y atmósfera de N₂ a tres temperaturas diferentes: 400 °C (CCA4), 600 °C (CCA6) y 800 °C (CCA8). Las muestras se filtraron, lavaron y secaron a las mismas condiciones que el GNS.

5.5.3. Funcionalización de catalizadores carbonosos

Los catalizadores GNS y CCA fueron funcionalizados mediante calentamiento intermitente por microondas al dispersar lotes de 300 mg en 30 mL de metanol 0.15 M [34, 35]. Cada lote fue sonicado durante 30 min en un baño de ultrasonido y luego con agitación magnética por 1 h a temperatura ambiente para obtener una mezcla homogénea. Posteriormente, la mezcla se trató térmicamente en un horno de microondas durante 8 min, agitación constante, reflujo y pulsos de calentamiento y enfriamiento de 25 y 15 s, respectivamente.

Enseguida, los polvos obtenidos fueron filtrados, lavados con agua desionizada y secados a 60 °C durante 24 h. Por último, se calcinaron a 200 °C durante 30 min y se molieron en un mortero de ágata. La nomenclatura para los catalizadores funcionalizados fue: GNSF, CCA4F, CCA6F y CCA8F.

5.6. Fabricación de ánodos y cátodos

Se utilizaron piezas de electrodo de difusión de gas como soporte con área geométrica de 2 cm² (1 × 2 cm). En su parte posterior se fijó un alambre de cobre, cuya función es la de contacto eléctrico, empleando tinta de plata.

Enseguida, se delimitó un área expuesta de 1 cm² con resina epóxica. Se prepararon tintas catalíticas de cada uno de los catalizadores carbonosos funcionalizados, Nafión y 2-propanol

con una relación catalizador: Nafión: 2-propanol de 5 mg: 64 μ L: 64 μ L, respectivamente. Las tintas se dispersaron en un baño de ultrasonido por 30 min.

A continuación, se depositó por separado el área expuesta de los soportes con las tintas catalítica utilizando la técnica de deposición por goteo con micropipeta. Por último, los ánodos se colocaron en un desecador previo a su uso.

Para la fabricación del cátodo se empleó el mismo procedimiento que los ánodos, depositando una tinta catalítica de Pt/C comercial, Nafión y 2-propanol; con una relación de 10 mg Pt/C cm^{-2} : 69 μ L: 69 μ L, respectivamente.

5.7. Formación de bioánodos

Los ánodos se introdujeron en caldo nutritivo LB inoculado con *B. subtilis* en condiciones anaeróbicas, agitación orbital constante y temperatura de 30 ± 2 °C durante 6 días; obteniendo un bioánodo con una biopelícula sobre la superficie del ánodo.

5.8. Caracterización fisicoquímica

La cristalinidad de los catalizadores se evaluó mediante de difracción de rayos x (DRX) utilizando un difractómetro Bruker (D2 PHASER) con una lámpara de Cu $K\alpha$ ($\lambda=1.54184$ Å), en un intervalo de ángulo de difracción doble (2θ) de 10 a 100°. La caracterización de la estructura molecular de los catalizadores carbonosos se realizó mediante la técnica de espectroscopía Raman con un microscopio Thermo Scientific (DXR Raman Microscope), una fuente de 633 nm y lente objetivo de 50x.

También, se realizó una identificación de los grupos funcionales de los catalizadores carbonosos por espectroscopía de infrarrojo con transformada de Fourier (FTIR) en modo de reflexión total atenuada (RTA) en un espectrómetro Bruker (Tensor II) con cristal de diamante. El análisis termogravimétrico (ATG) de los catalizadores se realizó en un analizador SDT Q600 con un flujo de N_2 de 50 mL min^{-1} y con una rampa de calentamiento de 10 °C min^{-1} .

Para los catalizadores funcionalizados se determinó el área superficial por el método BET (Brunauer-Emmet-Teller) utilizando la técnica de adsorción de nitrógeno y desgasificando las muestras a 200 °C por 12 h en un analizador Autosorb1 (Quantachrome Instruments). También, se empleó un microscopio electrónico de barrido (MEB) con acoplamiento de

espectroscopía de energía dispersiva (EDS, por sus siglas en inglés) (Philips XL 30) para analizar la morfología y composición química de los catalizadores carbonosos, respectivamente. Los catalizadores y los ánodos se montaron en un portamuestra de aluminio con una cinta de cobre y se cubrieron con una película conductora.

Por su parte, para analizar la morfología de los bioánodos, éstos se sumergieron en una solución de formaldehído al 2%, en etanol al 70% v/v, durante 12 h a 4 °C. Enseguida, los bioánodos fueron deshidratados en serie con etanol al 70, 80, 90 y 100 % durante 2 min en cada solución. Los bioánodos deshidratados se colocaron en un desecador durante 24 h. Por último, se montaron y recubrieron de igual forma que los ánodos para ser evaluados en un MEB.

5.9. Caracterización electroquímica en media celda

Se utilizó voltamperometría cíclica (VC) con un bipotenciostato (Bio-Logic SAS, VSP-300), atmósfera de N₂, 100 mL de ARF como electrolito y tres electrodos: de trabajo, de referencia del tipo Ag/AgCl en solución de NaCl 3M y un contraelectrodo de Pt.

Los electrodos de trabajo evaluados fueron los ánodos y sus respectivos bioánodos, es decir, ánodos con capa catalítica de cada uno de los catalizadores carbonosos funcionalizados, sobre los cuales se creció una biopelícula de *B. subtilis*. Los electrodos de trabajo fueron sumergidos por 18 h en ARF, previo a la evaluación en media celda.

Los voltamperogramas cíclicos (VCs) fueron obtenidos en una ventana de potencial de 50 a 1200 mV con respecto al Electrodo Reversible de Hidrógeno (RHE, por sus siglas en inglés) y una velocidad de barrido de 20 mV s⁻¹. El potencial del electrodo de referencia Ag/AgCl 3M se convirtió al potencial del RHE utilizando la ecuación de Nernst (5.1):

$$E_{RHE} = E^0 + 0.059 * pH + E_{Ag/AgCl} \quad (5.1)$$

donde E_{RHE} es el potencial del RHE, E^0 es el potencial estándar del electrodo de referencia Ag/AgCl 3M (209 mV), el pH del electrolito ARF (9.2) y $E_{Ag/AgCl}$ es el potencial medido durante la prueba.

5.10. Caracterización electroquímica en celda completa

5.10.1. Montaje de la CCM

A partir de los resultados de VC, se seleccionó el bioánodo más activo para la evaluación de su desempeño en una CCM de cámara doble como se muestra en la Figura 5.1.

Las cámaras de la CCM fueron separadas con una membrana de Nafión® 117 de 25 cm² (5 × 5 cm). Esta membrana fue activada con el siguiente procedimiento: se colocó en H₂O₂ 10% v/v durante 1 h a 60 °C, se lavó con agua hirviendo por 30 s, luego se colocó en H₂SO₄ 0.5 M a 85 °C por 1 h y se lavó nuevamente con agua hirviendo durante 5 min.

Posteriormente, la membrana fue sumergida en KOH 6M durante 19 h, se lavó con agua desionizada hirviendo y, por último, se sumergió en agua desionizada a temperatura ambiente para su uso.

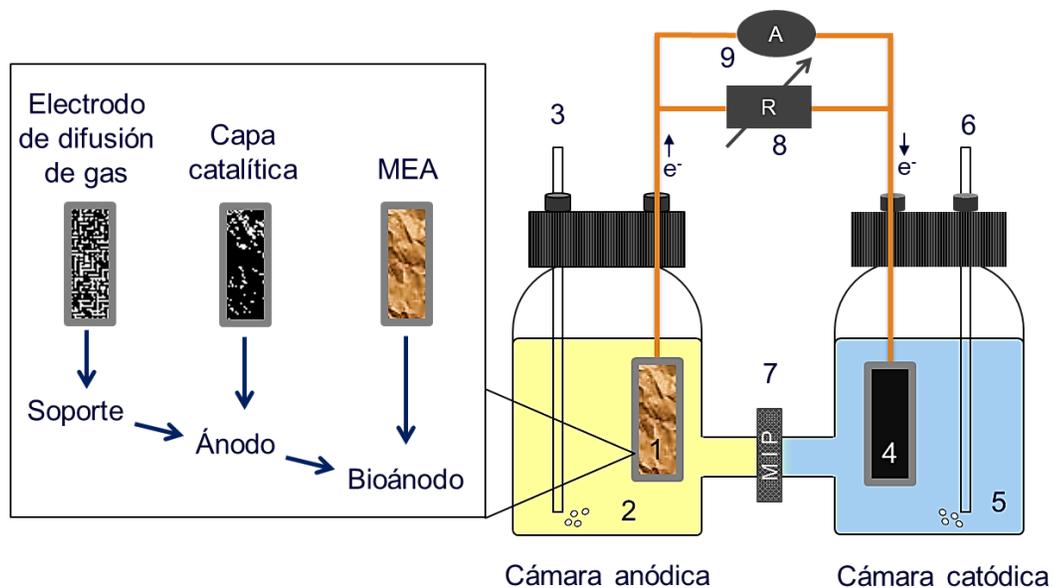


Figura 5.1. Estructura de una CCM: 1) Bioánodo, 2) Sustrato (ARF), 3) N₂, 4) Cátodo, 5) Electrolito (KOH), 6) O₂, 7) MIP. Se muestra también el montaje para su caracterización: 8) Resistencia variable, 9) Potenciostato. En el diagrama de la izquierda se presenta la configuración del bioánodo.

A la cámara anódica se añadieron 250 mL de ARF, que fueron burbujeados con N₂ para promover un ambiente anaeróbico durante la evaluación. El bioánodo fue sumergido en el ARF a temperatura ambiente 18 h antes de su evaluación en la CCM.

Por su parte, en la cámara catódica se utilizaron 250 mL de KOH (con pH igual al ARF) como electrolito, donde se burbujeó oxígeno para llevar a cabo la RRO al colocar el cátodo descrito en la sección 5.6. La CCM operó en un proceso por lote a temperatura ambiente.

5.10.2. Curvas de polarización y de densidad de potencia

Con ayuda del bipotenciostato Bio-Logic SAS, VSP-300 se determinó primeramente el VCA entre el bioánodo y el cátodo; es decir, el V_{celda} en ausencia de resistencia externa. Posteriormente, el valor V_{celda} se obtuvo para cada una de las resistencias externas (10 k Ω , 5 k Ω , 1.21 k Ω y 1 k Ω) aplicadas con una celda Dummy universal. Los datos VCA y V_{celda} se recolectaron después de transcurrir 10 min de medición.

Con la ecuación 2.4 se determinó la densidad de corriente j_a , mientras que la densidad de potencia P_a fue calculada a partir de la ecuación 2.6. Estos datos permiten obtener curvas de polarización ($V_{\text{celda}}-j_a$) y curvas de potencia (P_a-j_a) al inicio de la prueba (día 1), día 2, día 7 y final de la operación de la CCM (día 14).

5.10.3. Pruebas de larga duración en la CCM

La estabilidad de la CCM para generar energía empleando ARF como sustrato se evaluó al medir el valor de V_{celda} durante 14 días. Esto se llevó a cabo conectando una resistencia externa de 10 k Ω utilizando el mismo bipotenciostato mencionado en la sección anterior.

5.11. Caracterización de ARF

Se caracterizó el ARF inicial (agua antes de su uso en la CCM), así como de muestreos a los días 2, 7 y 14 (final) obtenidos de la CCM, para determinar el desempeño del bioánodo para su tratamiento. En la Tabla 5.2 se muestran los análisis para las muestras obtenidas durante la prueba de larga duración en la CCM.

Tabla 5.2. Análisis para las muestras de la prueba de larga duración en la CCM.

Análisis	Norma	Muestra (día)
pH	NMX-AA-008-SCFI-2016	1, 2, 7 y 14
Conductividad	NMX-AA-093-SCFI-2000	1, 2, 7 y 14
DQO	NMX-AA-030/2-SCFI-2011	1, 2, 7 y 14
DBO	NMX-AA-028-SCFI-2011	1 y 14
Nitratos	NMX-AA-079-SCFI-2001	1 y 14
Fosforo total	NMX-AA-029-SCFI-2001	1 y 14
Sulfatos	NMX-AA-074-SCFI-2014	1 y 14
Alcalinidad	NMX-AA-036-SCFI-2001	1 y 14
Cloruros	NMX-AA-073-SCFI-2001	1 y 14
Sólidos disueltos totales	NMX-AA-034-SCFI-2015	1 y 14
Sólidos suspendidos totales	NMX-AA-034-SCFI-2015	1 y 14

Capítulo 6. Resultados y discusión

6.1. Rendimientos de síntesis de los catalizadores

En la Tabla 6.1 se presentan los rendimientos (por procesos y totales) de la síntesis de los catalizadores GNSF y CCAF. El rendimiento en cada proceso se calculó a partir de un balance de materia, multiplicando por 100 al cociente del peso inicial y el peso final de los materiales.

En el proceso de molienda del GNS se recuperó el 97.6 % e. p. de los materiales iniciales, mientras el porcentaje restante quedó adherido sobre la superficie del vial y bolas de ágata. Por otra parte, después del proceso de carbonización de los RC se obtuvo 36.52 % e. p. de biocarbón, mientras el porcentaje restante corresponde a los compuestos volátiles.

El proceso de activación presenta los rendimientos más bajos en cada uno de los catalizadores, debido a la descomposición del material por la temperatura de pirólisis y la remoción de impurezas durante el lavado con HCl y agua desionizada. En este proceso, el GNSF obtuvo un rendimiento de 45.66 % e. p. debido principalmente a la descomposición térmica de la tiourea. En el caso de los CCAF, el rendimiento disminuye ligeramente con el aumento de la temperatura de pirólisis.

Tabla 6.1. Rendimientos de la síntesis de los catalizadores.

Proceso	GNSF	CCA4F	CCA6F	CCA8F
	(% e. p.)			
Molienda	97.60	ND ^a	ND	ND
Carbonización	ND	36.52	36.52	36.52
Activación	45.66	21.08	19.72	18.50
Funcionalización	98.08	93.50	92.59	92.78
Rendimiento total	43.71	7.20	6.67	6.27

^a No determinado.

Por otro lado, durante el proceso de funcionalización, el GNSF y los CCAF tuvieron rendimientos de 98.08 y aproximadamente de 93 % e. p., respectivamente. Por último, el producto de cada proceso de síntesis de los catalizadores GNSF y CCAF se asumió como el rendimiento total. Para el GNSF, el rendimiento total fue de 43.71 % e. p., debido principalmente a la descomposición térmica de la tiourea; mientras los rendimientos totales

para los CCAF fueron de 7.2 % e. p. y menores, disminuyendo con el aumento de la temperatura atribuido a los compuestos volátiles que componen los RC.

6.2. Propiedades fisicoquímicas de catalizadores

6.2.1. Análisis de composición química

La composición química de los catalizadores funcionalizados y sus fuentes de carbono se presenta en la Tabla 6.2. El Grafito tiene una composición de 94.12 y 5.88 (% e. p.) de C y O, respectivamente. El proceso de molienda mecánica de Grafito con tiourea y $ZnCl_2$ modifica la composición química de GNSF para obtener 86.96 y 5.66 (% e. p.) de C y O, respectivamente, además de los dopantes N y S (4.95 y 1,25 % e. p., respectivamente).

Si bien se trata de un análisis semi-cuantitativo, estos resultados sugieren el dopaje de grafeno con los heteroátomos (HA) de N y S durante la molienda mecánica. Se ha reportado que la presencia de N crea sitios activos y disminuye la resistencia a la transferencia de electrones, mientras que S puede aumentar la densidad de carga asimétrica de los átomos de C y potenciar las propiedades generadas con la incorporación de N [79].

Tabla 6.2. Composición elemental de los catalizadores carbonosos funcionalizados y sus fuentes de carbono.

Catalizadores	C	O	N	S	Cl	Si	Otros
	(% e. p.)						
Grafito	94.12 ± 0.13 ^a	5.88 ± 0.13	ND ^b	ND	ND	ND	ND
GNSF	84.96 ± 0.07	5.66 ± 0.44	4.95 ± 0.24	1.25 ± 0.08	0.29 ± 0.04	1.88 ± 0.14	1.01 ± 0.07
RC	60.07 ± 0.29	33.94 ± 0.44	3.24 ± 0.08	0.60 ± 0.03	ND	ND	2.15 ± 0.13
CCA4F	86.57 ± 0.18	8.18 ± 0.11	3.7 ± 0.11	0.42 ± 0.01	1.13 ± 0.04	ND	ND
CCA6F	89.54 ± 0.1	5.57 ± 0.08	3.21 ± 0.12	0.40 ± 0.01	1.29 ± 0.05	ND	ND
CCA8F	89.66 ± 0.09	5.54 ± 0.06	2.97 ± 0.1	0.48 ± 0.03	1.35 ± 0.04	ND	ND

^a Error estándar con n=5

^b no determinado

Por su parte, RC está compuesto de 60.07, 33.94, 3.24, 0.60 y 2.15 (% e. p.) de C, O, N, S y otros elementos (Ca, K y Mg), respectivamente. Cabe resaltar que estos residuos contienen de forma natural los HA de N y S promovidos durante el dopaje de GNS por molienda mecánica.

Al activar a 400 °C (CCA4F), los contenidos de C y N aumentan (este último ligeramente) con respecto a RC, mientras que los de O y S disminuyen. El aumento de la temperatura de activación en CCA6F y CCA8F provoca un ligero incremento en C, con una disminución en los contenidos de O y N en comparación con CCA4F. El incremento en el contenido de carbono con la temperatura puede atribuirse a una mayor carbonización y a la volatilización de los otros elementos detectados en RC.

Por otro lado, la disminución en el contenido de O y N puede deberse a la ruptura de los enlaces en la estructura de los CCAF. Mientras tanto, la variación en el contenido de S es limitada en los tres catalizadores. Cabe mencionar que se detectó Cl en concentraciones similares en los catalizadores CCAF, lo que se atribuye al uso de $ZnCl_2$ como agente activante.

6.2.2. Difracción de rayos x

En la Figura 6.1 se muestran los patrones de DRX de los catalizadores carbonosos y sus fuentes de carbono. En la Figura 6.1a, el Grafito tiene tres picos de difracción en los ángulos $2\theta = 26.5^\circ$, 54.7° y 87° , asignados con base en la tarjeta JCPDS 41-1487 a las reflexiones de los planos (002), (004) y (006) de carbón, respectivamente [80].

Por su parte, GNS presenta una menor intensidad relativa en sus reflexiones, atribuida a la exfoliación por la molienda de bolas y la activación química. Del mismo modo, la funcionalización causó una disminución en las intensidades relativas para los planos del GNSF. Por ejemplo, al tomar como referencia el reflejo del plano (002) del Grafito, la intensidad relativa en el GNS y GNSF disminuyó a 3.56 y 0.47 %, respectivamente, dando evidencia de la disminución el grado de cristalinidad.

En el inserto de la Figura 6.1a, se puede observar el patrón de difracción del GNSF con picos en ángulos $2\theta = 26.5^\circ$ y 54.6° ; y una banda ancha a $2\theta = 44^\circ$ correspondiente a las reflexiones de los planos (002), (004) y (101), respectivamente. La presencia de reflexiones adicionales

al plano (101) es causada por la molienda de bolas [81]. Sin embargo, la reflexión alrededor de $2\theta = 21^\circ$ y otras reflexiones de baja intensidad relativa en el patrón de difracción del GNSF se podrían atribuir a impurezas de cuarzo (JCPDS 46-1045) obtenidas del proceso de limpieza del molino de bolas. Cabe destacar que la reflexión más intensa del cuarzo (correspondiente al plano (011) en $2\theta = 26.6^\circ$) podría traslaparse con la reflexión del plano (002) del GNSF.

En la Figura 6.1b se presentan los patrones de difracción de RC, CCA y CCAF. Los RC muestran una estructura cuasi-amorfa, con una banda ancha alrededor de $2\theta = 21.5^\circ$, atribuida a los planos cristalográficos de celulosa: (110) pico de celulosa I α y (200) pico de celulosa I β [82]. Después del proceso de activación de RC, el pico ancho se traslada a ángulos más altos debido a la reducción de la distancia interplanar provocada por el tratamiento térmico.

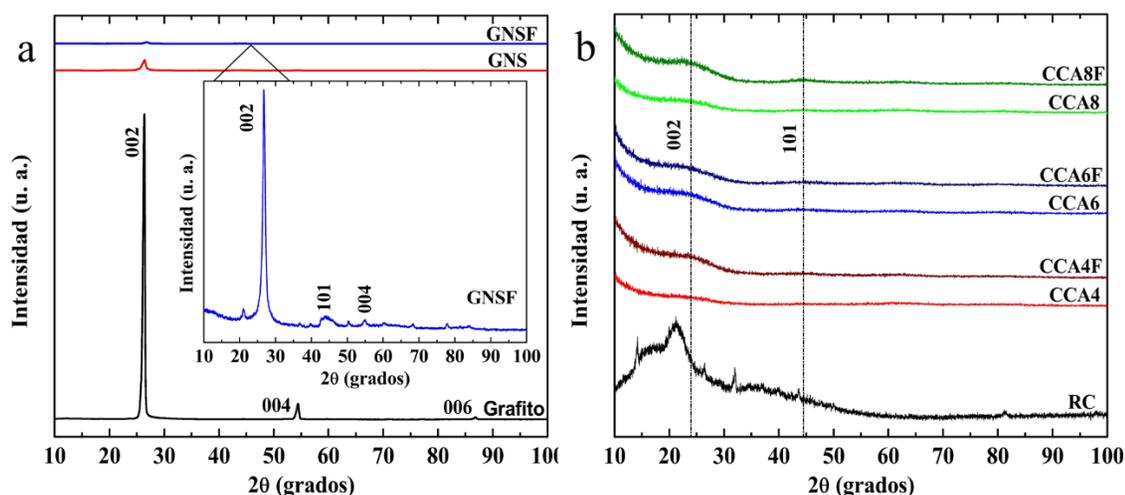


Figura 6.1. Patrones de difracción de los catalizadores carbonosos y sus fuentes de carbono: (a) grafito, GNS y GNSF y (b) RC, CCA y CCAF.

Los CCA y CCAF tienen una estructura amorfa con dos bandas anchas de difracción en ángulos $2\theta = 23.9^\circ$ y 44° , correspondiente a las reflexiones de los planos (002) y (101) de carbón, respectivamente. La temperatura de activación no tiene un efecto determinante en los patrones de DRX de los catalizadores, a diferencia de lo reportado por Alonso-Lemus *et al.* [83], donde la intensidad relativa de las reflexiones de biocarbonos obtenidos a partir de cuero aumenta con una temperatura de activación más alta. Asimismo, la funcionalización por

calentamiento con microondas tampoco modifica notablemente las intensidades relativas de las reflexiones de los CCAF, a diferencia de lo que se observa en el caso de GNSF. Esto sugiere que la funcionalización no tiene un efecto en estructuras amorfas.

6.2.3. Espectroscopía Raman

Los espectros Raman de Grafito, GNS y GNSF se presentan en la Figura 6.2a. Las bandas D, G y 2D a 1340, 1590 y 2680 cm^{-1} , respectivamente, son características en materiales de Grafito y Grafeno [40]. La banda G corresponde a la estructura gráfrica sp^2 , mientras la banda D está relacionada con los defectos en la estructura gráfrica sp^3 . La relación entre las bandas D y G (I_D/I_G) es utilizada para medir el nivel de desorden en la estructura gráfrica de materiales carbonosos. La relación I_D/I_G es baja para el grafito (0.04), indicando que posee una estructura altamente ordenada (esto coincide con el análisis de DRX para Grafito, Figura 6.1a).

Al comparar los espectros Raman de GNS y Grafito, se observa un aumento en la intensidad en la banda D y, por lo tanto, en la relación I_D/I_G (0.84 para GNS). Este aumento es provocado por una reducción en el tamaño de cristalita y el dopaje inducido por la síntesis de GNS [84]. Además, a un lado de la banda G aparece la banda D' alrededor de 1620 cm^{-1} , la cual es característica de grafeno de pocas capas y está relacionada con desorden en la estructura gráfrica [85].

Los espectros GNS y GNSF son similares, aunque la relación I_D/I_G es mayor en este último. Esto indica que la funcionalización provoca un desorden en la estructura del GNS. Finalmente, el Grafito presenta una banda 2D asimétrica alrededor de 2700 cm^{-1} , mientras que GNS y GNSF tienen bandas simétricas, una característica que confirma la exfoliación de grafito en grafeno [86].

En la Figura 6.2b se presentan los espectros Raman de los catalizadores de la serie CCA y CCAF. Las bandas D y G en estos biocarbonos son más amplias que en GNS y GNSF, lo cual es característico de estructuras amorfas [87]. La relación I_D/I_G incrementa con el aumento de la temperatura de activación (1.32 y 1.33 para CCA8 y CCA8F, respectivamente) indicando que altas temperaturas de activación y la presencia del activador químico ZnCl_2 , promueven una estructura gráfrica más desordenada.

Por otro lado, la funcionalización de los CCA no tiene efecto relevante en su relación I_D/I_G , tal y como se observó en el caso de GNS, lo que sugiere que se trata de estructuras más estables.

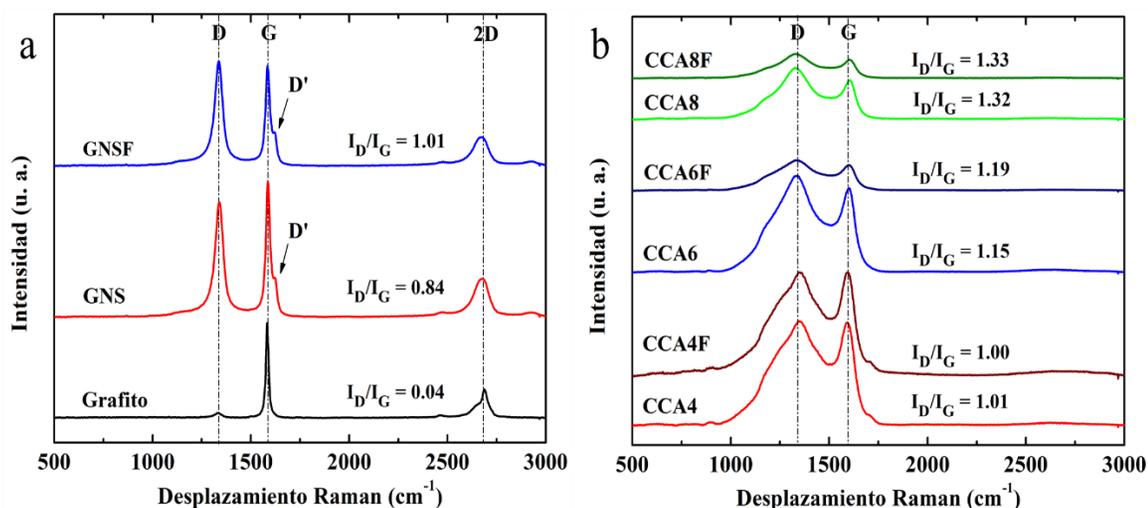


Figura 6.2. Espectros Raman de los catalizadores carbonosos y sus fuentes de carbono: (a) Grafito, GNS y GNSF y (b) RC, CCA y CCAF.

6.2.4. Análisis por espectroscopía infrarroja

En la Figura 6.3 se presentan los espectros IR de Grafito, RC y sus respectivos catalizadores carbonosos. En la región de 2400 – 1800 cm⁻¹ se observan los picos característicos del cristal de diamante utilizado para el análisis en el modo ATR. Los espectros de Grafito, GNS y GNSF se muestran en la Figura 6.3a, los cuales presentan bandas en las regiones de 3100–2900 cm⁻¹ y 1150–1050 cm⁻¹ atribuidas a las vibraciones de los enlaces C–H y C–O, respectivamente.

Estas bandas no se modifican después de la síntesis de GNS, aunque su intensidad disminuye con la funcionalización para obtener GNSF. Las características de los espectros indican que la síntesis de GNS y su funcionalización para desarrollar GNSF, no promueven la formación de grupos funcionales superficiales en estos catalizadores.

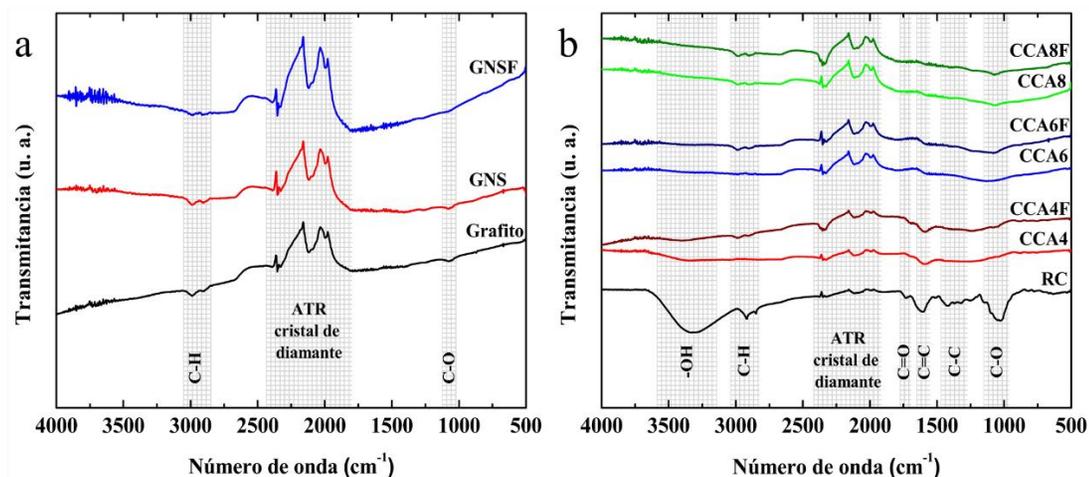


Figura 6.3. Espectros IR de las fuentes de carbono y sus catalizadores carbonosos: (a) Grafito, GNS y GNSF; (b) RC, CCA y CCAF.

En el espectro IR de RC (Figura 6.3b) se observan bandas en las regiones de vibración de enlaces -OH ($3600\text{--}3200\text{ cm}^{-1}$), C-H ($3100\text{--}2900\text{ cm}^{-1}$), C=O ($1785\text{--}1700\text{ cm}^{-1}$), C=C ($1680\text{--}1620\text{ cm}^{-1}$), C-C ($1500\text{--}1300\text{ cm}^{-1}$) y C-O ($1150\text{--}1050\text{ cm}^{-1}$), característicos de los materiales lignocelulósicos [88]. Después del proceso de activación, la mayoría de las bandas presentes en RC desaparecen o disminuyen su intensidad.

Por su parte, CCA4 presenta una ligera inflexión en la banda del enlace -OH , así como la banda debida a enlaces C=C de grupos aromáticos; mientras que CCA6 y CCA8 tienen bandas de baja intensidad debidas a enlaces C=C y C-O . Cabe destacar que CCA6 y CCA8 no presentan la señal debida a enlaces -OH , indicando que la hidrofobicidad de estos catalizadores es mayor en comparación a RC y CCA4 [89]. No obstante, la funcionalización para obtener los catalizadores CCAF promueve la formación de enlaces C-H de grupos metilos y con una intensidad de las bandas que se incrementa conforme aumenta la temperatura de activación.

6.2.5. Análisis termogravimétrico

En la Figura 6.4 se muestran las curvas de ATG de Grafito, RC y sus catalizadores. Este análisis se realizó únicamente a los catalizadores sin funcionalizar. En la Figura 6.4a se observa que Grafito es estable térmicamente, ya que presenta una pérdida de peso despreciable ($< 1\%$).

Mientras tanto, GNS presenta regiones de pérdidas de peso notables, causadas por la evaporación de la humedad adsorbida (≈ 100 °C) y la descomposición térmica de la tiourea (entre 300 y 700 °C), utilizada como fuente de N y S. La descomposición térmica resulta favorable, ya que a partir de 300 °C genera especies reactivas de N y S, como NH_3 , H_2S y CS_2 , que pueden reaccionar con los sitios defectuosos del grafeno producidos con la molienda de bolas, y así completar el proceso de dopaje [90].

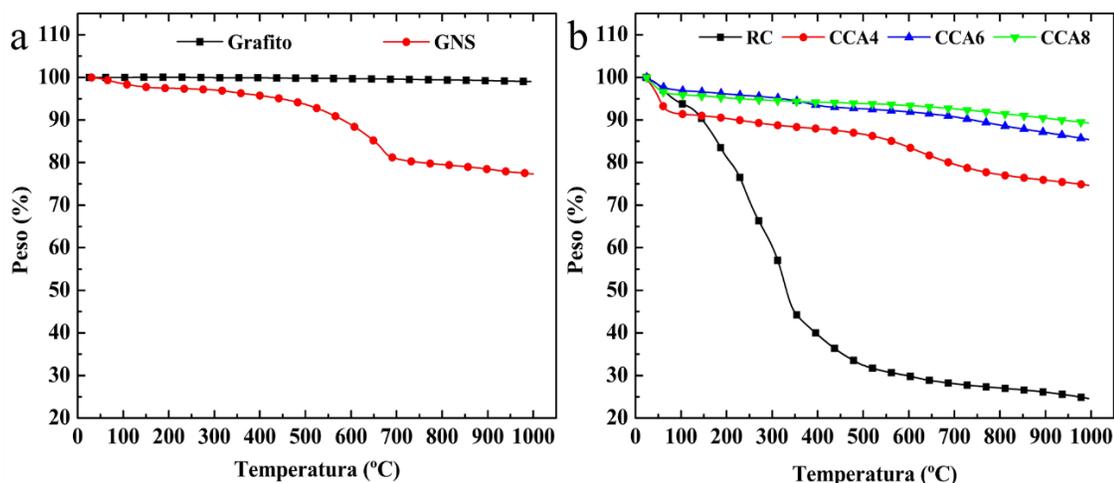


Figura 6.4. Curvas de ATG de catalizadores carbonosos y sus fuentes de carbono: (a) Grafito y GNS; (b) RC y CCA.

En la Figura 6.4b, RC pierde peso significativamente a medida que la temperatura aumenta. Primero por la evaporación de humedad adsorbida (≈ 100 °C) y enseguida por la descomposición térmica de los compuestos volátiles como carbohidratos, lípidos y proteínas.

Por su parte, los CCA presentan la primera pérdida de peso debido a la evaporación de humedad, resaltando que la pérdida de peso de CCA4 es mayor que en CCA6 y CCA8. Esto sugiere que el CCA4 es higroscópico, lo que puede relacionarse con la banda del enlace –OH en su espectro FTIR (Figura 6.3b).

También, CCA4 presenta otra pérdida de peso a partir de 500 °C debido a la descomposición térmica de los compuestos no volátiles a temperaturas menores. Este comportamiento también se observa, aunque en menor medida, en el caso de CCA6 que comienza a perder peso al superar su temperatura de activación.

Por su parte, CCA8 muestra una mayor estabilidad térmica probablemente debido a que su temperatura de activación provoca la remoción de diversos elementos, entre ellos compuestos no volátiles.

6.2.6. Análisis de morfología por Microscopía Electrónica de Barrido

En la Figura 6.5 se muestran micrografías de los catalizadores funcionalizados GNSF, CCA4F, CCA6F y CCA8F. GNSF posee una morfología heterogénea con partículas de forma irregular y aparentemente rugosas, así como una amplia distribución de tamaño de partícula (Figura 6.5a).

Además, se observa porosidad provocada por la activación con ZnCl_2 . La presencia de partículas de mayor tamaño (aproximadamente $40\ \mu\text{m}$) podría disminuir el área superficial de GNSF, aunque están acompañadas de partículas de menor tamaño.

De modo similar, CCA4F, CCA6F y CCA8F (Figuras 6.5b-d) presentan una morfología heterogénea y amplia distribución de tamaño de partícula. Las partículas tienen superficie rugosa, que en algunos casos asemeja láminas apiladas. En todos los casos se aprecia porosidad, atribuida al uso de ZnCl_2 como agente activante.

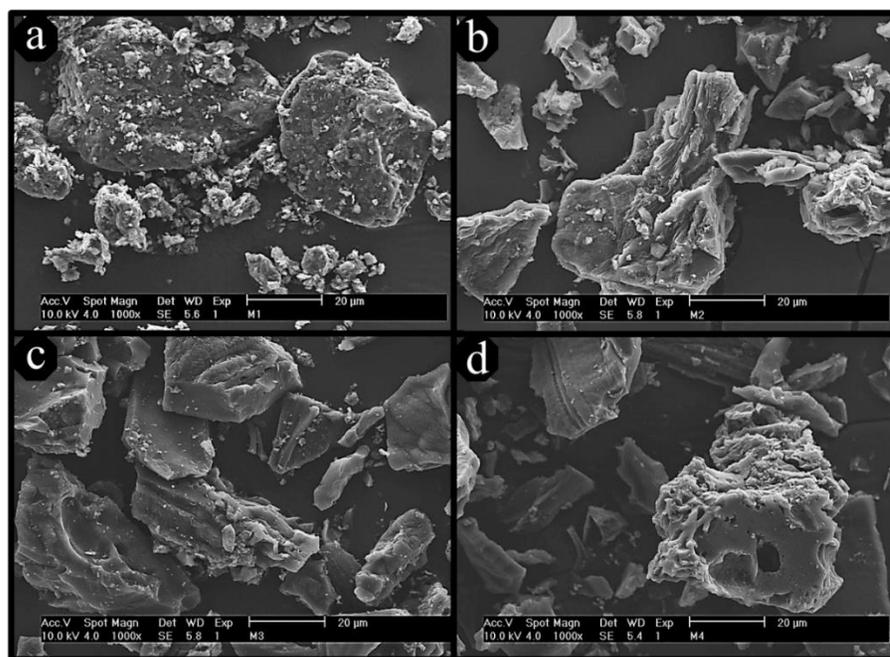


Figura 6.5. Micrografías de catalizadores carbonosos funcionalizados: (a) GNSF, (b) CCA4F, (c) CCA6F y (d) CCA8F.

6.2.7. Adsorción de gases

En la Figura 6.6a se presenta la isoterma de adsorción/desorción de GNSF, la cual es del tipo IV(a) según la clasificación de la IUPAC [91]. Isothermas de este tipo son características de materiales mesoporosos.

La isoterma del tipo IV(a) presenta histéresis (cuando las curvas de adsorción y desorción no coinciden), la cual ocurre si el diámetro de poro excede un cierto ancho crítico [92]. Cada tipo de histéresis está relacionado con características particulares de la estructura de poro y el mecanismo de adsorción. Según la clasificación de la IUPAC, GNSF presenta un ciclo de histéresis H3, la cual está asociada a agregados de partículas similares a placas, poros con forma de ranura o macroporos que no están completamente llenos de adsorbato a presión atmosférica [92, 93]. Estas características coinciden con las observadas en la Figura 6.5a para GNSF.

En la Figura 6.6b se observa la distribución de tamaño de poro de GNSF durante la adsorción/desorción de N_2 basado en el modelo Barret-Joyner-Halenda (BJH). En el proceso de desorción, la distribución indica la presencia principalmente de mesoporos con un máximo cerca de 4 nm. Sin embargo, el resto de los puntos no se aproximó a cero en un intervalo de tamaño más amplio, lo que indica que también existen mesoporos de mayor tamaño.

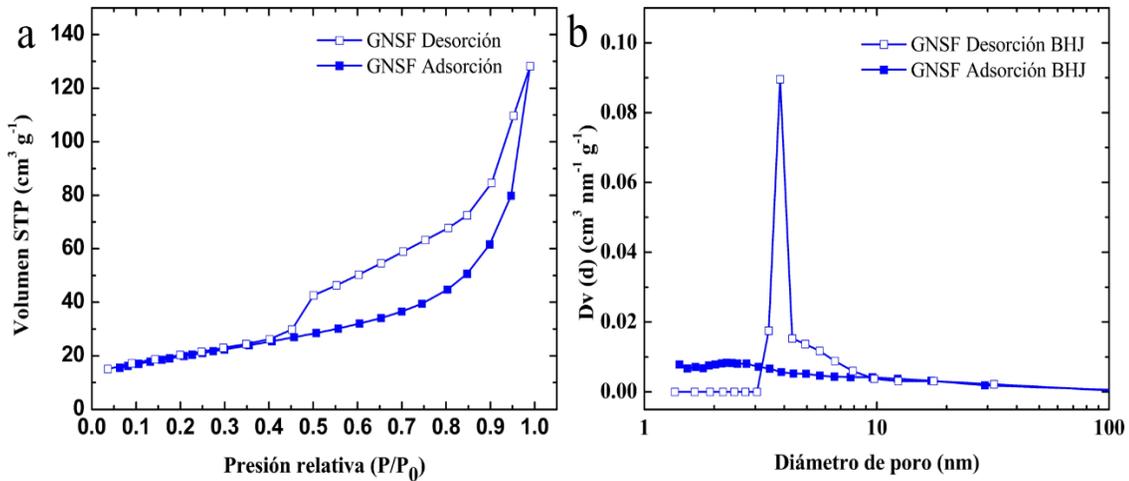


Figura 6.6. Isotherma de adsorción (a) y distribución de tamaño de poro (b) de GNSF.

En la Figura 6.7a, la forma de las isotermas de los catalizadores CCAF indica que son del tipo IV(a) (clasificación de la IUPAC), similares a la isoterma del GNSF. CCA6F es el catalizador que más adsorbe N_2 , seguido de CCA4F y por último CCA8F. Esto indica que la temperatura de activación no tiene un efecto en la cantidad de N_2 adsorbido. Los catalizadores CCAF presentan ciclos de histéresis del tipo H4, típicos en carbones micro-mesoporosos o de poros estrechos en forma de ranura [92, 93].

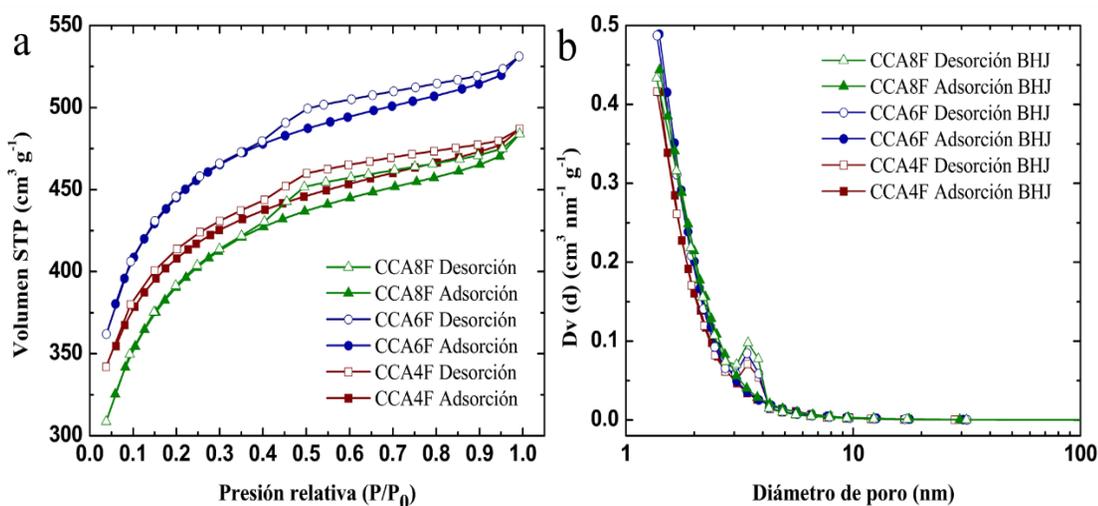


Figura 6.7. Isotermas de adsorción (a) y distribución de tamaño de poro (b) de los catalizadores CCAF.

En la Figura 6.7b se observa la distribución de tamaño de poro de CCAF durante la adsorción/desorción de N_2 . En el proceso de desorción, la distribución está dominada por mesoporos con un máximo cercano a 3.5 nm, menor que GNSF. Sin embargo, los puntos de la curva de desorción en la región de microporos no se aproximaron a cero. Esto indica la existencia de microporos, lo cual es confirmado por la forma de las isotermas en la región $P/P_0 < 0.4$ y la histéresis tipo H4.

En la Tabla 6.3 se presentan los valores de las propiedades texturales de los catalizadores funcionalizados. En el caso de adsorbentes porosos, el área superficial (S_{BET}) puede dividirse en superficie externa ($S_{externa}$, superficie fuera de los poros) y superficie de microporo (S_{micro} , superficie de todas las paredes de los poros) [91].

El S_{BET} de GNSF es de $69.7 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$, con un 7.89% de S_{micro} ($5.5 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$). El volumen total de poros (V_t) de GNSF es de $0.1983 \text{ cm}^3 \text{ g}^{-1}$. El GNSF presenta un tamaño promedio de poro (D_p) de 11.38 nm, y con base en la clasificación de la IUPAC, posee una estructura mesoporosa (tamaño de poros entre 2 y 50 nm).

Tabla 6.3. Propiedades texturales de los catalizadores carbonosos funcionalizados.

Catalizador	S_{BET}^a ($\text{m}^2 \text{ g}^{-1}$)	S_{micro}^b ($\text{m}^2 \text{ g}^{-1}$)	V_t^c ($\text{cm}^3 \text{ g}^{-1}$)	D_p^d (nm)
GNSF	69.7	5.5	0.1983	11.38
CCA4F	1468	827	0.7533	2.053
CCA6F	1611	842	0.8216	2.04
CCA8F	1269	473	0.7488	2.36

^a Área superficial calculada por el método de Brunauer-Emment-Teller (BET).

^b Evaluado por el método t-plot

^c Volumen total de poros determinado a partir del nitrógeno adsorbido a $P/P_0=0.99$.

^d Diámetro promedio de poros de adsorción.

Por su parte, los catalizadores CCAF poseen una S_{BET} más de 20 veces mayor que GNSF. Con la activación a $400 \text{ }^\circ\text{C}$ se obtiene CCA4F con $1469 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$ de S_{BET} , $827 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$ de S_{micro} , $0.7533 \text{ cm}^3 \text{ g}^{-1}$ de V_t y D_p de 2.053 nm. Al aumentar la temperatura de activación a $600 \text{ }^\circ\text{C}$, CCA6F se incrementan S_{BET} ($1611 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$), S_{micro} ($842 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$) y V_t ($0.8216 \text{ cm}^3 \text{ g}^{-1}$), mientras que D_p (2.04 nm) disminuye para CCA6F.

Por el contrario, en el caso de CCA8F, disminuye S_{BET} ($1269 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$), S_{micro} ($473 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$) y V_t ($0.7488 \text{ cm}^3 \text{ g}^{-1}$), incluso por debajo de CCA4F, mientras que la temperatura de activación de $800 \text{ }^\circ\text{C}$ provoca un aumento en D_p (2.36 nm), lo que resulta en la disminución del S_{BET} [94]. Considerando el hecho de que D_p es cercano a 2 nm (Tabla 6.2), los catalizadores CCAF también pueden considerarse mesoporosos.

6.3. Análisis de morfología de ánodos

Las micrografías de MEB en las Figuras 6.8a-d muestran la morfología de los ánodos conteniendo una capa catalítica de GNSF, CCA4F, CCA6F y CCA8F, respectivamente (vista superior).

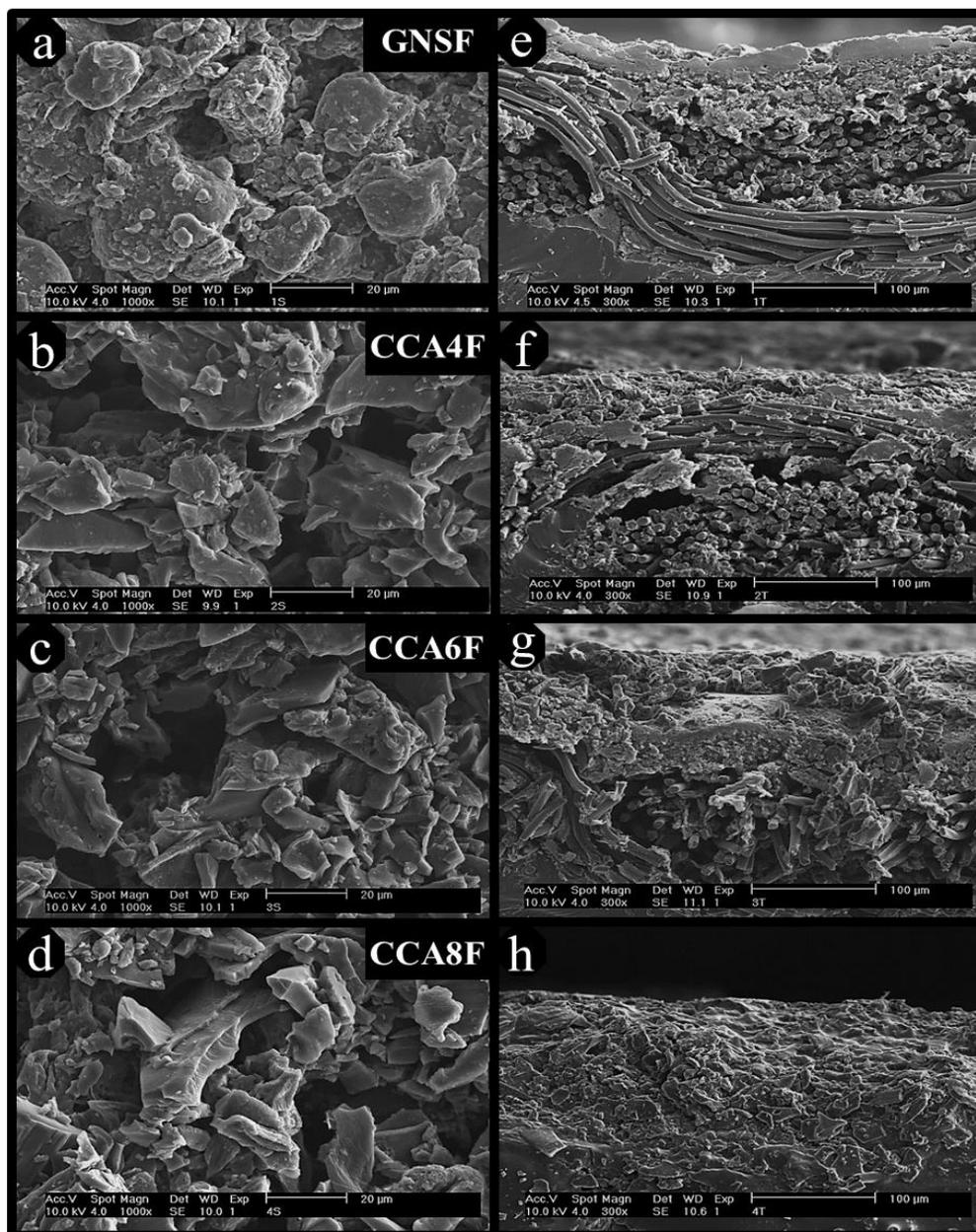


Figura 6.8. Micrograffías de ánodos de catalizadores carbonosos funcionalizados: (a-d) vista superficial, (e-h) vista transversal.

En general, los catalizadores conservan la morfología descrita en la Figura 6.5, lo que era de esperarse ya que la preparación de la tinta catalítica y su respectivo depósito por goteo sobre el soporte se realizaron en condiciones químicas suaves. Esta morfología porosa es adecuada para favorecer el crecimiento de la biopelícula de *B. subtilis* en los ánodos.

Por su parte, los diferentes componentes de los ánodos se pueden observar en las micrografías de sección transversal, Figuras 6.8e-h. De la parte inferior a la superior: i) soporte integrado por tela de carbón conteniendo la capa de difusión (principalmente de politetrafluoroetileno, PTFE); ii) capa catalítica con un espesor de aproximadamente 30 μm . Estas características son más claramente observadas en la Figura 6.8e.

6.4. Caracterización electroquímica en media celda

En la Figura 6.9a se presentan los voltamperogramas cíclicos (VCs) del Soporte (es decir, sin catalizador, ver descripción en Metodología) y Soporte con biopelícula de *B. subtilis*, empleando agua residual farmacéutica (ARF) como electrolito.

La densidad de corriente (j) generada por el Soporte es baja, con un par redox (picos de baja intensidad a 0.96 y 0.52 V vs RHE, en los barridos positivo y negativo, respectivamente). El pico en el barrido negativo es ancho, lo que puede deberse a un comportamiento de la tela de carbón que integra el electrodo a difusión de gas.

En presencia de *B. subtilis*, j se incrementa con un cambio de pendiente a cerca de 0.42 V en el barrido positivo. Igualmente, se tiene un pico de j de baja intensidad a 1.02 V, lo que sugiere actividad catalítica de *B. subtilis* para promover las reacciones bioelectroquímicas de materia orgánica contenida en el ARF.

El ánodo de GNSF en la Figura 6.9b genera valores más altos de j que el Soporte. Además, el par redox está mejor definido (con picos ligeramente desplazados en potencial), lo que se atribuye a la actividad catalítica del material carbonoso. Con el bioánodo GNSF + *B. subtilis* se modifica la forma del VC, donde se observa un cambio en la pendiente de j . En el barrido positivo la pendiente comienza a incrementarse a potenciales cercanos a 0.22 V vs RHE, con un pico de oxidación apenas apreciable (cercano a 1.02 V). Por su parte, en el barrido negativo se observa el pico ancho de j (con un máximo cercano a 0.38 V), atribuido al Soporte. Ello sugiere que, a pesar de la presencia de capa catalítica y biopelícula, el Soporte puede estar en contacto con el ARF. En general, j del bioánodo GNSF + *B. subtilis* es más alta en comparación con la generada por GNSF sin biopelícula.

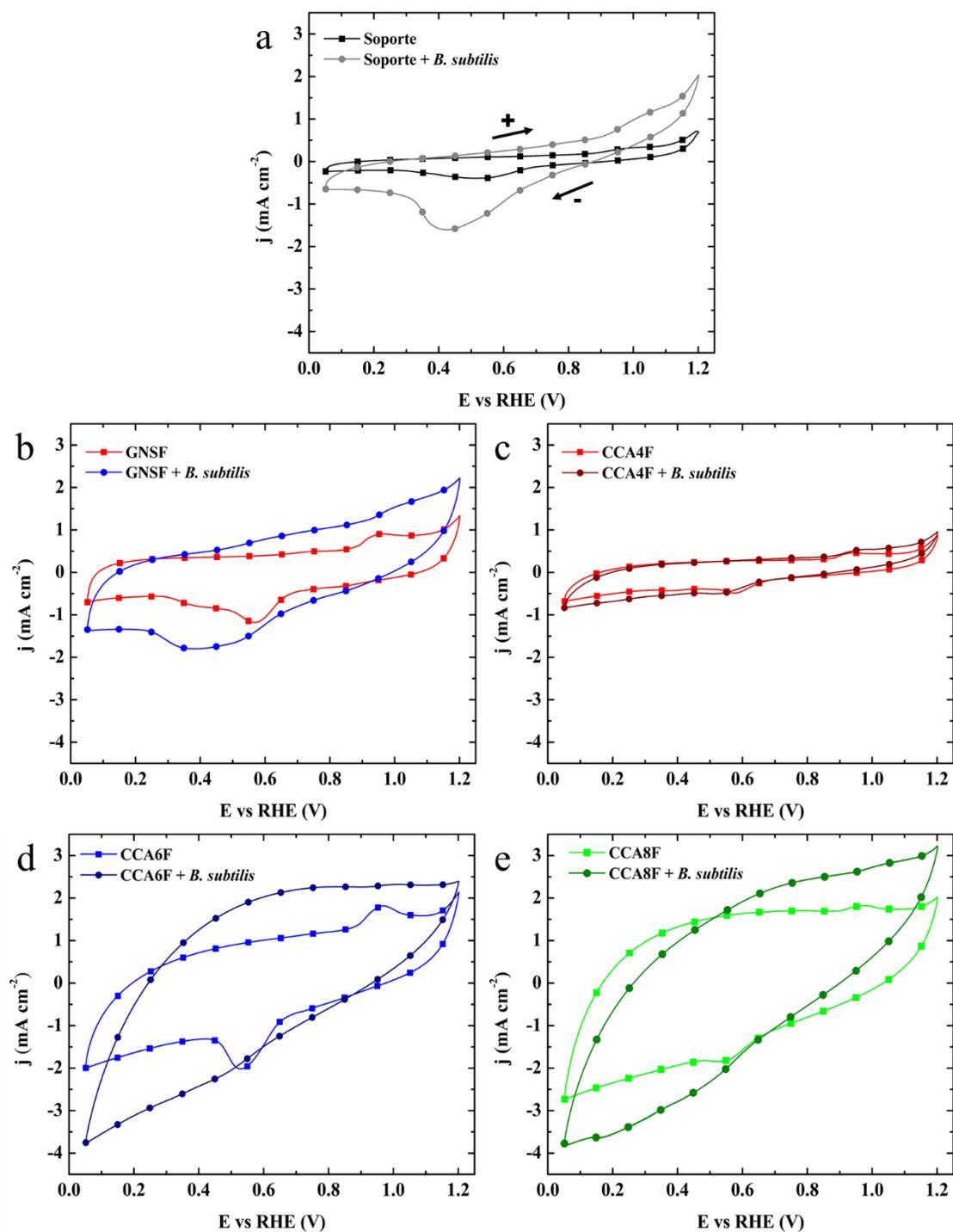


Figura 6.9. VCs de (a) Soporte y Soporte con biopelícula de *B. subtilis*; ánodos y bioánodos con biopelícula de *B. subtilis*: (b) GNSF, (c) CCA4F, (d) CCA6F y (e) CCA8F.

Electrolito: ARF; velocidad de barrido: 20 mV s^{-1} .

En la Figura 6.9c, tanto el ánodo CCA4F como el bioánodo CCA4F + *B. subtilis* tienen una baja actividad catalítica, con valores de *j* ligeramente superiores a los del Soporte. Si bien se aprecia un par redox, su capacidad para promover las reacciones bioelectroquímicas de ARF es muy baja

Por su parte, el ánodo conteniendo CCA6F (Figura 6.9d) genera valores de *j* mayores a los de GNSF y CCA4F, además de un par redox claramente definido con picos a 0.97 y 0.53 V vs RHE. Es decir, este biocarbón muestra actividad bioelectroquímica para las reacciones que ocurren con la materia orgánica del ARF.

La forma del VC del bioánodo CCA6F + *B. subtilis* se modifica hacia un comportamiento cuasi-capacitivo, generando valores de *j* más altos a potenciales entre 0.3–1.2 V (barrido positivo) y 0.5–0.05 V (barrido negativo) en comparación con el ánodo. Este comportamiento se debe a un incremento en actividad bioelectroquímica del bioánodo promovido por *B. subtilis*.

Cabe destacar que en el VC del bioánodo no se observa el par redox, lo que se relaciona con el crecimiento de biopelícula de *B. subtilis* sobre el catalizador, inhibiendo la aparición de picos de *j*. Este comportamiento es acorde con lo reportado por Babauta *et al.* [95], donde al remover una biopelícula de *S. oneidensis* MR-1 de la superficie de un electrodo de carbón vítreo, aparece un par redox en una solución buffer.

Por último, el ánodo con el catalizador CCA8F (Figura 6.9e) tiene un comportamiento cuasi-capacitivo, con un par redox apenas apreciable con picos a 0.97 y 0.53 V vs RHE. En general, la forma del VC de CCA8F no solo cambia, sino que además genera una *j* más alta, con relación a CCA6F en la figura previa.

En el caso del bioánodo CCA8F + *B. subtilis*, el VC muestra que *j* se incrementa con una pendiente, generando valores más altos a potenciales entre 0.52–1.2 V (barrido positivo) y 0.68–0.05 V (barrido negativo) comparado con CCA8F sin biopelícula. Las características de CCA8F + *B. subtilis* son las de un bioánodo con actividad bioelectroquímica para promover las reacciones de materia orgánica contenida en el ARF.

Al comparar el desempeño de los bioánodos CCA8F + *B. subtilis* y CCA6F + *B. subtilis*, se observa que el primero genera mayores valores de j a los potenciales más positivos, así como ligeramente superiores a potenciales más negativos.

Modestra y Mohan [59] reportan que mayor j en el barrido anódico indica un aumento en las reacciones de oxidación o una transferencia de electrones más rápida, mientras que un incremento en el sentido catódico puede deberse a la reducción de intermediarios metabólicos acumulados.

Además, CCA8F + *B. subtilis* tiene una mayor pendiente de incremento de j y de acuerdo con Liu *et al.* [65], un cambio de pendiente puede deberse a la participación de citocromos tipo c, que mejoran la transferencia de electrones por emplear un mecanismo de transferencia directa. Con base en estas características de actividad bioelectroquímica en ARF, el bioánodo CCA8F + *B. subtilis* ha sido seleccionado para ser evaluado en las pruebas de CCM.

6.5. Caracterización del desempeño de la celda de combustible microbiana

En la Figura 6.10 se presentan las curvas de polarización $V_{\text{celda}}-j_a$ y las curvas de P_a-j_a (ver ecuaciones 2.4–2.7), correspondientes a los días 1, 2, 7 y 14 de prueba de la CCM.

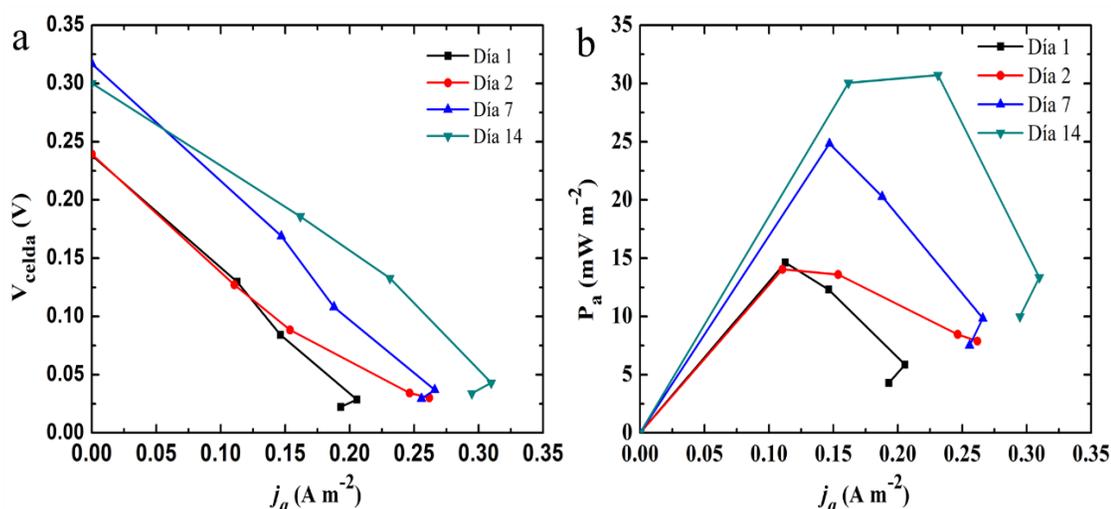


Figura 6.10. Curvas de polarización $V_{\text{celda}}-j_a$ a) y curvas P_a-j_a b) de la CCM a temperatura ambiente. Bioánodo: CCA8F + *B. subtilis*. Electrolito: ARF satura con N_2 . Cátodo: Pt/C en KOH con $\text{pH}=9.2$, con burbujeo de O_2 . Membrana: Nafión® 117 modificada.

El día 1 de la caracterización presenta un VCA de 0.23 V, con una j_a máxima de 0.21 A m⁻² (Figura 6.10a). Después de 24 h de operación (día 2), el VCA se incrementa ligeramente (0.24 V) lo mismo que j_a a partir de un valor de V_{celda} cercano a 0.10V. Al transcurrir 7 días de operación, VCA y j_a máxima se incrementan con respecto al día 2, mientras que continuando con la prueba VCA disminuye ligeramente y j_a aumenta (día 14 comparado con día 7), como se muestra en la Tabla 6.4. Cabe mencionar que la forma básicamente lineal observada en las curvas de polarización indica que las pérdidas óhmicas son las predominante en la CCM [16].

En la Figura 6.10b se muestra como P_a es muy similar en los días 1 y 2, incrementándose durante la prueba (ver Tabla 6.4), generando un valor máximo de 30.72 mW m⁻². Esta variación en el desempeño de la CCM con el tiempo puede atribuirse al metabolismo dinámico de los MEA.

Tabla 6.4. Parámetros energéticos durante la operación de la CCM.

Día de operación	VCA (V)	j_a máxima (A m ⁻²)	P_a (mW m ⁻²)
1	0.23	0.21	14.63
2	0.24	0.26	14.05
7	0.32	0.27	24.84
14	0.30	0.31	30.72

Estos valores de densidad de potencia máxima son superiores en comparación con otros reportados en la literatura, utilizando *B. subtilis* y una configuración de CCM de cámara doble, similar a la empleada en esta investigación (Tabla 6.5).

Cabe destacar que el valor máximo de j_a generado por el bioánodo CCA8F + *B. subtilis* utilizando un sustrato de composición compleja como ARF procedente del efluente directo de la planta, es más alto comparado con otras investigaciones que han empleado sustratos de composición simple como glucosa [60, 61], 2,4-diclorofenol [63] y agua sintética [65].

Igualmente, en el estudio desarrollado por Carrillo-Rodríguez *et al.* [67] se reporta una P_a más baja utilizando ARF y un bioánodo de Pt/C + *B. subtilis*, en comparación a la obtenida en esta investigación. Sin embargo, se debe comentar que Garcia-Mayagoita [68] reporta

mejores valores de curvas $V_{\text{celda-ja}}$ y $P_{\text{a-ja}}$ obtenidas con ARF como sustrato y un bioánodo de carbón mesoporoso ordenado (CMO) + *B. subtilis*.

Tabla 6.5. Estudios que emplearon *B. subtilis* como MEA en CCM de cámara doble.

Sustrato	Capacidad (mL)	Ánodo//Cátodo	Pa (mW m^{-2})	Ref.
Glucosa	800	Tela de carbono	0.00105	[60, 61]
2,4-diclorofenol	250	Tela de carbono	9.5	[63]
Agua sintética	72	Tela de carbono	6.9	[65]
ARF	300	(Pt/C)//(Pd-CeO ₂ /GD ₁)	12.47	[67]
ARF	300	CMO//(Pt/C)	105	[68]
ARF	300	CCA8F//(Pt/C)	30.72	Esta investigación

En la Figura 6.11 se presenta el comportamiento de V_{celda} durante los 14 días de operación de la CCM, aplicando una resistencia externa de 10 k Ω . En los primeros días de operación, el V_{celda} varía en el tiempo, lo que se atribuye a una etapa de adaptación de los MEA que interactúan con el bioánodo y ARF.

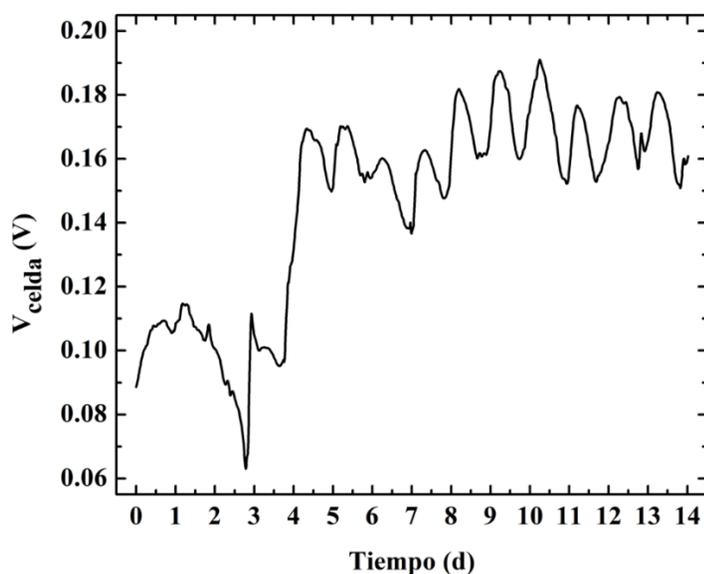


Figura 6.11. Comportamiento de V_{celda} tiempo durante los 14 días de operación de la CCM.
Resistencia externa: 10 k Ω .

Posteriormente, a partir del día 4 de operación se observa una oscilación del V_{celda} en el tiempo. Este fenómeno es similar a los reportados cuando se adiciona sustrato fresco, ya sea simples [60] o compuestos [96]. Por ejemplo, Liu *et al.* [65] reporta un comportamiento oscilatorio cada 90 h aproximadamente, al añadir sustrato fresco (agua sintética) a una CCM operando con un consorcio microbiano de *Shewanella* y *Bacillus*.

No obstante, en esta investigación no se adicionó ARF fresca por lo que el comportamiento ondulatorio de V_{celda} en la Figura 6.11 puede deberse al metabolismo del *B. subtilis* con reacciones en cascada (transformar los compuestos complejos del ARF a productos más simples, que luego fueron metabolizados) o por un efecto de la iluminación y temperatura del laboratorio durante la operación de la CCM. Cabe destacar que el V_{celda} continuaba incrementando al finalizar la operación de la CCM, lo que sugiera la disponibilidad de compuestos orgánicos en el ARF para ser metabolizados.

6.6. Caracterización morfológica de bioánodos

6.6.1. Bioánodos después de inoculación

En la Figura 6.12 se presenta la morfología de los bioánodos después del crecimiento de biopelícula de *B. subtilis* por 6 días. Cuando se emplea GNSF, se tiene una superficie cubierta de *B. subtilis* (Figura 6.12a) demostrando una excelente biocompatibilidad, al igual que las imágenes presentadas por Garcia-Mayagoitia *et al.* [34].

No obstante, la combinación GNSF + *B. subtilis* no es altamente bioactiva, ya que una biopelícula excesivamente gruesa podría limitar la transferencia de electrones como se muestra en la Figura 6.9 [60, 62]. Por su parte, si bien catalizadores de la serie CCAF presentan un menor recubrimiento de *B. subtilis* en su superficie (Figura 6.12 b-d), se demuestra que existe biocompatibilidad de los biocarbones con la bacteria.

Los bioánodos desarrollados en esta investigación presentan un mayor recubrimiento de biopelícula que aquellos de tela de carbón reportadas por Liu *et al.* [65]. Sin embargo, el crecimiento de biopelícula no garantiza alta actividad bioelectroquímica como se muestra en la Figura 6.9 para CCA4.

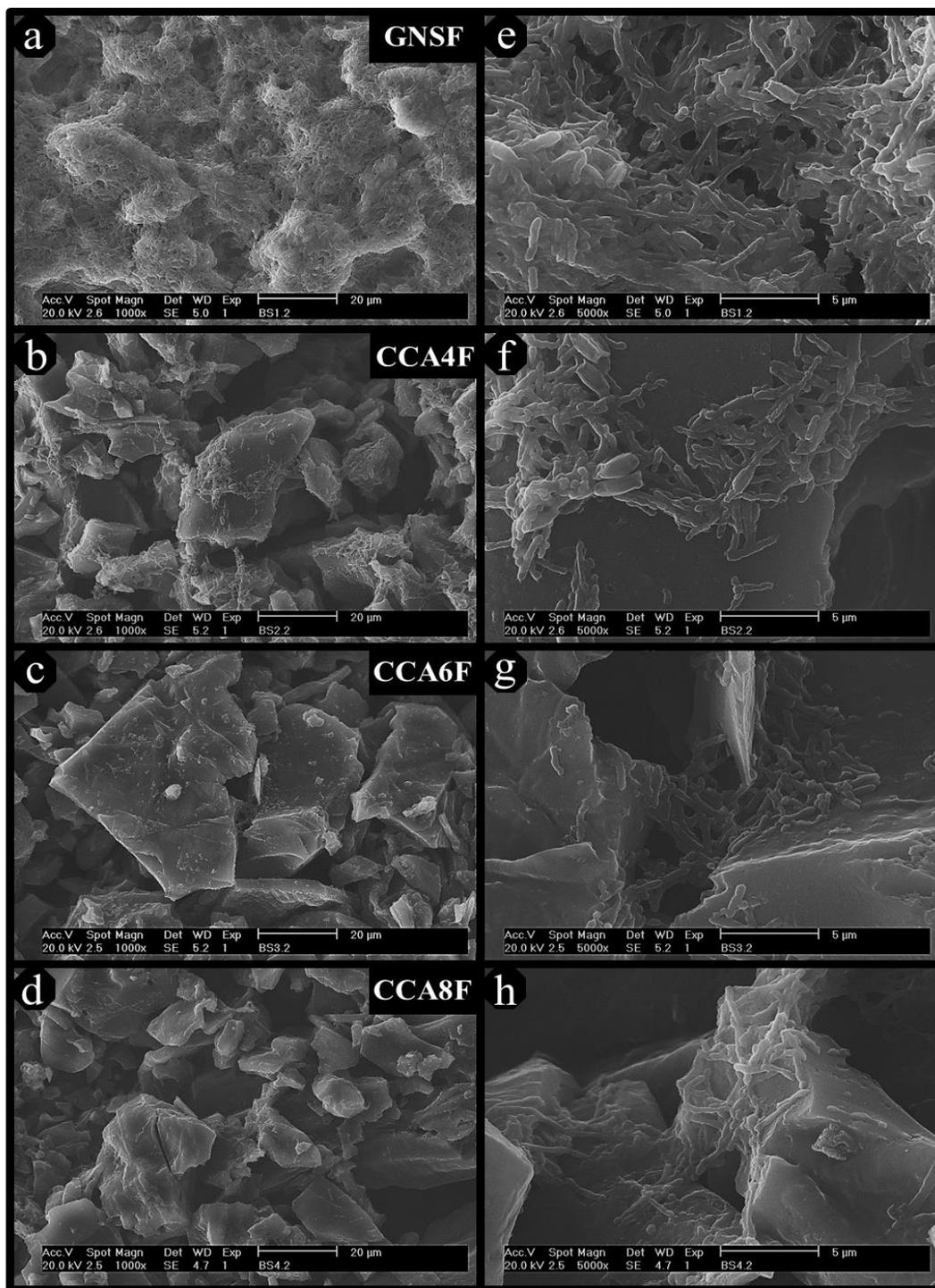


Figura 6.12. Morfología de bioánodos con capa catalítica de catalizadores carbonosos funcionalizados y biopelícula de *B. subtilis*. Micrografías tomadas después de inoculación por 6 días.

Las micrografías a mayores magnificación muestran la forma característica tipo bastón de *B. subtilis* y confirma la formación de una biopelícula en diferentes etapas según lo descrito por Vlamakis *et al.* [97].

GNSF presenta una biopelícula claramente con mayor grado de crecimiento con agregados de *B. subtilis* de amplio tamaño, organizados por la matriz extracelular (Figura 6.12e). Mientras tanto, los catalizadores CCAF desarrollan biopelículas en un estado de crecimiento, donde *B. subtilis* forman cadenas de células sin completar una matriz extracelular (Figura 6.12-h) como en el caso previo.

6.6.2. CCA8F + *B. subtilis* antes y después de evaluación en celda completa

En la Figura 6.13 se muestra la morfología de un corte transversal del bioánodo CCA8F + *B. subtilis*, previo a la prueba de larga duración de la CCM.

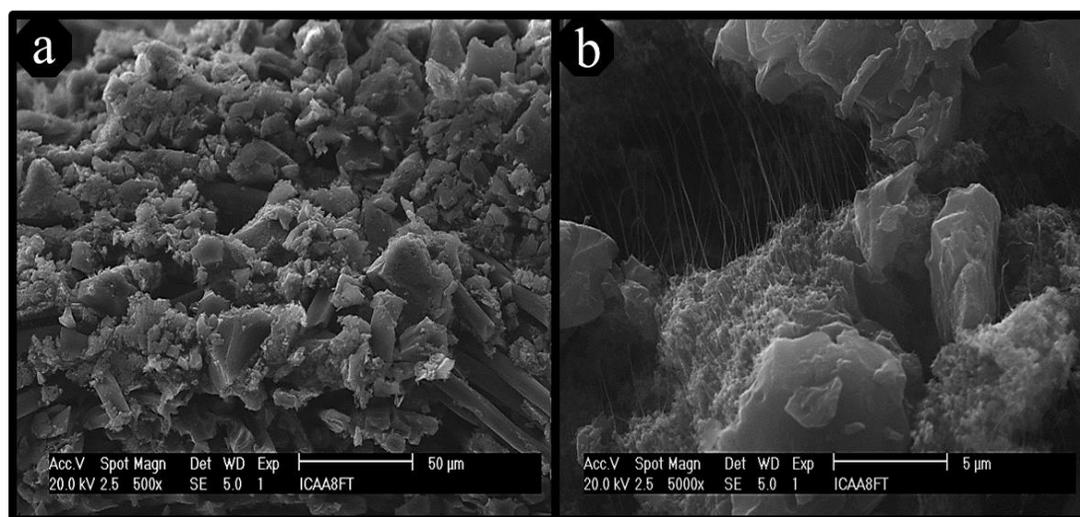


Figura 6.13. Micrografías de un corte transversal de bioánodo CCA8F + *B. subtilis* antes de su evaluación en la CCM.

En la Figura 6.13a se pueden distinguir la capa catalítica y la tela de carbón (Soporte), mientras en la Figura 6.13b se observa con mayor detalle la biopelícula de *B. subtilis* sobre el catalizador, donde se distingue la presencia de unos hilos finos que se atribuyen a polisacáridos generados por la bacteria durante su crecimiento.

Asimismo, en la Figura 6.14 se presentan micrografías de vista superior y de corte transversal del bioánodo después de ser utilizado en la CCM durante los 14 días de operación. En la Figura 6.14a, la morfología del bioánodo ha sido modificada con respecto a la mostrada en la Figura 6.12e. Al analizar la superficie a mayores aumentos, se observa el crecimiento de partículas esféricas y la presencia de *Bacillus* que cubren al bioánodo (Figura 6.14b). También, se presenta la morfología de otra zona del bioánodo con características similares en las Figuras 6.14c-d.

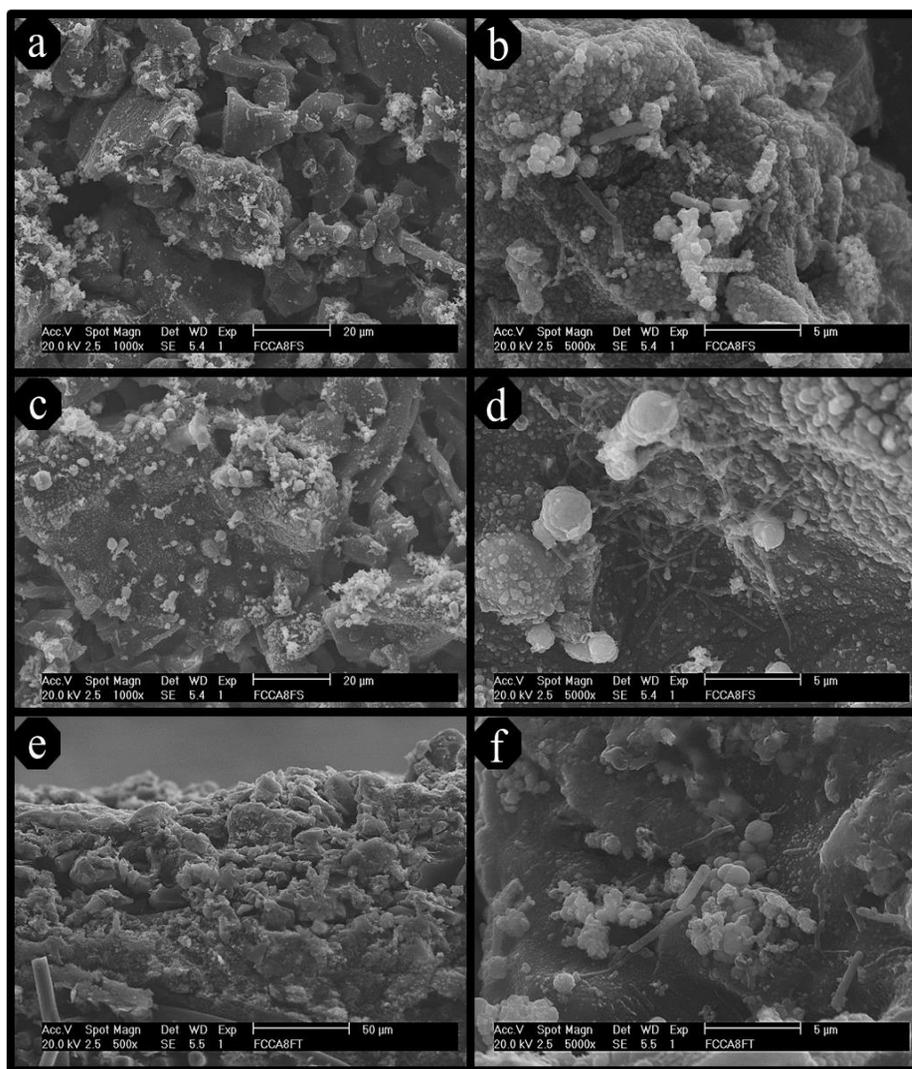


Figura 6.14. Morfología de bioánodo CCA8F + *B. subtilis* después de la prueba de larga duración en la CCM: a-d) vista superior y e-f) vista de corte transversal.

En particular, la Figura 6.14d muestra la formación de partículas de forma esférica de mayor tamaño, lo mismo que un mallado de bacterias con menor diámetro y mayor longitud que *B. subtilis*. Estas bacterias proceden muy probablemente del ARF. La modificación morfológica del bioánodo, debida al crecimiento de bacterias podría relacionarse con la mejora en el desempeño de la CCM en la prueba de larga duración.

En la Figura 6.14e se muestra una micrografía del corte transversal del bioánodo. En general, las características son similares a las de la Figura 6.13a, lo que muestra la estabilidad de la capa catalítica en el bioánodo después de su prueba en la CCM.

Con mayores aumentos (Figura 6.14f, aproximadamente 20 μm de profundidad en Figura 6.14e) es posible confirmar una morfología con la presencia de *B. subtilis* y bacterias desconocidas formando un consorcio microbiano, similar al reportado por Liu *et al.* [65] sobre tela de carbón.

Esto indica que el bioánodo es modificado por la presencia de bacterias hacia el interior de la capa catalítica y no sólo en su superficie durante la operación de la CCM.

6.7. Análisis de agua residual farmacéutica.

En la Tabla 6.6 se presentan los resultados del análisis de ARF para los días 1, 2, 7 y 14 de operación de la CCM. El ARF es altamente recalcitrante, debido a que los valores del análisis inicial son superiores a los reportados en diversos trabajos que han empleado ARF como sustrato en una CCM [73-75, 98].

Mientras tanto, el pH se mantiene en condiciones alcalinas ($\text{pH} > 7$), demostrando que *B. subtilis* posee actividad bioelectroquímica utilizando ARF como sustrato sin tratamiento previo. Este comportamiento fue reportado por Nimje *et al.* [64], donde *B. subtilis* se adaptó a condiciones alcalinas para utilizar glicerol como sustrato y generar mayor densidad de potencia que en condiciones ácidas.

Tabla 6.6. Análisis de ARF en el día inicial, 1, 7 y final de operación de la CCM.

Parámetro	Día 1	Día 2	Día 7	Día 14
pH	9.2	8.2	7.6	8.7
Conductividad (mS m ⁻¹)	2870	2880	2800	2720
DQO (mg L ⁻¹)	27603	22694	19202	ND ^a
DBO (mg L ⁻¹)	10433	ND	ND	9233.3
Nitrógeno de nitratos (mg L ⁻¹)	6.13	ND	ND	10.65
Fósforo total (mg L ⁻¹)	93.91	ND	ND	38.84
Ion sulfato (mg L ⁻¹)	1161	ND	ND	1068.17
Alcalinidad total (mg CaCO ₃ L ⁻¹)	3574	ND	ND	4099
Cloruros (mg L ⁻¹)	10616	ND	ND	9637
Sólidos disueltos totales (mg L ⁻¹)	30540	ND	ND	28000
Sólidos suspendidos totales (mg L ⁻¹)	3320	ND	ND	1880

^a No determinado

El tratamiento de ARF con la CCM se observa con la disminución de la DQO durante los días 2 y 7 de operación, equivalente al 17.8 y 30.4 % DQO removida, respectivamente. Sin embargo, la DQO al final de la operación de la CCM no pudo obtenerse por un manejo inadecuado durante el análisis.

Por otra parte, el nitrógeno de nitratos aumenta 1.74 veces después de 14 días en comparación con el valor inicial. La formación de nitratos se favorece con en un ambiente oxidativo como el de la cámara anódica, los cuales se acumulan a pesar de que los microorganismos los absorbieron y metabolizaron.

Sin embargo, el fósforo total contenido en ARF disminuye 2.42 veces al final de la operación de la CCM, debido que los microorganismos lo consumen. Asimismo, los sólidos disueltos totales y los sólidos suspendidos totales muestran una disminución al final de la operación de la CCM.

Conclusiones

Con base de los resultados obtenidos, se puede concluir que:

- La funcionalización con microondas modificó los catalizadores con estructura cristalina como el GNSF y el área superficial de los CCAF se incrementó 20 veces en comparación con el GNSF. Sin embargo, la mayor área superficial de los CCAF no modificó el crecimiento de las biopelículas de *B. subtilis* sobre la superficie del catalizador.
- Los catalizadores CCA6F y CCA8F mostraron la actividad catalítica más alta en ARF, debido a su alta área superficial y a una mayor conductividad eléctrica (en relación con CCA4F)
- *B. subtilis* es un MEA con actividad para promover reacciones bioelectroquímicas de materia orgánica en ARF.
- El bioánodo CCA8F + *B. subtilis* fue el más activo en ARF como sustrato. En la prueba de CCM completa generó energía eléctrica, además de llevar a cabo su tratamiento.
- La CCM mostró un comportamiento oscilatorio en cuanto a V_{celda} , aunque su desempeño mejoró durante la prueba. Esto fue atribuido a la formación/consumo de bacterias en la superficie del bioánodo, procedentes del ARF.
- El B-CCA8F, *B. subtilis* y el ARF tienen potencial para ser utilizados en aplicaciones de CCMs.

Referencias bibliográficas

1. F. Shariatzadeh, P. Mandal, A.K. Srivastava. Demand response for sustainable energy systems: a review, application and implementation strategy. *Renew. Sust. Energ. Rev.* 45 (2015) 343-350.
2. J. Fick, H. Söderström, R.H. Lindberg, C. Phan, M. Tysklind, D.G.J. Larsson. Contamination of surface, ground, and drinking water from pharmaceutical production. *Environ. Toxicol. Chem.* 28(12) (2009) 2522-2527.
3. S. Sorrell. Reducing energy demand: a review of issues, challenges and approaches. *Renew. Sust. Energ. Rev.* 47 (2015) 74-82.
4. S. Choi. Microscale microbial fuel cells: advances and challenges. *Biosens. Bioelectron.* 69 (2015) 8-25.
5. V.G. Gude. Wastewater treatment in microbial fuel cells – an overview. *J. Clean. Prod.* 122 (2016) 287-307.
6. V.S. Sarathi, K.S. Nahm. Recent advances and challenges in the anode architecture and their modifications for the applications of microbial fuel cells. *Biosens. Bioelectron.* 43 (2013) 461-475.
7. P. Pandey, V.N. Shinde, R.L. Deopurkar, S.P. Kale, S.A. Patil, D. Pant. Recent advances in the use of different substrates in microbial fuel cells toward wastewater treatment and simultaneous energy recovery. *Appl. Energy.* 168 (2016) 706-723.
8. W.-W. Li, H.-Q. Yu, Z. He. Towards sustainable wastewater treatment by using microbial fuel cells-centered technologies. *Energy. Environ. Sci.* 7(3) (2014) 911-924.
9. M. Rahimnejad, A. Adhami, S. Darvari, A. Zirepour, S.-E. Oh. Microbial fuel cell as new technology for bioelectricity generation: a review. *Alexandria Eng. J.* 54(3) (2015) 745-756.
10. F.J. Hernández-Fernández, A. Pérez de los Ríos, M.J. Salar-García, V.M. Ortiz-Martínez, L.J. Lozano-Blanco, C. Godínez, F. Tomás-Alonso, J. Quesada-Medina. Recent progress and perspectives in microbial fuel cells for bioenergy generation and wastewater treatment. *Fuel Process. Technol.* 138 (2015) 284-297.
11. Q. Zhang, J. Hu, D.-J. Lee. Microbial fuel cells as pollutant treatment units: research updates. *Bioresour. Technol.* 217 (2016) 121-128.

12. B.E. Logan, K. Rabaey. Conversion of wastes into bioelectricity and chemicals by using microbial electrochemical technologies. *Science*. 337(6095) (2012) 686-690.
13. Z. Du, H. Li, T. Gu. A state of the art review on microbial fuel cells: a promising technology for wastewater treatment and bioenergy. *Biotechnol. Adv.* 25(5) (2007) 464-482.
14. W. Zhi, Z. Ge, Z. He, H. Zhang. Methods for understanding microbial community structures and functions in microbial fuel cells: A review. *Bioresour. Technol.* 171 (2014) 461-468.
15. S.V. Mohan, G. Velvizhi, J.A. Modestra, S. Srikanth. Microbial fuel cell: critical factors regulating bio-catalyzed electrochemical process and recent advancements. *Renew. Sust. Energ. Rev.* 40 (2014) 779-797.
16. V.B. Oliveira, M. Simões, L.F. Melo, A.M.F.R. Pinto. Overview on the developments of microbial fuel cells. *Biochem. Eng. J.* 73 (2013) 53-64.
17. M. Lu, Y. Qian, L. Huang, X. Xie, W. Huang. Improving the performance of microbial fuel cells through anode manipulation. *ChemPlusChem.* 80(8) (2015) 1216-1225.
18. M. Oliot, S. Galier, H. Roux de Balmann, A. Bergel. Ion transport in microbial fuel cells: key roles, theory and critical review. *Appl. Energy.* 183 (2016) 1682-1704.
19. L.H. Li, Y.M. Sun, Z.H. Yuan, X.Y. Kong, Y. Li. Effect of temperature change on power generation of microbial fuel cell. *Environ. Technol.* 34(13-14) (2013) 1929-1934.
20. A.G. Capodaglio, D. Molognoni, S. Puig, M.D. Balaguer, J. Colprim. Role of operating conditions on energetic pathways in a microbial fuel cell. *Energy Procedia.* 74 (2015) 728-735.
21. 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(17) (2006) 5181-5192.
22. F. Zhao, R.C.T. Slade, J.R. Varcoe. Techniques for the study and development of microbial fuel cells: an electrochemical perspective. *Chem. Soc. Rev.* 38(7) (2009) 1926-1939.
23. B.E. Logan, *Microbial fuel cells*, John Wiley & Sons, New Jersey, 2008.

24. J.L. Varanasi, R. Veerubhotla, D. Das, in: D. Das (Eds.), *Microbial Fuel Cell: A Bioelectrochemical System that Converts Waste to Watts*, Springer International Publishing, Cham, 2018, pp. 249-268.
25. K. Scott, in: K. Scott and E.H. Yu (Eds.), *Microbial Electrochemical and Fuel Cells*, Woodhead Publishing, Boston, 2016, pp. 29-66.
26. B. Erable, N.M. Duțeanu, M.M. Ghangrekar, C. Dumas, K. Scott. Application of electro-active biofilms. *Biofouling*. 26(1) (2010) 57-71.
27. Y. Hindatu, M.S.M. Annuar, A.M. Gumel. Mini-review: anode modification for improved performance of microbial fuel cell. *Renew. Sust. Energ. Rev.* 73 (2017) 236-248.
28. B. Kim, J. An, D. Fapyane, I.S. Chang. Bioelectronic platforms for optimal bio-anode of bio-electrochemical systems: from nano- to macro scopes. *Bioresour. Technol.* 195 (2015) 2-13.
29. J.M. Sonawane, A. Yadav, P.C. Ghosh, S.B. Adeloju. Recent advances in the development and utilization of modern anode materials for high performance microbial fuel cells. *Biosens. Bioelectron.* 90 (2017) 558-576.
30. J. Wei, P. Liang, X. Huang. Recent progress in electrodes for microbial fuel cells. *Bioresour. Technol.* 102(20) (2011) 9335-9344.
31. C. Santoro, C. Arbizzani, B. Erable, I. Ieropoulos. Microbial fuel cells: from fundamentals to applications. A review. *J. Power Sources.* 356 (2017) 225-244.
32. D. Hidalgo, T. Tommasi, S. Bocchini, A. Chiolerio, A. Chiodoni, I. Mazzarino, B. Ruggeri. Surface modification of commercial carbon felt used as anode for microbial fuel cells. *Energy.* 99 (2016) 193-201.
33. R. Kumar, L. Singh, A.W. Zularisam. Exoelectrogens: recent advances in molecular drivers involved in extracellular electron transfer and strategies used to improve it for microbial fuel cell applications. *Renew. Sust. Energ. Rev.* 56 (2016) 1322-1336.
34. S. Garcia-Mayagoitia, F. Fernández-Luqueño, D. Morales-Acosta, N.M. Sanchez-Padilla, J.C. Carrillo-Rodríguez, I.L. Alonso-Lemus, F.J. Rodriguez-Varela. Evaluation of order mesoporous carbon as anode catalyst for microbial fuel cells applications. *ECS Trans.* 77(11) (2017) 1351-1357.

35. W.J. Pech-Rodríguez, D. Gonzalez-Quijano, G. Vargas-Gutierrez, J.I. Escalante-Garcia, F.J. Rodriguez-Varela. Electrochemical characterization of Pt nanocatalysts supported on functionalized Vulcan XC-72 for the EOR. *ECS Trans.* 61(29) (2014) 11-18.
36. K.S. Novoselov, A.K. Geim, S.V. Morozov, D. Jiang, Y. Zhang, S.V. Dubonos, I.V. Grigorieva, A.A. Firsov. Electric field effect in atomically thin carbon films. *Science.* 306(5696) (2004) 666.
37. F. Yu, C. Wang, J. Ma. Applications of graphene-modified electrodes in microbial fuel cells. *Materials.* 9(10) (2016) 807.
38. F. Razmjooei, K.P. Singh, M.Y. Song, J.-S. Yu. Enhanced electrocatalytic activity due to additional phosphorous doping in nitrogen and sulfur-doped graphene: a comprehensive study. *Carbon.* 78 (2014) 257-267.
39. C. Chang, X. Yang, S. Xiang, X. Lin, H. Que, M. Li. Nitrogen and sulfur co-doped glucose-based porous carbon materials with excellent electrochemical performance for supercapacitors. *J. Electrochem. Soc.* 164(7) (2017) A1601-A1607.
40. T. Xing, J. Sunarso, W. Yang, Y. Yin, A.M. Glushenkov, L.H. Li, P.C. Howlett, Y. Chen. Ball milling: a green mechanochemical approach for synthesis of nitrogen doped carbon nanoparticles. *Nanoscale.* 5(17) (2013) 7970-7976.
41. M. Yi, Z. Shen. A review on mechanical exfoliation for the scalable production of graphene. *J. Mater. Chem. A.* 3(22) (2015) 11700-11715.
42. K. Katuri, M.L. Ferrer, M.C. Gutierrez, R. Jimenez, F. del Monte, D. Leech. Three-dimensional microchannelled electrodes in flow-through configuration for bioanode formation and current generation. *Energy. Environ. Sci.* 4(10) (2011) 4201-4210.
43. P.Y. You, S.K. Kamarudin. Recent progress of carbonaceous materials in fuel cell applications: an overview. *Chem. Eng. J.* 309 (2017) 489-502.
44. B.E. Logan, M.J. Wallack, K.-Y. Kim, W. He, Y. Feng, P.E. Saikaly. Assessment of microbial fuel cell configurations and power densities. *Environ. Sci. Technol. Lett.* 2(8) (2015) 206-214.
45. V. Benítez, E. Mollá, M.A. Martín-Cabrejas, Y. Aguilera, F.J. López-Andréu, K. Cools, L.A. Terry, R.M. Esteban. Characterization of industrial onion wastes (*Allium*

- cepa L.): dietary fibre and bioactive compounds. *Plant Foods for Human Nutrition*. 66(1) (2011) 48-57.
46. K. Sharma, N. Mahato, S.H. Nile, E.T. Lee, Y.R. Lee. Economical and environmentally-friendly approaches for usage of onion (*Allium cepa* L.) waste. *Food Funct.* 7(8) (2016) 3354-3369.
 47. D. Li, L. Deng, H. Yuan, G. Dong, J. Chen, X. Zhang, Y. Chen, Y. Yuan. N, P-doped mesoporous carbon from onion as trifunctional metal-free electrode modifier for enhanced power performance and capacitive manner of microbial fuel cells. *Electrochim. Acta.* 262 (2018) 297-305.
 48. S. Yang, X. Mao, Z. Cao, Y. Yin, Z. Wang, M. Shi, H. Dong. Onion-derived N, S self-doped carbon materials as highly efficient metal-free electrocatalysts for the oxygen reduction reaction. *Appl. Surf. Sci.* 427 (2018) 626-634.
 49. Y. Ait Ouaisa, M. Chabani, A. Amrane, A. Bensmaili. Removal of Cr(VI) from model solutions by a combined electrocoagulation sorption process. *Chem. Eng. Technol.* 36(1) (2013) 147-155.
 50. C. Saka, Ö. Şahin, H. Demir, M. Kahyaoğlu. Removal of Lead(II) from aqueous solutions using pre-boiled and formaldehyde-treated onion skins as a new adsorbent. *Sep. Sci. Technol.* 46(3) (2011) 507-517.
 51. C. Saka, Ö. Şahin, H. Adsoy, Ş.M. Akyel. Removal of methylene blue from aqueous solutions by using cold plasma, microwave radiation and formaldehyde treated acorn shell. *Sep. Sci. Technol.* 47(10) (2012) 1542-1551.
 52. A.P. Periasamy, R. Ravindranath, P. Roy, W.-P. Wu, H.-T. Chang, P. Veerakumar, S.-B. Liu. Carbon-boron core-shell microspheres for the oxygen reduction reaction. *J. Mater. Chem. A.* 4(33) (2016) 12987-12994.
 53. R. Bandi, B.R. Gangapuram, R. Dadigala, R. Eslavath, S.S. Singh, V. Guttena. Facile and green synthesis of fluorescent carbon dots from onion waste and their potential applications as sensor and multicolour imaging agents. *RSC Adv.* 6(34) (2016) 28633-28639.
 54. M. Ghasemi, W.R.W. Daud, S.H.A. Hassan, S.-E. Oh, M. Ismail, M. Rahimnejad, J.M. Jahim. Nano-structured carbon as electrode material in microbial fuel cells: a comprehensive review. *J. Alloys Compd.* 580 (2013) 245-255.

55. M. Rosenbaum, F. Aulenta, M. Villano, L.T. Angenent. Cathodes as electron donors for microbial metabolism: which extracellular electron transfer mechanisms are involved? *Bioresour. Technol.* 102(1) (2011) 324-333.
56. C.I. Torres, A.K. Marcus, H.-S. Lee, P. Parameswaran, R. Krajmalnik-Brown, B.E. Rittmann. A kinetic perspective on extracellular electron transfer by anode-respiring bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* 34(1) (2010) 3-17.
57. S. Venkata Mohan, G. Velvizhi, J. Annie Modestra, S. Srikanth. Microbial fuel cell: Critical factors regulating bio-catalyzed electrochemical process and recent advancements. *Renew. Sustainable Energy Rev.* 40 (2014) 779-797.
58. Y. Liu, J. Li, G. Du, J. Chen, L. Liu. Metabolic engineering of *Bacillus subtilis* fueled by systems biology: Recent advances and future directions. *Biotechnol. Adv.* 35(1) (2017) 20-30.
59. J.A. Modestra, S.V. Mohan. Bio-electrocatalyzed electron efflux in Gram positive and Gram negative bacteria: an insight into disparity in electron transfer kinetics. *RSC Adv.* 4(64) (2014) 34045-34055.
60. V.R. Nimje, C.-Y. Chen, C.-C. Chen, J.-S. Jean, A.S. Reddy, C.-W. Fan, K.-Y. Pan, H.-T. Liu, J.-L. Chen. Stable and high energy generation by a strain of *Bacillus subtilis* in a microbial fuel cell. *J. Power Sources.* 190(2) (2009) 258-263.
61. V.R. Nimje, C.-Y. Chen, C.-C. Chen, J.-S. Jean, A. Satyanarayana Reddy, C.-W. Fan, K.-Y. Pan, H.-T. Liu, J.-L. Chen. Corrigendum to “Stable and high energy generation by a strain of *Bacillus subtilis* in a microbial fuel cell” [*J. Power Sources* 190 (2) (2009) 258–263]. *J. Power Sources.* 195(16) (2010) 5427-5428.
62. V.R. Nimje, C.-C. Chen, H.-R. Chen, C.-Y. Chen, M.-J. Tseng, K.-C. Cheng, R.-C. Shih, Y.-F. Chang. A single-chamber microbial fuel cell without an air cathode. *Int. J. Mol. Sci.* 13(3) (2012) 3933.
63. H. Hassan, B. Jin, S. Dai, T. Ma, C. Saint. Chemical impact of catholytes on *Bacillus subtilis*-catalysed microbial fuel cell performance for degrading 2,4-dichlorophenol. *Chem. Eng. J.* 301 (2016) 103-114.
64. V.R. Nimje, C.-Y. Chen, C.-C. Chen, H.-R. Chen, M.-J. Tseng, J.-S. Jean, Y.-F. Chang. Glycerol degradation in single-chamber microbial fuel cells. *Bioresour. Technol.* 102(3) (2011) 2629-2634.

65. T. Liu, Y.-Y. Yu, T. Chen, W.N. Chen. A synthetic microbial consortium of *Shewanella* and *Bacillus* for enhanced generation of bioelectricity. *Biotechnol. Bioeng.* 114(3) (2017) 526-532.
66. Z.Z. Ismail, A.J. Jaeel. Sustainable power generation in continuous flow microbial fuel cell treating actual wastewater: influence of biocatalyst type on electricity production. *Sci. World. J.* 2013 (2013) 7.
67. J.C. Carrillo-Rodríguez, S. García-Mayagoitia, R. Pérez-Hernández, M.T. Ochoa-Lara, F. Espinosa-Magaña, F. Fernández-Luqueño, I.L. Alonso-Lemus, F.J. Rodríguez-Varela. High performance Pd-CeO₂-NR supported on graphene and N-doped graphene for the ORR and its application in a microbial fuel cell. *ECS Trans.* 77(11) (2017) 1359-1365.
68. S. Garcia-Mayagoita, Aplicación de matrices carbonosas como ánodos para producción de energía y reducción de compuestos orgánicos por *Bacillus subtilis*, *Sustentabilidad de los Recursos Naturales y Energía en: Cinvestav - Unidad Saltillo, Ramos Arizpe*, 2016.
69. H. Wang, Z.J. Ren. A comprehensive review of microbial electrochemical systems as a platform technology. *Biotechnol. Adv.* 31(8) (2013) 1796-1807.
70. A.M. Deegan, B. Shaik, K. Nolan, K. Urell, M. Oelgemöller, J. Tobin, A. Morrissey. Treatment options for wastewater effluents from pharmaceutical companies. *Int. J. Environ. Sci. Te.* 8(3) (2011) 649-666.
71. R.S. Rana, P. Singh, V. Kandari, R. Singh, R. Dobhal, S. Gupta. A review on characterization and bioremediation of pharmaceutical industries' wastewater: an indian perspective. *Appl. Water Sci.* 7(1) (2017) 1-12.
72. Q. Wen, F. Kong, H. Zheng, D. Cao, Y. Ren, J. Yin. Electricity generation from synthetic penicillin wastewater in an air-cathode single chamber microbial fuel cell. *Chem. Eng. J.* 168(2) (2011) 572-576.
73. G. Velvizhi, S.V. Mohan. Electrogenic activity and electron losses under increasing organic load of recalcitrant pharmaceutical wastewater. *Int. J. Hydrogen Energy.* 37(7) (2012) 5969-5978.

74. R. Liu, C. Gao, Y.-G. Zhao, A. Wang, S. Lu, M. Wang, F. Maqbool, Q. Huang. Biological treatment of steroidal drug industrial effluent and electricity generation in the microbial fuel cells. *Bioresour. Technol.* 123 (2012) 86-91.
75. G. Velvizhi, S.V. Mohan. Biocatalyst behavior under self-induced electrogenic microenvironment in comparison with anaerobic treatment: Evaluation with pharmaceutical wastewater for multi-pollutant removal. *Bioresour. Technol.* 102(23) (2011) 10784-10793.
76. V.G. Gude. Energy and water autarky of wastewater treatment and power generation systems. *Renew. Sust. Energ. Rev.* 45 (2015) 52-68.
77. C. Schneidermann, N. Jäckel, S. Oswald, L. Giebeler, V. Presser, L. Borchardt. Solvent-free mechanochemical synthesis of Nitrogen-doped nanoporous carbon for electrochemical energy storage. *ChemSusChem.* 10(11) (2017) 2416-2424.
78. J. Liu, Y. Deng, X. Li, L. Wang. Promising nitrogen-rich porous carbons derived from one-step calcium chloride activation of biomass-based waste for high performance Supercapacitors. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering.* 4(1) (2016) 177-187.
79. Z. Yu, Y. Bai, Y. Wang, Y. Liu, Y. Zhao, Y. Liu, K. Sun. One-step synthesis of three-dimensional nitrogen and sulfur co-doped graphene networks as low cost metal-free counter electrodes for dye-sensitized solar cells. *Chem. Eng. J.* 311 (2017) 302-309.
80. S. Motozuka, M. Tagaya, N. Ogawa, K. Fukui, M. Nishikawa, K. Shiba, T. Uehara, T. Kobayashi. Effective preparation of graphite nanoparticles using mechanochemical solid-state reactions. *Solid State Commun.* 190 (2014) 28-32.
81. T.S. Ong, H. Yang. Effect of atmosphere on the mechanical milling of natural graphite. *Carbon.* 38(15) (2000) 2077-2085.
82. S.H. Kim, C.M. Lee, K. Kafle. Characterization of crystalline cellulose in biomass: Basic principles, applications, and limitations of XRD, NMR, IR, Raman, and SFG. *Korean J. Chem. Eng.* 30(12) (2013) 2127-2141.
83. I.L. Alonso-Lemus, F.J. Rodriguez-Varela, M.Z. Figueroa-Torres, M.E. Sanchez-Castro, A. Hernandez-Ramírez, D. Lardizabal-Gutierrez, P. Quintana-Owen. Novel self-nitrogen-doped porous carbon from waste leather as highly active metal-free electrocatalyst for the ORR. *Int. J. Hydrogen Energy.* 41(48) (2016) 23409-23416.

84. C. Liu, X. Liu, J. Tan, Q. Wang, H. Wen, C. Zhang. Nitrogen-doped graphene by all-solid-state ball-milling graphite with urea as a high-power lithium ion battery anode. *J. Power Sources*. 342 (2017) 157-164.
85. V. Leon, M. Quintana, M.A. Herrero, J.L.G. Fierro, A.d.l. Hoz, M. Prato, E. Vazquez. Few-layer graphenes from ball-milling of graphite with melamine. *Chem. Commun.* 47(39) (2011) 10936-10938.
86. L. Liu, Z. Xiong, D. Hu, G. Wu, P. Chen. Production of high quality single- or few-layered graphene by solid exfoliation of graphite in the presence of ammonia borane. *Chem. Commun.* 49(72) (2013) 7890-7892.
87. M. Wu, J. Wang, Z. Wu, H.L. Xin, D. Wang. Synergistic enhancement of nitrogen and sulfur co-doped graphene with carbon nanosphere insertion for the electrocatalytic oxygen reduction reaction. *J. Mater. Chem. A*. 3(15) (2015) 7727-7731.
88. T.-H. Liou. Development of mesoporous structure and high adsorption capacity of biomass-based activated carbon by phosphoric acid and zinc chloride activation. *Chem. Eng. J.* 158(2) (2010) 129-142.
89. Z. Liu, A. Quek, S. Kent Hoekman, R. Balasubramanian. Production of solid biochar fuel from waste biomass by hydrothermal carbonization. *Fuel*. 103 (2013) 943-949.
90. X. Wang, J. Wang, D. Wang, S. Dou, Z. Ma, J. Wu, L. Tao, A. Shen, C. Ouyang, Q. Liu, S. Wang. One-pot synthesis of nitrogen and sulfur co-doped graphene as efficient metal-free electrocatalysts for the oxygen reduction reaction. *Chem. Commun.* 50(37) (2014) 4839-4842.
91. M. Thommes, K. Kaneko, V. Neimark Alexander, P. Olivier James, F. Rodriguez-Reinoso, J. Rouquerol, S.W. Sing Kenneth, Physisorption of gases, with special reference to the evaluation of surface area and pore size distribution (IUPAC Technical Report), in *Pure Appl. Chem.*, 2015, p. 1051.
92. K.A. Cychosz, R. Guillet-Nicolas, J. Garcia-Martinez, M. Thommes. Recent advances in the textural characterization of hierarchically structured nanoporous materials. *Chem. Soc. Rev.* 46(2) (2017) 389-414.
93. T. Horikawa, D.D. Do, D. Nicholson. Capillary condensation of adsorbates in porous materials. *Adv. Colloid Interface Sci.* 169(1) (2011) 40-58.

94. X. Liu, W. Zhou, L. Yang, L. Li, Z. Zhang, Y. Ke, S. Chen. Nitrogen and sulfur co-doped porous carbon derived from human hair as highly efficient metal-free electrocatalysts for hydrogen evolution reactions. *J. Mater. Chem. A*. 3(16) (2015) 8840-8846.
95. J. Babauta, R. Renslow, Z. Lewandowski, H. Beyenal. Electrochemically active biofilms: facts and fiction. A review. *Biofouling*. 28(8) (2012) 789-812.
96. N. Lu, S.-g. Zhou, L. Zhuang, J.-t. Zhang, J.-r. Ni. Electricity generation from starch processing wastewater using microbial fuel cell technology. *Biochem. Eng. J.* 43(3) (2009) 246-251.
97. H. Vlamakis, Y. Chai, P. Beaugard, R. Losick, R. Kolter. Sticking together: building a biofilm the *Bacillus subtilis* way. *Nature Reviews Microbiology*. 11 (2013) 157.
98. Z.Z. Ismail, A.A. Habeeb. Experimental and modeling study of simultaneous power generation and pharmaceutical wastewater treatment in microbial fuel cell based on mobilized biofilm bearers. *Renewable Energy*. 101 (2017) 1256-1265.