



**Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del  
Instituto Politécnico Nacional  
Unidad Saltillo**

**sustentabilidad de los Recursos Naturales y Energía**

**APLICACIÓN DE MATRICES CARBONOSAS COMO ÁNODOS PARA  
PRODUCCIÓN DE ENERGÍA ELÉCTRICA Y REDUCCIÓN DE COMPUESTOS  
ORGÁNICOS POR *Bacillus subtilis*.**

TESIS

Que presenta

**SELVIA GARCIA MAYAGOITIA**

Para obtener el grado de

MAESTRO EN CIENCIAS EN

SUSTENTABILIDAD DE LOS RECURSOS NATURALES Y ENERGÍA

DIRECTORES DE TESIS

DR. FRANCISCO JAVIER RODRÍGUEZ VARELA  
DR. FABIÁN FERNÁNDEZ LUQUEÑO

Ramos Arizpe, Coahuila.

Diciembre de 2016

Around here,  
**we don't look backwards**  
for very long...  
*We keep moving forward,*  
opening up new doors and  
doing new things  
because we're curious...  
and curiosity keeps leading us  
down new paths  
WALT DISNEY

## **Dedicatoria**

Esta tesis se la dedico a mi familia,  
Andrea, Abigail y Adrián los amo, ustedes son mi motor de vida.

GRACIAS por creer en este sueño.

## **Agradecimientos**

A Dios por estar siempre presente en mi vida y guiarme en el camino para seguir hacia adelante.

Agradezco infinitamente a mis directores de tesis, al Dr. Francisco Javier Rodríguez Varela, por compartir sus conocimientos, por su paciencia y dedicación para aprender y complementar mis estudios de maestría, además le agradezco por creer en mí. Al Dr. Fabián Fernández Luqueño por sus consejos y dedicación a la elaboración de éste proyecto. A Dra. Diana Morales Acosta y Dra. Ivonne Alonso, por su apoyo durante la realización de ésta tesis.

A mi mamá Selvia por todo su apoyo, a mis hermanos Dana y Luis Felipe, por estar presentes en todo momento, a mi abuelito Paco, por ser mi ejemplo. A Mauricio por haber formado parte de mi vida.

A mis compañeros de laboratorio, que algunos solo estuvieron de paso pero siguen apoyando de lejos, de los cuales sigo aprendiendo como Wilian Pech, Nora Sánchez, Perla Meléndez, Anna Hernández y en especial Adriana Siller, de la cual sigo aprendiendo mucho.

A Juan Carlos Carrillo, César Sarabia, Noé Soza y Dulze López, que además de ser compañeros de maestría, son excelentes amigos, de los cuales no solo aprendí lo académico también aprendí de amistad y apoyo mutuo.

A mis amigas de vida, Laizmy, Iris, Natalia, Rocío y Diana, por creer en mí, y siempre apoyarme a cumplir mis objetivos y llegar a mis metas.

Al CINVESTAV Saltillo y personal por brindarme las facilidades para realizar este trabajo.

Al CONACYT por la beca otorgada para el desarrollo de la tesis de maestría.

A todas las personas que compartieron conmigo sus conocimientos para concluir esta tesis.

## TABLA DE CONTENIDO

Resumen .....	I
Introducción .....	1
Justificación .....	5
Objetivos .....	6
Capítulo 1. Antecedentes .....	7
1.1 Fundamentos de las CCM .....	8
1.2 CCM de dos compartimentos .....	9
1.3 Ánodos para CCM .....	10
1.4 Microorganismos en las CCM .....	12
1.5 Mecanismos de Transferencia de Electrones por el microorganismo .....	13
1.6 Sustratos y Aguas Residuales .....	15
Capítulo 2. Metodología .....	17
2.1 Reactivos y materiales utilizados .....	18
2.3 Inóculo .....	19
2.4 Desarrollo de catalizadores para ánodos .....	20
2.4.1 Síntesis y funcionalización de Carbón Mesoporoso Ordenado (CMO) ..	20
2.4.2 Vulcan XC-72 y grafito .....	21
2.5 Caracterización fisicoquímica de los catalizadores .....	21
2.6 Fabricación de los electrodos .....	23
2.7 Formación de biopelículas en los electrodos de carbono .....	24
2.8 Evaluación de actividad catalítica de los catalizadores en media celda .....	24
Capítulo 3. Caracterización de Agua Residual y Evaluación Fisicoquímica de los Materiales Carbonosos .....	28
3.1 Caracterización del agua residual .....	29
3.2 Caracterización fisicoquímica de los Materiales Carbonosos .....	29
3.2.1 Difracción de Rayos X (DRX) .....	29
3.2.2 Espectroscopia Raman .....	30
3.2.3 Espectroscopia de Infrarrojo con transformada de Fourier (FTIR) .....	32
3.2.4 Caracterización por Espectroscopia de Energía Dispersiva de Rayos X (EDX) .....	34

<b>3.2.6</b>	<b>Análisis por Microscopía Electrónica de Barrido (MEB) de polvos de los catalizadores.....</b>	<b>35</b>
<b>3.2.7</b>	<b>Análisis por Microscopía Electrónica de Barrido (MEB) de los electrodos. ....</b>	<b>36</b>
<b>Capítulo 4.</b>	<b>Evaluación Electroquímica de Catalizadores Carbonosos .....</b>	<b>39</b>
<b>4.1</b>	<b>Evaluación en media celda .....</b>	<b>40</b>
<b>4.1.1.</b>	<b>Comportamiento de electrodos con catalizadores de Grafito sin funcionalizar y funcionalizado .....</b>	<b>40</b>
<b>4.1.2</b>	<b>Comportamiento de electrodos de Vulcan XC-72 y Vulcan XC-72 funcionalizado .....</b>	<b>41</b>
<b>4.1.3</b>	<b>Comportamiento de electrodos con catalizadores de Carbón Mesoporoso Ordenado (CMO) sin funcionalizar y funcionalizado .....</b>	<b>42</b>
<b>4.2</b>	<b>Caracterización de los catalizadores como ánodos en una Celda de Combustible Microbiana (CCM) .....</b>	<b>44</b>
<b>4.2.1</b>	<b>Evaluación de comportamiento de ánodos y cátodo mediante Barrido Lineal de Potencial (BLP).....</b>	<b>45</b>
<b>4.2.2</b>	<b>Evaluación en Electrocatalizadores Carbonosos Celda de Combustible Microbiana. ....</b>	<b>46</b>
<b>4.2.2.1</b>	<b>Curvas de polarización .....</b>	<b>46</b>
<b>4.2.2.2</b>	<b>Curvas de densidad de potencia .....</b>	<b>48</b>
<b>Conclusiones generales .....</b>		<b>50</b>

## Lista de Figuras

<b>Figura 1.1</b>	Celda de Combustible Microbiana de doble cámara.....	4
<b>Figura 1.2</b>	Esquemas de mecanismos de transferencia de electrones extracelulares.....	8
<b>Figura 2.1</b>	Electrodos pintados con tinta catalítica hecha a partir de los materiales carbonosos.....	17
<b>Figura 2.2</b>	Esquema de la CCM utilizada para la evaluación de los catalizadores .....	19
<b>Figura 3.1</b>	Patrones de difracción de Vulcan XC-72, Grafito y CMO.....	24
<b>Figura 3.2</b>	Espectros Raman de materiales carbonosos.....	25
<b>Figura 3.3</b>	Espectros de FT-IR de los electrodos .....	27
<b>Figura 3.4</b>	Imágenes de MEB.....	30
<b>Figura 3.5</b>	Imágenes de MEB, donde se observa el crecimiento de biopelícula sobre los electrodos.....	31
<b>Figura 4.1</b>	VCs de los electrodos conteniendo a) Grafito y b) Grafito funcionalizado, sin y con biopelícula de <i>B.subtilis</i> .....	35
<b>Figura 4.2</b>	VC's de los electrodos conteniendo a) Vulcan y b) Vulcan funcionalizado, sin y con biopelícula de <i>B.subtilis</i> .....	36
<b>Figura 4.3</b>	VC's de los electrodos conteniendo a) CMO y b) CMO funcionalizado, sin y con biopelícula de <i>B.subtilis</i> .....	37
<b>Figura 4.4</b>	Fotografías de CCM.....	38
<b>Figura 4.5</b>	Barrido lineal de potencial en CCM.....	40
<b>Figura 4.6</b>	Curvas de polarización de la CCM con diferentes ánodos.....	42
<b>Figura 4.7</b>	Curvas $P_{\text{celda}}$ vs. $j_{\text{celda}}$ de la CCM equipada con los ánodos .....	43

## **Lista de Tablas**

<b>Tabla 2.1</b> Reactivos y materiales utilizados.....	12
<b>Tabla 3.1</b> Parámetros fisicoquímicos del agua residual.....	23
<b>Tabla 3.2</b> Composición química de los catalizadores carbonosos .....	28
<b>Tabla 3.3</b> Área superficial específica y diámetro promedio de poro de catalizadores de Vulcan y CMO.....	29
<b>Tabla 4.1</b> Condiciones de la CCM durante operación con diferentes ánodos.....	39

## Glosario de términos y abreviaturas

**A<sub>an</sub>** Área geométrica del ánodo

**ARF** Agua Residual Farmacéutica

***B.subtilis*** *Bacillus subtilis*

**BET** Análisis de área superficial

**CCM** Celda de Combustible Microbiano

**CMO** Carbón Mesoporoso Ordenado

**DRX** Difracción de rayos X

**E<sub>celda</sub>** Voltaje de circuito abierto de la celda

**EDS** Espectroscopía por dispersión de energía de rayos X

**TEE** Transferencia de electrones extracelular (Extracell electron transfer)

**FT-IR** Espectroscopía de Infrarrojo con Transformada de Fourier

**I<sub>celda</sub>** Corriente de celda

**j** Densidad de corriente, en mA cm<sup>-2</sup>

**j<sub>celda</sub>** Densidad de corriente de celda mA m<sup>-2</sup>

**BLP** Barrido lineal de potencial (Linear Sweep Voltammetry)

**MB** Membrana bipolar

**MEB** Microscopía Electrónica de Barrido

**MET** Microscopía Electrónica de Transmisión

**MeOH** Metanol

**MIC** Membrana de intercambio catiónica

**MIA** Membrana de intercambio aniónica

**MU** Membrana de ultrafiltración

**P<sub>celda</sub>** Potencia de celda

**Pt/C** Catalizador de Platino soportado en carbono

**Raman** Espectroscopía RAMAN

**R<sub>ext</sub>** Resistencia externa

**RHE** Reversible Hydrogen Electrode (Electrodo reversible de hidrógeno)

**VC** Voltamperogramas cíclicos

**v** Velocidad de barrido

## Resumen

En este trabajo, Carbón Mesoporoso Ordenado (CMO) fue sintetizado utilizando la técnica de autoensamble en fase acuosa y evaluado como catalizador de ánodo para aplicación en Celdas de Combustibles Microbianas (CCMs). Como precursor de la biopelícula anódica se utilizó *Bacillus subtilis* (*B.subtilis*). El desempeño electroquímico del CMO fue comparado con el de Vulcan XC-72 y hojuelas de Grafito, ambos comerciales. Además, algunas muestras de los materiales carbonosos fueron funcionalizados con metanol (MeOH) como agente químico, para evaluar el efecto de los grupos funcionales adsorbidos sobre la superficie en su actividad catalítica. Los electrodos utilizados tanto en media celda como en CCM fueron fabricados depositando los catalizadores carbonosos en tela de carbón por la técnica de pincel.

La formación de una biopelícula por *B.subtilis* en algunos de los electrodos se determinó por análisis de MEB. La caracterización por Raman confirmó las señales de las bandas G y D de las muestras carbonosas. Por su parte, los patrones de DRX mostraron los picos de reflexión característicos de materiales carbonosos. Por otro lado, los estudios de textura por BET confirmaron que el CMO tiene una estructura mesoporosa.

La caracterización electroquímica de los electrodos en media celda por Voltametría Cíclica (VC), empleando Agua Residual Farmacéutica (ARF) como electrolito, mostró una actividad catalítica más alta en el caso del CMO conteniendo la biopelícula de *B.subtilis*. El desempeño del CMO fue mejor comparado con el Vulcan y el Grafito. La actividad catalítica del CMO se incrementó con su funcionalización.

Ánodos basados en CMO funcionalizado, CMO y Vulcan XC-72 (estos últimos sin funcionalizar) conteniendo biopelícula de *B.subtilis*, fueron caracterizados en una CCM. Como electrolito en la cámara anódica se utilizó ARF. En la cámara catódica se empleó un cátodo de Pt/C en un electrolito de KOH con pH = 9. El desempeño de la CCM se incrementó notablemente al utilizar CMO funcionalizado + *B.subtilis* como ánodo, generando un voltaje de circuito abierto y una densidad de corriente significativamente más altos que los otros dos ánodos carbonosos. Más aún, la actividad catalítica de CMO funcionalizado fue incluso más alta que la de un ánodo basado en Pt/C comercial.

La evaluación catalítica indicó que el CMO funcionalizado con MeOH es una alternativa atractiva como electrocatalizador anódico para aplicaciones en CCMs. No solo por su comportamiento electrocatalítico, sino también por su bajo costo y su biocompatibilidad para el crecimiento de microorganismos.

## Abstract

In this work, Ordered Mesoporous Carbon (OMC) has been synthesized via self-assembly in aqueous phase and has been evaluated as anode catalyst for Microbial Fuel Cells (MFC's) applications. *Bacillus subtilis* (*B.subtilis*) was employed as precursor for the formation of a biofilm. The electrochemical performance of OMC had been compared to that of commercial Vulcan XC-72 and Graphite flakes. Moreover, some samples of the carbonaceous materials were functionalized using methanol (MeOH) as chemical agent, in order to evaluate the effect of surface functional groups on their catalytic activity. The electrodes used both in half cell and in MFC were fabricated depositing the carbonaceous materials on the carbon cloth using the painting technique.

The formation of a biofilm by *Bacillus subtilis* on some of the electrodes was determined from SEM analysis. Raman characterization confirmed the presence of G and D bands of the carbon samples. Meanwhile, the XRD analysis showed the reflection patterns characteristic of carbonaceous materials. On the other hand, textural studies by BET showed that OMC has a mesoporous structure.

The electrochemical characterization of the electrodes in half cell by Cyclic Voltammetry (CV), employing pharmaceutical waste water (PWW) as electrolyte, showed a higher catalytic activity with the anodes based on OMC, compared to Vulcan and Graphite. Even more, the catalytic activity of OMC was increased after functionalization.

Anodes based on functionalized OMC, OMC and Vulcan XC-72 (the latest with no functionalization) containing the biofilm of *B.subtilis* were characterized in a MFC. PWW was used as electrolyte in the anodic chamber. In the cathodic chamber, the electrode was a Pt/C cathode in KOH electrolyte (pH = 9.6). The performance of the MFC was increased when equipped with an anode based on functionalized OMC + *B. subtilis* biofilm, generating an open circuit voltage and a current density significantly higher compared with the other two carbonaceous anodes. Even more, the catalytic activity of functionalized OMC was higher than that of an anode based on commercial Pt/C containing *B. subtilis*.

The evaluation of catalytic activity showed that OMC functionalized with MeOH is an attractive alternative as anode electrocatalyst for MFC's applications. Not only for its electrocatalytic behavior, also for its low cost and its biocompatibility for the growth of microorganisms.

## **Introducción**

## Introducción

En las últimas décadas, los combustibles fósiles han sido la principal fuente de energía eléctrica en las diversas actividades del ser humano, pero estos recursos son limitados. Además, su uso y quema producen contaminantes que contribuyen en su mayoría al calentamiento global. Buscando solucionar esta problemática, durante los últimos años se han desarrollado tecnologías para reducir el uso de hidrocarburos mediante la aplicación de fuentes de energía renovables. En este sentido, el uso de biomasa residual, a partir de la cual se puede obtener energía sin dañar el medio ambiente, es una de las tecnologías alternativas que pueden ser consideradas.

Las Celdas de Combustible Microbianas (CCMs) son una tecnología emergente, que puede ayudar a combatir dos de los problemas más críticos que enfrenta la sociedad actual: la crisis energética y disponibilidad de agua no contaminada. Las CCMs son dispositivos que utilizan microorganismos, capaces de producir energía eléctrica a partir de energía química presente en un sustrato [1].

Las CCMs son dispositivos capaces de convertir la energía química presente en un sustrato y convertirla en energía eléctrica con la ayuda de la reacción catalítica de microorganismos [2]. Está integrada por tres elementos: un ánodo, un cátodo y un electrolito. En el compartimento anódico, se colocan microorganismos que convierten la energía química presente en un sustrato (por ejemplo, aguas residuales) en electrones [3].

Estos dispositivos se distinguen de otros sistemas de generación de energía porque: i) operan eficientemente a temperatura ambiente e incluso a bajas temperaturas; ii) producen menor cantidad de CO<sub>2</sub> que cualquier tecnología actual que utilice combustibles fósiles; y iii) no necesitan aporte de energía siempre que el cátodo abiótico sea aireado pasivamente o sea un biocátodo. [4].

Además pueden contribuir a la biorremediación de agua contaminada con compuestos xenobióticos o metales pesados, debido a que los microorganismos pueden transferir electrones hacia el electrodo (ánodo) y reducir diferentes

compuestos [4]. El agua residual contiene energía en forma de materia orgánica biodegradable. Dicha energía puede ser obtenida al remover o degradar los materiales orgánicos presentes en el agua [5].

Las CCM han generado expectativas en la comunidad científica ya que es posible producir energía limpia mediante la explotación de la biomasa que existe en las aguas residuales domésticas e industriales. Al utilizar la materia orgánica como combustible, se consigue una depuración de las aguas contaminadas simultáneamente con la producción de energía [4]. Dentro de las aplicaciones donde se pudiera utilizar las CCM se pueden mencionar: i) biorremediación de U (VI) in situ, ii) reducción de Cr (VI), iii) eliminación de Cl de diversos solventes clorados, iv) reducción de perclorato y v) reducción de nitrato.

En la actualidad, las CCM son objeto de investigación ya que se trata de dispositivos novedosos. Los estudios se han enfocado en mejorar los diversos componentes de estos sistemas, para mejorar su potencial tanto para producción de energía eléctrica como para tratamiento de aguas residuales [6].

Lo anterior es relevante ya que como se ha mencionado, el desarrollo de dispositivos con funciones de degradación para la obtención de residuos de alto valor, así como la producción simultánea de energía eléctrica, es de gran importancia para lograr el avance sustentable de la sociedad.

Además, cabe señalar que dentro de las modificaciones que se le han realizado a las CCMs, se ha propuesto el utilizar materiales de bajo costo que sean amigables con el medio ambiente. Además, que tengan biocompatibilidad con el microorganismo electroactivo, ya que esto permite la transferencia de electrones del sustrato hacia el ánodo [7].

Los materiales carbonosos presentan una buena opción para las CCM, ya que los grupos funcionales con oxígeno, se encuentran en la superficie, ayudando a proveer sitios de contacto físico con la bacteria, permitiendo la formación de una biopelícula sobre el electrodo [8].

En este proyecto se evaluaron matrices carbonosas de Grafito, Vulcan XC-72 y Carbón Mesoporoso Ordenado (CMO) como catalizadores para optimizar la capacidad de *Bacillus subtilis* (*B.subtilis*) para la generación de energía así como la remediación de agua residual. Por lo mismo, como sustrato se utilizó agua residual farmacéutica (ARF). El desempeño de los catalizadores se caracterizó mediante voltamperometría cíclica (VC) y pruebas de desempeño en una CCM.

## Justificación

Las CCMs, son dispositivos capaces de convertir energía química presente en un sustrato en energía eléctrica, con ayuda de microorganismos electroactivos, capaces de realizar reacciones catalíticas utilizando el medio en el que se encuentran [2]. Se distinguen de otros sistemas de generación de energía porque operan a temperatura ambiente, son menos contaminantes a comparación de otras tecnologías actuales que utilizan combustibles fósiles; y no necesitan aporte de energía siempre que utilicen un cátodo aireado o biocátodo [4].

Una problemática de este tipo de dispositivos es que utilizan catalizadores basados en platino u otros metales nobles, lo que incrementa su costo. . Además, en algunos casos este tipo de catalizadores tienen baja biocompatibilidad con los microorganismos que se inoculan en el sustrato. Una de las alternativas para resolver la primer problemática, es la utilización de catalizadores carbonosos (como el Carbón Mesoporoso Ordenado, CMO), que ofrecen tener una buena compatibilidad con los microorganismos, para generar y transferir electrones desde el ánodo hacia el cátodo.

Otra problemática es que las CCMs utilizan principalmente medios sintéticos como sustratos y microorganismos que son electroactivos [9, 10, 11]. Sin embargo, en muchos casos se emplean condiciones anaerobias estrictas para su crecimiento y formación de biopelícula sobre los electrodos [12, 11]. En este sentido, se puede estudiar el uso de Agua Residual Farmacéutica (ARF) sin ningún tratamiento como sustrato, con la finalidad de obtener resultados reales de la energía que puede obtenerse de la misma.

Finalmente, se puede proponer un microorganismo como *B.subtilis*, poco estudiado en este tipo de aplicaciones, para crecer una biopelícula en los ánodos, con el objetivo de promover la reacción bioquímica y la transferencia electrónica. El *B.subtilis* es un microorganismo electroactivo anaerobio facultativo, lo cual ayuda a que crezca en condiciones más reales

Utilizando las ventajas de los materiales carbonosos y el microorganismo antes mencionado, se llevaron a cabo pruebas de evaluación de desempeño electrocatalítico en media celda y en una CCM.

## **Objetivos**

### **Objetivo General**

Evaluar el desempeño electroquímico de materiales carbonosos como ánodos tanto en media celda como en una Celda de Combustible Microbiana, utilizando Agua Residual Farmacéutica como electrolito.

### **Objetivos Particulares**

- Sintetizar Carbón Mesoporoso Ordenado (CMO) por la vía de termólisis.
- Desarrollar catalizadores basados en CMO, así como Vulcan XC-72 y Grafito comerciales.
- Caracterizar fisicoquímicamente los materiales carbonosos.
- Estudiar el comportamiento de *Bacillus subtilis* y su biocompatibilidad con los materiales carbonosos para el crecimiento de una biopelícula.
- Caracterizar el Agua Residual Farmacéutica (ARF) y estudiar su uso como sustrato para aplicación en CCMs.
- Evaluar el desempeño electroquímico de los catalizadores sin y con biopelícula como ánodos en media celda conteniendo ARF.
- Evaluar el efecto de funcionalizar los materiales carbonosos con metanol en su actividad catalítica.
- Estudiar la capacidad de generación de energía en una CCM utilizando ARF.
- Evaluar el desempeño de los catalizadores como ánodos en una CCM.

## **Capítulo 1. Antecedentes**

## 1.1 Fundamentos de las CCM

Una CCM es un dispositivo que convierte la energía bioquímica en energía eléctrica con la ayuda de la reacción catalítica de microorganismos [2]. Se encuentra integrado por tres elementos: un ánodo, un cátodo y un electrolito. En el compartimento anódico, se colocan microorganismos que convierten la energía química presente en un sustrato (por ejemplo, aguas residuales) en electrones [3].

La configuración de las CCM permite aprovechar dichos electrones para generar energía eléctrica. Esto es posible bajo un pH adecuado, cantidad de sustrato suficiente y la presencia de catalizadores tanto en ánodos como en cátodos. Además es necesaria la formación de una biopelícula en el ánodo por parte de los microorganismos, ya que ésta ayuda a una transferencia de electrones adecuada desde el sustrato hacia el electrodo, como parte del metabolismo de la bacteria.

Los microorganismos transfieren electrones producidos por su actividad metabólica al ánodo de la CCM. Este proceso contribuye a degradar la materia orgánica representada como sustrato o combustible [13]. Las CCM pueden operar con diferentes carbohidratos simples o con aguas residuales complejas, representando una alternativa prometedora para la producción de energía renovable [5], así como para recuperar productos de alto valor que se encuentran como desechos [14].

Las CCM se distinguen de otros sistemas de generación de energía porque: i) operan eficientemente a temperatura ambiente e incluso a bajas temperaturas; ii) producen menor cantidad de CO<sub>2</sub> que cualquier tecnología actual que utilice combustibles fósiles; y iii) no necesitan aporte de energía siempre que el cátodo abiótico sea aireado pasivamente o sea un biocátodo [4].

Una CCM convencional consiste de una cámara anódica y una cámara catódica separadas por una Membrana de Intercambio Protónico (MIP). Los microorganismos en el ánodo oxidan la materia orgánica generando protones (H<sup>+</sup>) y electrones. La Ecuación 1.1 representa la reacción típica de glucosa como sustrato:



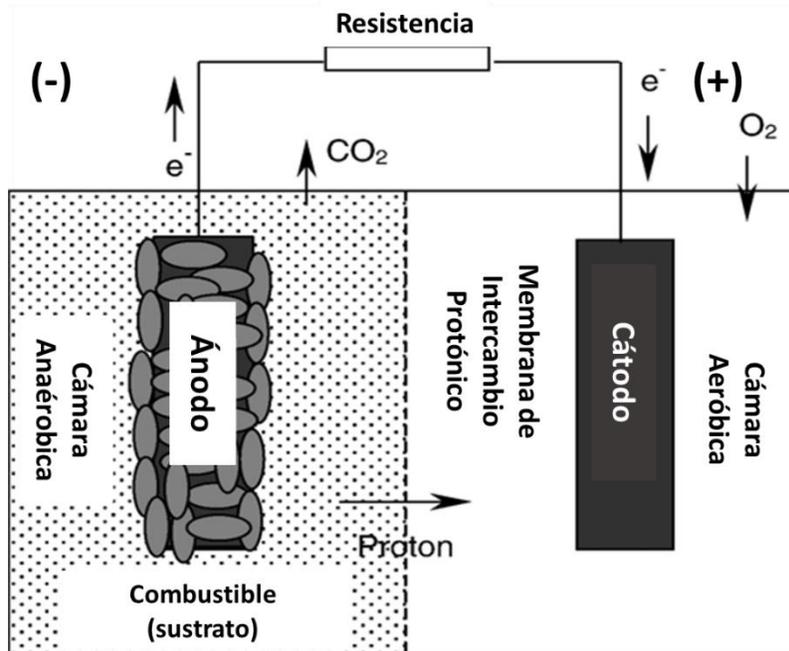
Al llevarse a cabo la reacción, el ánodo actúa como un aceptor artificial de electrones externo para los microorganismos. A su vez, los electrones son transferidos al cátodo, a través de un circuito externo donde tiene lugar la Reacción de Reducción de Oxígeno (RRO) de acuerdo a la Ecuación 1.2:



## 1.2 CCM de dos compartimentos

Los catalizadores más comúnmente utilizados como ánodos están basados en diferentes materiales como cobre, platino, grafito u otros. [15]. El separador, que es una membrana que impide el paso de electrones de la cámara anódica a la catódica pero es permeable a los protones, puede ser de varios tipos: i) Membrana de Intercambio de Cationes (MIC), ii) Membrana de Intercambio de Aniones (MIA), iii) Membrana Bipolar (MB), iv) Membrana de Microfiltración (MM) y v) Membrana de Ultrafiltración (MU), entre otras [16].

El Nafion<sup>®</sup>, un copolímero de tetrafluoroetileno sulfonado comercial, es el más utilizado en las CCM debido a su alta conductividad iónica y excelente estabilidad química y mecánica [17]. En la Figura 1.1, se muestra un esquema de la configuración de una CCM de doble cámara.



**Figura 1.1** Celda de Combustible Microbiana de doble cámara [15].

### 1.3 Ánodos para CCM

Los catalizadores del ánodo juegan un papel importante en la potencia generada por las CCM, ya que la generación de electricidad depende principalmente de su actividad catalítica y de la biopelícula formada en dicho electrodo [18]. Recientemente se han realizado desarrollos para modificar la composición de los electrodos con el objetivo de mejorar la potencia de salida de las CCM. La mayoría se han basado en el mejoramiento de la conductividad de los materiales utilizando nanocatalizadores, como materiales carbonosos (nanotubos de carbono, grafito, grafeno, entre otros) y polímeros conductores [19].

El uso de catalizadores carbonosos en los ánodos de las CCM ha llamado la atención debido a su alta actividad catalítica y conductividad eléctrica, buena estabilidad química y su bajo costo, comparado con metales nobles como el platino [20, 8].

En el ánodo, la superficie del catalizador carbonoso debe tener grupos funcionales para tener sitios de contacto con la solución del electrolito conteniendo las bacterias. Sin embargo, ello no garantiza la formación de una biopelícula adecuada para promover la transferencia de electrones entre los microorganismos y el ánodo. Una biopelícula ideal debe ser anclada firmemente a la superficie carbonosa y proveer patrones de transferencia de electrones.

Una superficie rugosa en el ánodo no solo provee sitios apropiados para el acomodo de las bacterias, sino que también crean los estímulos necesarios para que éstas produzcan sus propios nanoalambres (pili), que las ayuden a enlazarse y proveer puentes de transferencia de electrones [21, 22].

Chen *et al* (2015), reportaron que un mejor control de la morfología del ánodo de carbono se logra utilizando materiales porosos. Se puede asumir que si el carbón tiene poros distribuidos uniformemente y de tamaño apropiado puede ser de utilidad para la colonización microbiana, lo que contribuiría a mejorar el desempeño de la CCM [8].

Los materiales del electrodo son elegidos con base en sus propiedades físicas para una buena actividad catalítica, pero además se debe tomar en cuenta la interacción del microorganismo con el material, así como su crecimiento, metabolismo y fisiología [23].

Los catalizadores de platino utilizados en las CCM, no son económicos y diversos grupos de investigación estudian diferentes materiales para ser utilizados en ánodos y cátodos. Se han evaluado catalizadores comerciales como ánodos en CCM alimentadas con acetato. Uno de ellos fue un carbón activado libre de platino, que fue caracterizado en una configuración de media celda. Dicho catalizador generó una corriente estable de  $-1.2 \text{ mA/cm}^2$  en pruebas de duración de 100 días [13].

## 1.4 Microorganismos en las CCM

Los microorganismos en las CCM juegan un papel importante en la transferencia de electrones, un proceso que ocurre en la célula misma; por lo tanto, estudiar sus interacciones, identificarlos y establecer su función en este proceso, aporta al conocimiento básico y al mejoramiento del desempeño de estos sistemas. Además, se aprovechan consorcios microbianos eficaces para las funciones de generación de electricidad, remoción de materia orgánica y biorremediación. A partir de muestras ambientales sometidas a diferentes condiciones, se pueden evaluar novedosos bioánodos [4, 24].

Se ha demostrado que el uso de cultivos mixtos en el ánodo de la celda mejora la capacidad de generación de energía, ya que aportan subproductos que puedan ser utilizados por otras poblaciones microbianas. Esto permite el establecimiento de interacciones sintróficas que generan una biopelícula, la cual promueve la generación de una corriente eléctrica a partir de un sustrato [4].

La formación de dicha biopelícula sobre el electrodo mejora la producción de electrones [25], e incrementa la conductividad por la acumulación de especies químicas, incluyendo los iones [26]. Sin embargo, hay escasos estudios sobre las implicaciones que tiene la formación de esta biopelícula [27]. Se ha visto que una biopelícula integrada típicamente por *Geobacter*, tiene una relación directa con el material del electrodo y la transferencia de electrones, además de catalizar la reacción [27]. Si los electrodos no tienen una composición adecuada, la formación de la biopelícula es limitada o no se forma completamente sobre la superficie [28].

Como inóculo para las celdas se pueden emplear cultivos de una especie microbiana o cultivos mixtos (consorcios). En el primer caso, se tiene la posibilidad de modificar genéticamente la especie. Por ejemplo, en el caso de *G. sulfurreducens*, se ha investigado el mecanismo de transferencia de electrones al ánodo y su capacidad de oxidar completamente un compuesto orgánico, para así contribuir más efectivamente a la producción de energía eléctrica [29].

En los consorcios anódicos, las bacterias más comunes pertenecen a los géneros *Shewanella*, *Geobacter*, *Proteobacter* y *Pseudomonas*, destacando las especies *S. putrefaciens*, *P. aeruginosa*, *G. sulfurreducens* y *G. metallireducens*. Hay diversos estudios de especies bacterianas que realizan transferencia directa de electrones o utilizan mediadores [2, 30].

De entre las propiedades que ofrecen estos microorganismos se puede mencionar la presencia de pilis, que tienen una conductividad comparada a los metales, y ofrecen la posibilidad de la producción en masa de nanocables para promover el intercambio de electrones. Para su desarrollo, aún se sigue investigando la modificación genética de su estructura para otorgarle nuevas funcionalidades y así obtener un mayor flujo de electrones en la CCM [7].

### **1.5 Mecanismos de Transferencia de Electrones por el microorganismo**

La Transferencia de Electrones Extracelulares (TEE), es un proceso complejo en el cual los electrones son transferidos de exoelectrogenes a un electrodo [7], en la figura 1.2 se muestran los diagramas de los tres posibles mecanismos:

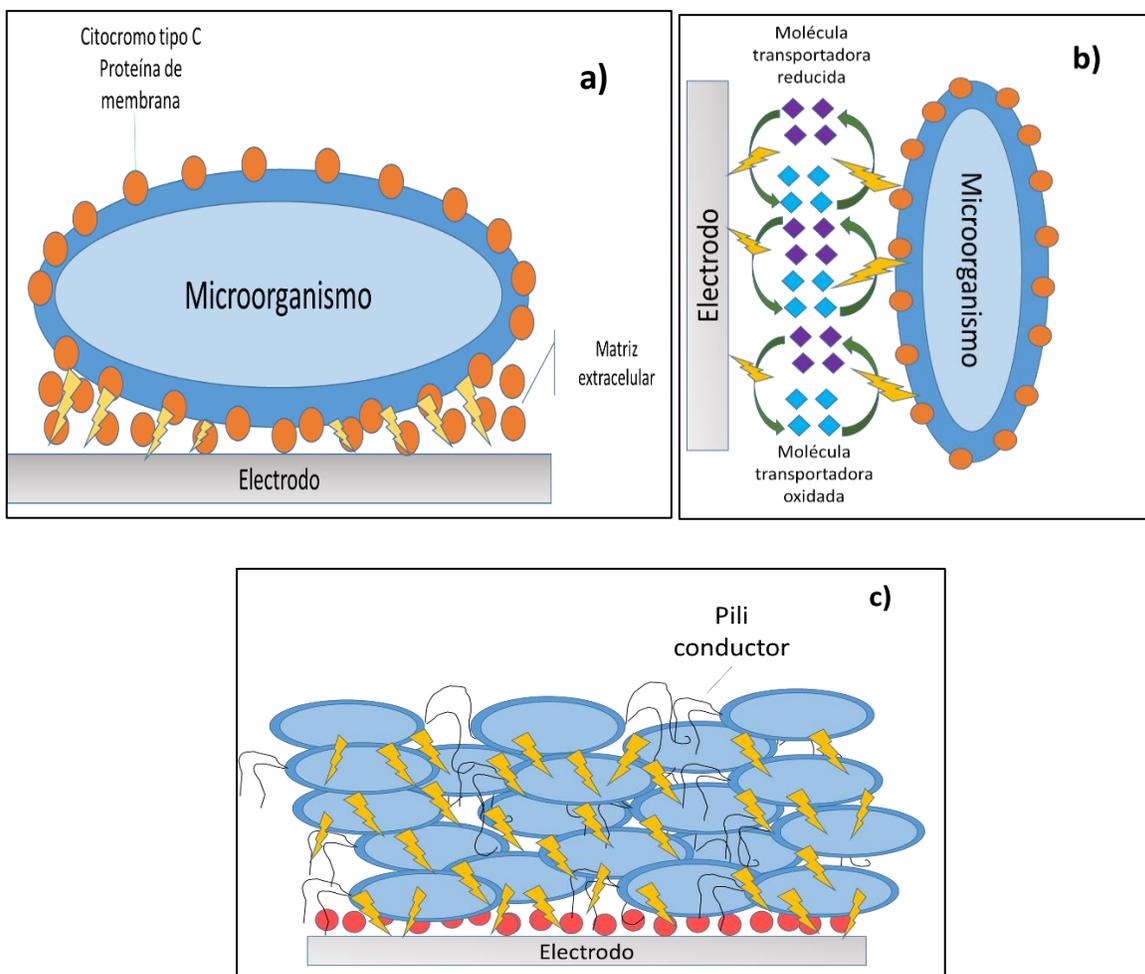
1) Moléculas solubles transportadoras de electrones. Es sugerido para una gran diversidad de microorganismos tanto gram-positivos como gram-negativos que tienen la habilidad de producir lanzadores de electrones para promover la transferencia de electrones hacia los electrodos.

Se ha demostrado recientemente que los mediadores microbianos influyen en el desempeño de una CCM, ya que generalmente interfieren en la transferencia de electrones extracelulares, un ejemplo es *Geothrix fermentans*, que puede reducir óxido de hierro (III) presente en alginato utilizando la vía de lanzadores, que además ayuda a promover la transferencia de electrones hacia los electrodos.

2) Proteínas activas-redox en la membrana celular. También llamado mecanismo directo de transferencia de electrones hacia los electrodos, la bacteria puede

producir mediadores redox, a través de metabolitos primarios. Ha sido mayormente estudiado en el caso de *G.sulfurreducens*.

3) Pili conductivos. En éste mecanismo, no se utilizan lanzadores, sino que *G.sulfurreducens*, tiene una amplia gama de citocromos tipo c, expuestos en la superficie celular. Estos citocromos se posicionan lo más cercano a la superficie del electrodo para una transferencia de electrones directa del citocromo hacia el electrodo. De este modo, mejora la función como enlace entre las células en contacto con el electrodo y la superficie del electrodo.



**Figura 1.2** Esquemas de mecanismos de transferencia de electrones extracelulares. a) moléculas solubles transportadoras de electrones, b) proteínas activas-redox en la membrana celular y c) pili conductivos.

Un bioánodo debe tener una biocompatibilidad y una gran área superficial para hospedar una gran cantidad de microorganismos [31]. En la Figura 1.2 se presentan esquemáticamente los 3 mecanismos de TEE.

## 1.6 Sustratos y Aguas Residuales

El sustrato constituye el combustible a partir del cual se genera la energía eléctrica en una CCM. En sus inicios, se utilizaban sustratos simples como glucosa y acetato, pero recientemente se han manejado sustancias menos convencionales con el fin de recurrir a la biomasa presente en aguas residuales de diversos tipos, con lo que es posible depurarlas y generar energía eléctrica [4].

Diversos sustratos se están investigando actualmente para determinar su uso potencial en las CCM. Algunos de ellos son las aguas residuales provenientes del procesamiento de frutas y vegetales, suero de queso, melazas de destilerías, aguas residuales de refinerías, aguas residuales de industrias farmacéuticas con contaminantes recalcitrantes y residuos agrícolas, entre otros [4].

La energía proveniente de las aguas residuales como fuente de energía renovable, es uno de los temas clave de reciente investigación para reducir la dependencia del hombre a fuentes no renovables como los combustibles fósiles [32]. Dentro de las aguas residuales, se ha indicado que aquellas provenientes de la industria metalúrgica pueden ser utilizadas como sustratos en el ánodo de una CCM, ya sea eliminando el sustrato orgánico o realizando un ajuste de pH [33]. Estos sustratos ricos en tetrionato han sido degradados en sulfatos y protones. Además el tetrionato puede ser utilizado como fuente de energía y electrones por bacterias como *Acidithiobacillus spp.* y *Ferroplasma spp.*, que son capaces de generar electricidad en la CCM [33].

Las aguas residuales provenientes de la industria láctea, son ricas en carbohidratos y también se pueden emplear en CCMs. Pueden tener un gran potencial para la producción de energía renovable mediante un proceso que lleva a su degradación.

Sin embargo, aún requieren de mucha investigación para desarrollar tecnologías que sean costo-efectivas para mejorar la producción de energía eléctrica a partir de estos sustratos [34].

Por otro lado, uno de los sustratos con mayor potencial, son las aguas residuales de la industria de los jugos de frutos, que se caracteriza por su alta biodegradabilidad, ya que su contaminante principal es el azúcar (glucosa y fructosa). Por esta razón, este tipo de efluentes es una buena fuente orgánica para la producción de electricidad [35].

Como se ha mostrado, las CCMs pueden ser utilizadas para generar energía, pero al utilizar los diferentes sustratos mencionados, también tienen como función el llevar a cabo tratamientos de aguas residuales. Ello representa una ventaja tecnológica ya que los tratamientos convencionales solo han sido diseñados para remover sólidos suspendidos, así como materia orgánica, nutrientes y patógenos [36].

Una característica muy importante de las CCMs es la potencia de salida i.e. la cantidad de energía eléctrica producida, la cual depende de la tasa de degradación del sustrato, la tasa de transferencia de electrones de la bacteria al ánodo, la resistencia del circuito, la transferencia de masa protónica en el líquido, el desempeño del electrodo y las condiciones de operación externas [37]

Recientemente los compuestos orgánicos en aguas residuales, se han convertido en un punto focal por sus implicaciones significativas en el ecosistema y el alto impacto en la salud pública [36]. Una CCM provee un ambiente para ambas reacciones de oxidación y reducción en un sistema, que puede proveer un nuevo acercamiento a la remoción de compuestos orgánicos heterogéneos. El mecanismo microbiano-electro-físico-químico integrado puede mejorar la remoción de compuestos orgánicos [38].

## **Capítulo 2. Metodología**

## 2.1 Reactivos y materiales utilizados

Durante el desarrollo experimental se utilizaron los reactivos presentados en la Tabla 2.1:

**Tabla 2.1** Reactivos y materiales utilizados.

Nombre	Proveedor	Pureza/Presentación
Carbonato de Sodio	Sigma-Aldrich	99.50% pureza
Formaldehido		37% (e.p.) en agua
Resorcinol		99% pureza
Pluronic F127		N/A
Etanol		Anhidro
Ácido Clorhídrico		37% pureza
Hidróxido de Potasio		97% pureza
Nafion®		5% (e.p.) en solución alcohólica
Metanol		Anhidro
Pirrol		98% pureza
Anilina		99.5% pureza
Ácido Sulfúrico	95-98% pureza	
Vulcan XC-72	Cabot Corp	N/A
Isopropanol	J.T. Baker	99.96% pureza
Tela de Carbón	BASF Fuel Cell Inc.	N/A
Platino/Carbón	E-TEK	20% metal:80%soporte
Membrana de Nafión	ION Power Inc.	N/A
Caldo Nutritivo	BD Bioxon	N/A
Agar Bacteriológico		N/A

## 2.2 Muestreo, conservación y caracterización de Agua Residual Farmacéutica (ARF)

El ARF fue proporcionada por la empresa DSM Sinochem Pharmaceuticals, ubicada en la ciudad de Ramos Arizpe, Coah.

El tipo de muestreo que se empleó en esta investigación es por muestra compuesta [39]. En el cual un litro de agua se colectó en frascos de plástico en diferentes tiempos por 24 h, hasta completar cinco litros, las cuales posteriormente se

mezclaron homogéneamente. Las porciones fueron mezcladas para obtener la muestra compuesta. La colecta se hizo de forma manual, de manera directa al efluente del agua residual farmacéutica. Posteriormente, la muestra de ARF se almacenó y transportó en una hielera que contenía hielo, para mantenerla libre de cambios químicos o físicos que pudieran alterar su composición.

Las porciones de agua colectadas se caracterizaron con dos aparatos para medir la temperatura, pH, conductancia específica y potencial de oxidación y reducción, utilizando un pH metro marca Thermo Scientific modelo Orion Star A211 y un conductímetro marca Thermo Scientific modelo Orion Star A212.

Después de realizar la caracterización fisicoquímica de la muestra compuesta de agua, ésta se empleó en la media celda y en la cámara anódica de la CCM. El resto de la muestra se ha mantuvo a una temperatura de 2 °C para evitar crecimiento microbiano y mantener la muestra en un estado óptimo, para su posterior utilización [39].

### **2.3 Inóculo**

Se empleó la cepa *B.subtilis*, proporcionada por la Colección Nacional de Cepas Microbianas y Cultivos Celulares, del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (Cinvestav, Zacatenco). *B.subtilis* se caracteriza por tener la habilidad de formar endosporas resistentes, que le permiten tolerar condiciones ambientales extremas. Además puede producir una amplia variedad de proteasas y otras enzimas, que le permiten degradar muchos sustratos naturales, que al convertirlos, generan electrones que pueden ser aprovechados para generar energía en una CCM.

Se prepararon dos matraces con medio de caldo nutritivo previamente esterilizado, los cuales fueron colocados en una incubadora de movimiento orbital (marca Vichi Modelo INO) por tres días para el crecimiento de *B.subtilis* en medio líquido para la obtención del inóculo.

Al mismo tiempo se prepararon tubos de ensaye de 10 mL y cajas Petri de 15 mL con medio de cultivo de agar nutritivo, para tener crecimiento en medio sólido, que se dejaron incubando por tres días en incubadora marca Vichi de movimiento orbital modelo INO [40]. Al terminar el tiempo de incubación se dejaron en refrigeración para mantener viable la cepa para futuros ensayos experimentales.

## **2.4 Desarrollo de catalizadores para ánodos**

### **2.4.1 Síntesis y funcionalización de Carbón Mesoporoso Ordenado (CMO)**

El CMO se sintetizó por un procedimiento reportado por Morales-Acosta *et al* [41], de auto-ensamble empleando la técnica de pirólisis. Se realizó una solución que contenía 0.0445 g de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (catalizador básico), 8.81 g de resorcinol y 24.88 mL de formaldehído, (los últimos se utilizan como fuente de carbón), y se dejó en agitación por una hora. Posteriormente, en una solución aparte se agregaron 6.2 g de copolímero Pluronic F127 y 25 mL de etanol, la cual se agitó manualmente, y finalmente se le agregaron 16 mL de agua desionizada para obtener una solución transparente. Esta mezcla se utilizó como templete para promover la formación de la estructura hexagonal del CMO.

Al terminar la hora de agitación de la mezcla de formaldehído y resorcinol, se le agregó la solución de Pluronic 127 y se dejó en agitación por una hora, hasta obtener una solución color miel. Finalmente se agregó 8 mL de ácido clorhídrico 2 M (catalizador ácido), para la formación de las micelas y se dejó 1 h en agitación. Se dejó en reposo por 24 h.

La carbonización de la resina elaborada a partir de los precursores se llevó a cabo a 900 °C por 3 h, en una mufla cilíndrica Thermo Scientific, modelo Thermolyne [41], donde el producto obtenido fue un sólido de coloración negra. Enseguida, el CMO fue molido en un molino planetario de acero inoxidable.

### **2.4.2 Vulcan XC-72 y grafito**

Tanto Vulcan XC-72 como hojuelas de grafito, ambos comerciales, fueron evaluados como ánodos para su uso en CCMs.

### **2.4.3 Funcionalización de materiales carbonosos**

CMO, Vulcan y grafito fueron funcionalizados con metanol, para formar grupos en su superficie que promuevan la adsorción de especies que participen en el intercambio de electrones. La modificación superficial se llevó a cabo empleando metanol como agente químico. Se prepararon 3 muestras de 30 mL de solución 0.15 mol L<sup>-1</sup> de CH<sub>3</sub>OH. A las mismas se agregaron por separado 300 mg de CMO, Vulcan o grafito, para ser agitadas en baño ultrasónico por 30 min. Enseguida, las soluciones se agitaron magnéticamente por 1 h.

Posteriormente, fueron tratadas térmicamente por 8 min en un horno de microondas doméstico modificado en el laboratorio, manteniendo agitación. Se aplicaron pulsos de calentamiento de 25 s on y 15 s off. Al terminar, los polvos se filtraron, lavaron y secaron por 24 h. Posteriormente, las muestras secas se calcinaron a 200 °C por 30 min en una mufla Carbolite modelo RHF 1600. Finalmente fueron almacenados en viales de vidrio, para su uso durante la experimentación.

## **2.5 Caracterización fisicoquímica de los catalizadores**

### **2.5.1 Difracción de Rayos X.**

La técnica de DRX fue empleada para evaluar la estructura cristalina de los catalizadores. Se obtuvieron patrones de difracción entre 10 y 100° (2θ), en un difractómetro Philips Xpert MPD PW3040 (PANalytical), utilizando una lámpara de CuKα con una radiación de  $\lambda=1.5418$ .

### **2.5.2 Microscopía Electrónica de Barrido (MEB) y Espectroscopía de Energía Dispersiva de Rayos X (EDS)**

Los análisis de morfología y composición química se llevaron a cabo con las técnicas MEB y de EDS, respectivamente. Se utilizó un microscopio Phillips XL30, que cuenta con un espectrómetro. Las muestras fueron colocadas en un portamuestras de aluminio y sujetas con cinta de cobre.

En el caso de las muestras con material biológico, fueron recubiertas previamente con Oro-Paladio, utilizando la técnica de sputtering sobre las mismas, para la obtención de una mejor imagen de la formación de la biopelícula sobre el electrodo.

### **2.5.3 Espectroscopía de Infrarrojo con transformada de Fourier (FTIR)**

En este trabajo de tesis se utilizó un espectrómetro Nicolet, modelo Spectra 550, equipado con un aditamento de Reflexión Total Atenuada (ATR).

### **2.5.4 Espectroscopía Raman**

Los espectros Raman fueron adquiridos a temperatura ambiente en un dispositivo MicroRaman marca Horiba, modelo Xplora. Se utilizó un láser de radiación de 532 nm, con un filtro de 10 %. Los tiempos de exposición fueron menores a 10 s para evitar la oxidación de la muestra.

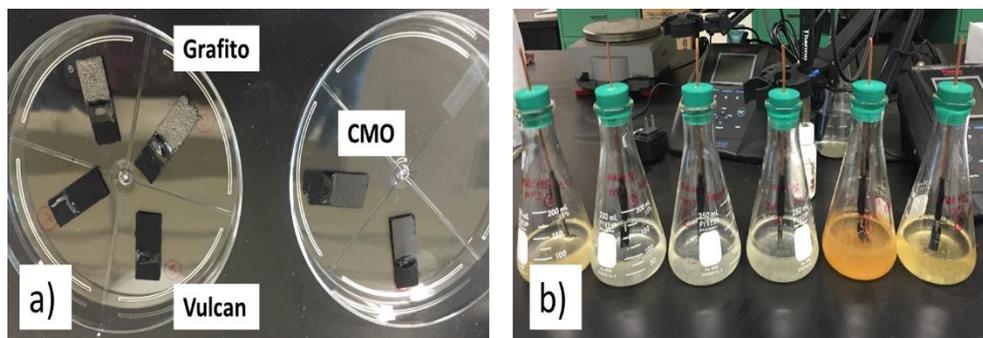
### **2.5.5 Análisis de área superficial por el método de BET**

Para determinar el área superficial de los materiales carbonosos, se utilizó analizador Autosorb 1, marca Quantachrome Instruments. Las muestras fueron desgasificadas por 12 h a 250 °C. Los análisis se realizaron a 77.35 K, usando como adsorbato N<sub>2</sub>.

## 2.6 Fabricación de los electrodos

Se fabricaron electrodos teniendo como matriz soporte tela de carbón, con área geométrica de  $1 \text{ cm}^2$ . La tela de carbón comercial está integrada de una malla, así como una capa de difusión con estructura de Teflón. A este tipo de tela es necesario añadirle una capa catalítica, es decir, el catalizador que se va a evaluar. Las muestras fueron recubiertas en uno de sus lados con resina epóxica comercial, con la finalidad de controlar el área de contacto del electrodo con el electrolito (ARF o KOH con  $\text{pH} = 9.6$ ).

Una vez que la resina se secó las muestras se pesaron en una balanza analítica, con la finalidad de obtener el peso en seco del electrodo. La capa catalítica fue añadida a los electrodos al tratar por ultrasonido durante 30 min una solución de tinta catalítica con 5 mg del catalizador carbonoso correspondiente (Sección 2.4), así como  $64 \mu\text{L}$  tanto de Nafión<sup>®</sup> como de isopropanol. Enseguida, se depositó una carga de catalizador de  $5 \text{ mg cm}^{-2}$  empleando la técnica de pintado con pincel. Enseguida, los electrodos fueron pesados nuevamente, para verificar que efectivamente se tuviera la cantidad de catalizador adecuada en la tela de carbón. En la figura 2.1 se muestran los electrodos pintados con la tinta catalítica y el ensamble de los portaelectrodos.



**Figura 2.1** a) Electrodos pintados con tinta catalítica hecha a partir de los materiales carbonosos; b) montaje de los porta electrodos hechos con alambre de cobre colocados en matraces de 250 mL conteniendo el inóculo de la bacteria para crecimiento de *B.subtilis*.

## 2.7 Formación de biopelículas en los electrodos de carbono

En seis matraces de 250 mL, se preparó caldo nutritivo estéril, para ser inoculado con la bacteria *B.subtilis*, y se dejó en la incubadora por un tiempo de 6 días a una temperatura de 28°C. Cada uno de los electrodos fue colocado en cada uno de los matraces, en un ambiente anaerobio, para permitir el crecimiento exclusivo de la bacteria sobre los electrodos.

## 2.8 Evaluación de actividad catalítica de los catalizadores en media celda

La caracterización se llevó a cabo en media celda electroquímica de tres electrodos: electrodo de trabajo, formado por los electrodos conteniendo cada uno de los catalizadores carbonosos a evaluar; electrodo de referencia tipo Ag/AgCl (solución: NaCl saturado); y contraelectrodo de Pt. A la celda se añadieron 80 mL de electrolito (ARF o KOH de pH = 9.6). La actividad catalítica de los catalizadores se evaluó mediante la técnica de voltamperometría cíclica, empleando un potenciostato Voltalab PGZ 301. Los VCs fueron adquiridos en un intervalo de potencial entre 50 y 1200 mV con respecto al Electrodo Reversible de Hidrógeno (RHE, Reversible Hydrogen Electrode). La velocidad de barrido ( $v$ ) fue de 20 mV s<sup>-1</sup>. Para obtener los potenciales con respecto al electrodo Ag/AgCl, se empleó la ecuación de Nernst:

$$E_{RHE} = E^0 + 0.059(pH) + E_{Ag/AgCl} \quad (2.1)$$

Donde:

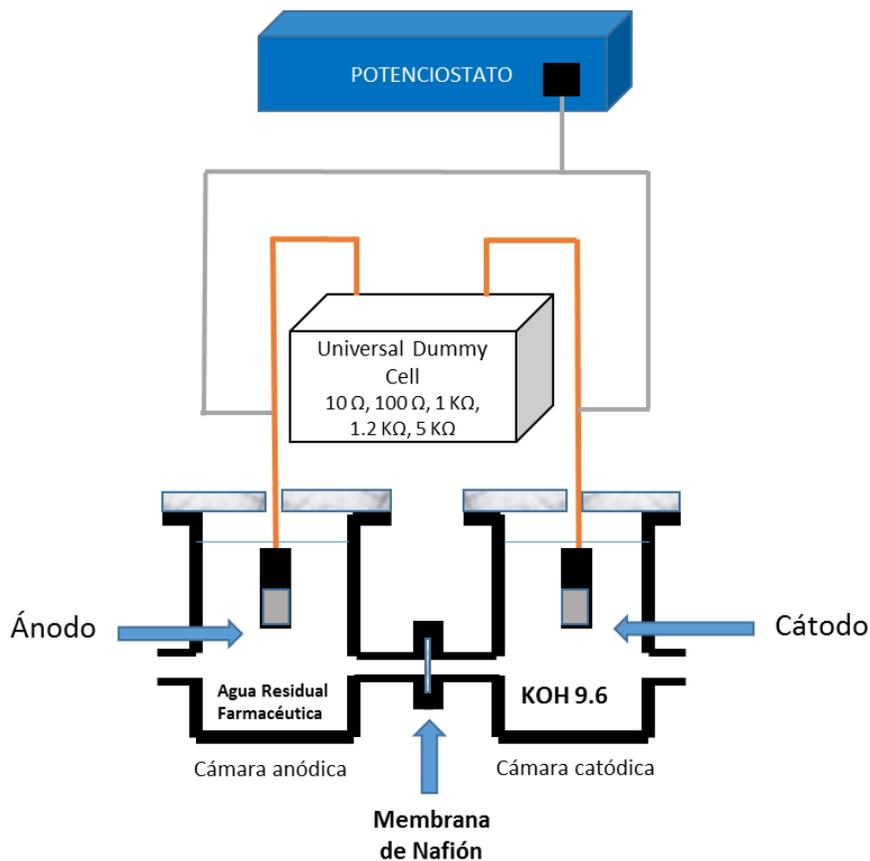
$E_{RHE}$ = Potencial de Electrodo Reversible de Hidrógeno

$E^0$ = Potencial estándar del electrodo

$E_{Ag/AgCl}$ =Potencial del electrodo de Ag/AgCl

## 2.9 Caracterización en Celda de Combustible Microbiana

Los electrodos conteniendo los catalizadores Vulcan, CMO y CMO funcionalizado, en los cuales se creció la biopelícula, fueron evaluados como ánodos en la CCM. Como comparación, se evaluó un electrodo conteniendo el catalizador comercial Pt/C (donde C = soporte Vulcan XC-72), con relación metal:soporte de 20:80 (%e.p.). En la figura 2.2 se muestra el esquema de la CCM que fue utilizada para la evaluación de los materiales carbonosos.



**Figura 2.2** Esquema de la CCM utilizada para la evaluación de los catalizadores.

### 2.9.1 Activación de la membrana de Nafión®

Previo a las mediciones en la celda completa, se recortaron piezas de 25 cm<sup>2</sup> de membrana de Nafión, las cuales se colocaron en peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) 10 % v/v durante 1 h a 60 °C. Posteriormente, se lavaron con agua hirviendo por 30 s. Enseguida se colocaron en una solución de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.5 M a 85 °C por 1 h, para

posteriormente ser lavadas con agua hirviendo por 5 min. Las membranas ya activadas se guardaron en un recipiente conteniendo agua desionizada para su posterior uso.

### **2.9.2 Montaje de la CCM**

La CCM utilizada tiene un diseño de celda de dos compartimentos, formado por una cámara anódica y una cámara catódica, separados por una membrana de Nafion® 117. El diseño de se muestra en la figura 2.2.

En la cámara anódica se agregaron 200 mL de ARF, a la cual se burbujeó nitrógeno para mantener las condiciones anaerobias durante las pruebas. En esta a cámara se colocaron los electrodos de Vulcan XC-72, CMO y CMO funcionalizado, preparados según lo descrito en la sección 2.6. Como comparación, se evaluó el electrodo de Pt/C.

En la cámara catódica se añadieron 200 mL de KOH con pH = 9.6, donde se burbujeó oxígeno para llevar a cabo la RRO. En esta cámara se utilizó como cátodo un electrodo preparado con Pt/C comercial, similar al descrito en el párrafo anterior, sin biopelícula.

### **2.9.3 Evaluación individual de ánodos y cátodo en la CCM**

Para evaluar el comportamiento individual de ánodos y cátodo en la CCM, se llevó a cabo una evaluación en un el montaje de tres electrodos. En la cámara anódica, se colocó el electrodo de referencia del tipo Ag/AgCl, mientras que los electrodos de trabajo fueron los ánodos de materiales carbonosos (evaluados por separado). El contraelectrodo fue el cátodo de Pt/C colocado en la cámara catódica.

Por su parte, para la evaluación del cátodo éste fue el electrodo de trabajo y el electrodo de referencia se colocó en la cámara catódica. En este caso, el contraelectrodo fue el ánodo. Las condiciones de atmósfera fueron las siguientes:

se burbujeó con  $N_2$  la cámara anódica y con  $O_2$  la catódica. Se realizaron barridos lineales de potencial (BLP) en una ventana de 1.2 a 0.05 V vs. RHE a  $v = 5 \text{ mV s}^{-1}$ .

#### 2.9.4 Curvas de polarización de la CCM

El desempeño de la CCM, con un montaje de dos electrodos, es decir, ánodo y cátodo, se evaluó al obtener las curvas de polarización con la ayuda de un potencióstato. Primero, se determinó el voltaje de circuito abierto de la celda ( $E_{\text{celda}}$ ). Después, se aplicaron diversas resistencias externas ( $R_{\text{ext}}$ ) contenidas en una Dummy cell del mismo potencióstato (0.01, 0.1, 1, 1.2, 5 y 100  $K\Omega$ ), para medir el voltaje de celda correspondiente. Conociendo  $R_{\text{ext}}$  y  $E_{\text{celda}}$ , se calcularon los valores de corriente generados por la CCM ( $I_{\text{celda}}$ ), mediante la Ley de Ohm según la ecuación (2.2).

$$I_{\text{celda}} = \frac{E_{\text{celda}}}{R_{\text{celda}}} \quad (2.2)$$

$$P_{\text{celda}} = \frac{E_{\text{celda}}^2}{A_{\text{an}} R_{\text{ext}}} \quad (2.3)$$

Al normalizar la corriente con respecto al área geométrica del ánodo ( $A_{\text{an}}$ ), se obtuvieron las curvas de polarización voltaje vs. densidad de corriente, o  $E_{\text{celda}}$  vs.  $j_{\text{celda}}$ . Las curvas de densidad de potencia ( $P_{\text{celda}}$ ) vs.  $j_{\text{celda}}$  fueron construidas al obtener los valores de potencia de acuerdo a la ecuación (2.3), normalizada con respecto a  $A_{\text{an}}$ .

### **Capítulo 3. Caracterización de Agua Residual y Evaluación Fisicoquímica de los Materiales Carbonosos**

### 3.1 Caracterización del agua residual

En total se obtuvieron seis muestras de un litro cada una que se mantuvieron en congelación hasta su uso. En la Tabla 3.1, se presentan los valores de pH, conductancia específica, potencial de Oxidación y Reducción y temperatura del agua. Estos valores representan el promedio de mediciones al azar hechas por triplicado de las muestras.

**Tabla 3.1** Parámetros fisicoquímicos del agua residual.

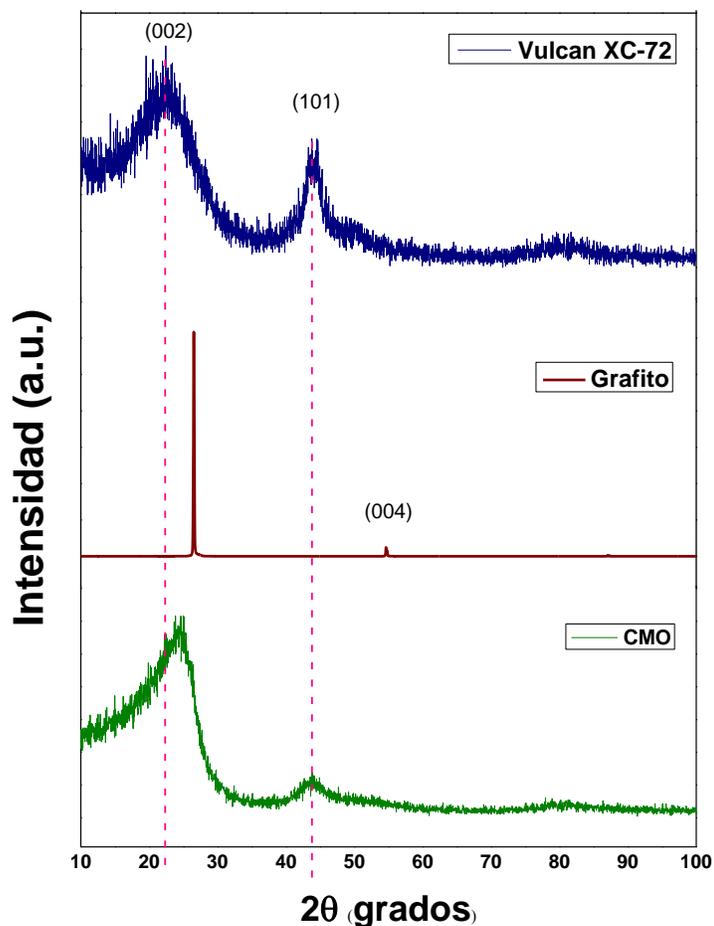
Parámetro	Resultado
pH	9.6
Conductancia específica	23.56 mS/cm
Potencial de oxidación y reducción	-154.7 mV
Temperatura	17 °C

### 3.2 Caracterización fisicoquímica de los Materiales Carbonosos

#### 3.2.1 Difracción de Rayos X (DRX)

En la figura 3.1 se presentan los patrones de DRX correspondientes a los electrocatalizadores Vulcan, Grafito y CMO no funcionalizados (JCPDS 41-1487), en los que se observan dos reflexiones típicas de materiales carbonosos: a  $22.39^\circ$  y  $44.07^\circ$  ( $2\theta$ ) en el caso del Vulcan, atribuidas a los planos (002) y (101); en el Grafito se presentan picos a  $26.35^\circ$  y  $54.82^\circ$  ( $2\theta$ ), debidos a los planos (002) y (004); por su parte el CMO tiene las reflexiones a  $24.21^\circ$  y  $43.81^\circ$  ( $2\theta$ ) por la presencia de los planos (002) y (101). Tanto Vulcan como CMO tienen patrones de difracción que indican un grado de amorficidad [42, 43, 44]. En contraste, el grafito es altamente cristalino [45, 46, 47]. Cabe resaltar que tanto Grafito como CMO

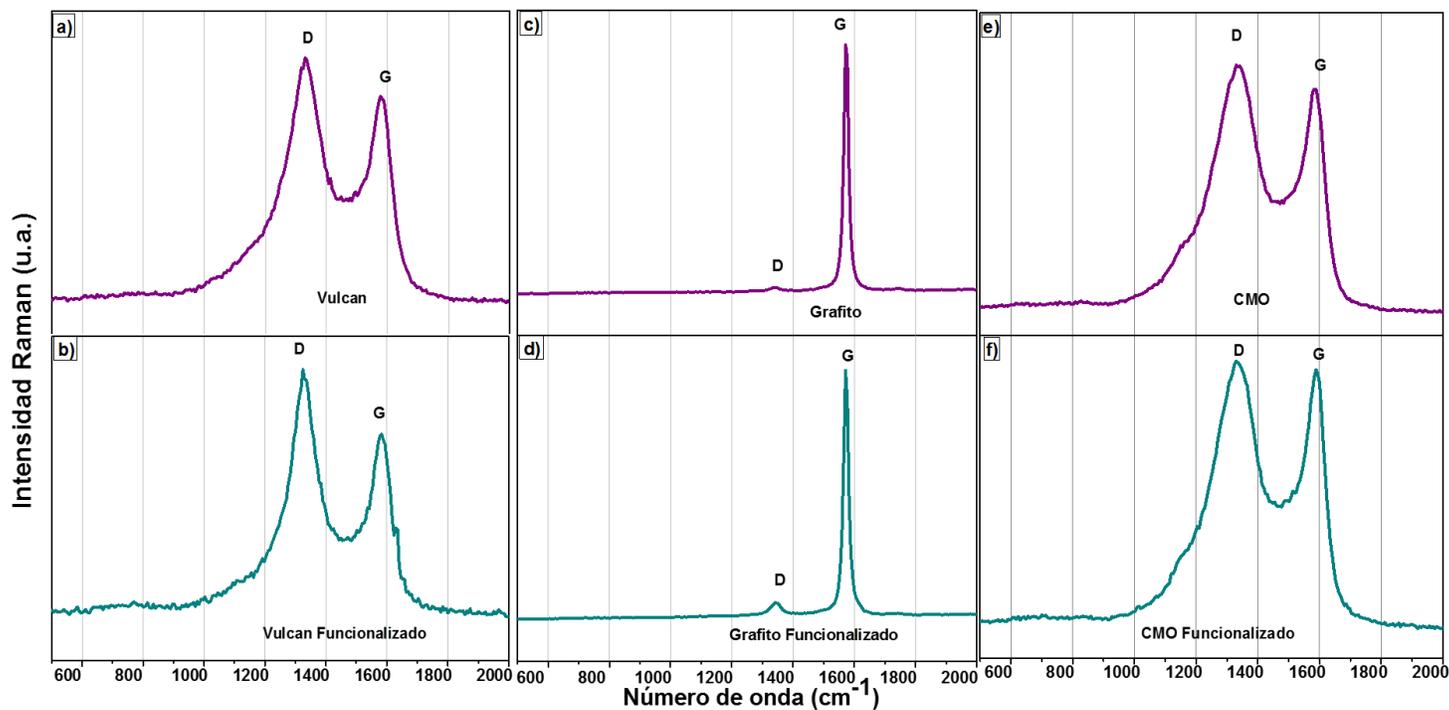
tienen un pico (002) más angosto y relativamente más intenso que Vulcan, lo que sugiere mayor grafitización de esas estructuras [48].



.Figura 3.1 Patrones de difracción de Vulcan XC-72, Grafito y CMO.

### 3.2.2 Espectroscopia Raman

En la figura 3.2 se muestran los espectros Raman obtenidos de los catalizadores sin funcionalizar y después de la funcionalización. Se observan las bandas D (asociada al grado de desorden) y G (atribuida al grado de grafitización u orden) típicas de materiales basados en carbón, las cuales la banda D se encuentran en los rangos de 1320 a 1345  $\text{cm}^{-1}$ , y la banda G en los rangos de 1577 a 1581  $\text{cm}^{-1}$  [49].



**Figura 3.2** Espectros Raman de materiales carbonosos: a y b) Vulcan XC-72 y Vulcan XC-72 Funcionalizado; c y d) Grafito y Grafito funcionalizado; e y d) CMO CMO funcionalizado.

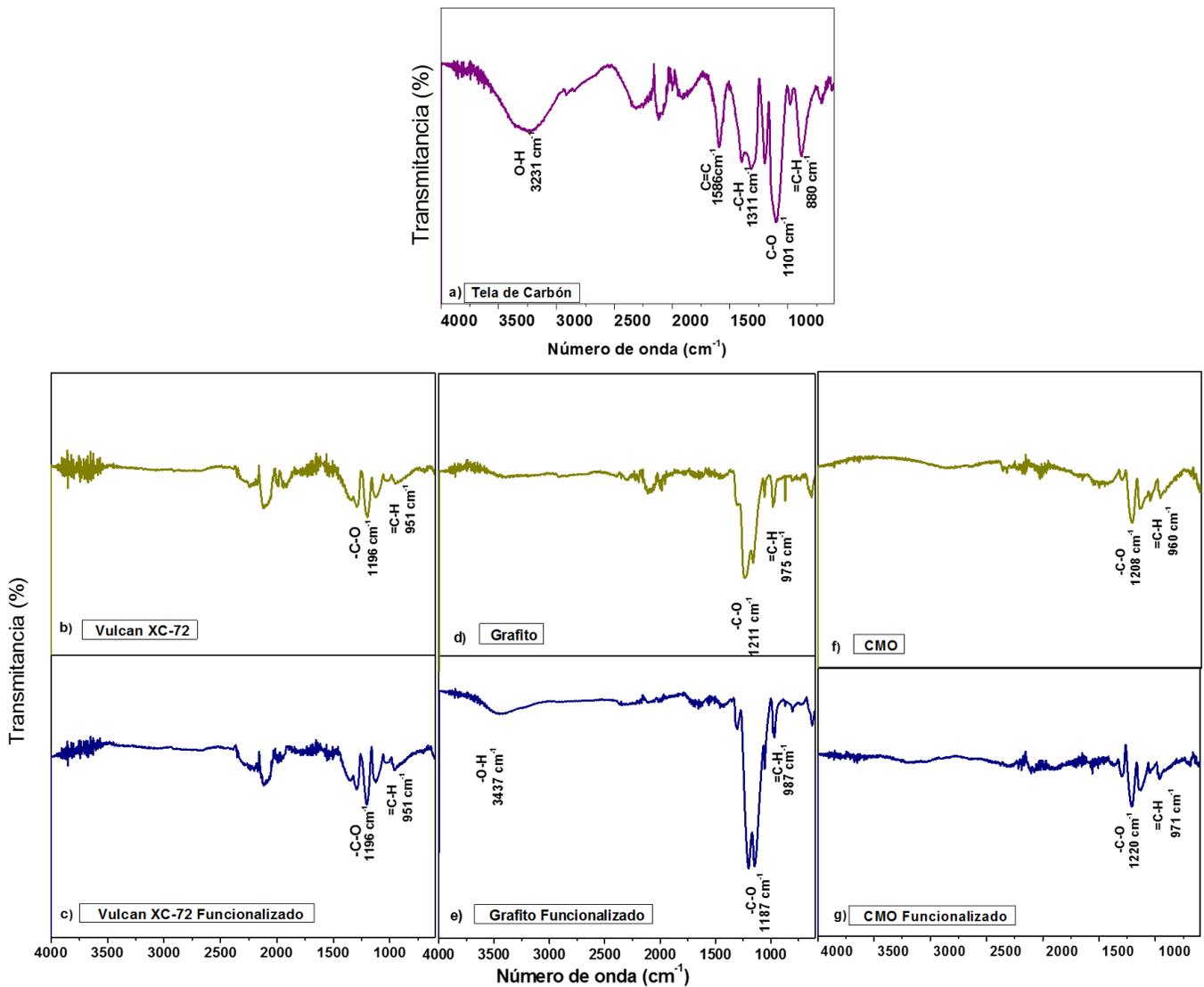
Las figuras a) y b) corresponden al Vulcan, que presenta dos bandas anchas características de este material debido a su amorficidad. La intensidad de la banda D es mayor en relación a la banda G, lo que indica un desorden alto [49]. La relación de intensidades  $I_D/I_G$  es de 1.20 para Vulcan no funcionalizado y 1.34 para Vulcan funcionalizado, lo que indica que después de la funcionalización el Vulcan presenta un mayor grado de desorden que el material sin funcionalizar. Las figuras c) y d) muestran los espectros del Grafito sin funcionalizar y funcionalizado, respectivamente. En ambos casos las bandas G son significativamente más intensas que las D, indicando que se trata de un material ordenado [50]. La razón  $I_D/I_G$  es de 0.033 y 0.067 para Grafito no funcionalizado y funcionalizado, respectivamente. Este resultado sugiere al ser modificado, el Grafito presenta un

mayor desorden, aunque el valor es muy bajo comparado con Vulcan. Mientras tanto, las figuras e) y f) corresponden a CMO sin funcionalizar y funcionalizado, respectivamente. Los espectros muestran similitud con los de Vulcan, aunque las relaciones  $I_D/I_G$  son 1.105 y 1.034, es decir, se trata de materiales más ordenados que el Vulcan [51]. Este resultado se correlaciona con el de DRX, ya que se confirma un mayor grado de grafitización de CMO comparado con Vulcan.

### 3.2.3 Espectroscopia de Infrarrojo con transformada de Fourier (FTIR)

En la Figura 3.3 a) se observa el espectro de IR de la tela de carbón, donde se observa una señal en  $3231\text{ cm}^{-1}$  debida a los grupos funcionales  $\text{-O-H}$ , y otra en  $1586\text{ cm}^{-1}$  atribuida a los anillos aromáticos  $\text{C=C}$  del Teflón que contiene la capa de difusión de la tela. Además aparecen señales en  $1311$ ,  $1101$  y  $880\text{ cm}^{-1}$ , que corresponden a grupos  $\text{-C-H}$ ,  $\text{-C-O}$  y  $\text{=C-H}$ , respectivamente.

En las Figuras 3.3 b) y c) se presentan los espectros de Vulcan XC-72 y Vulcan XC-72 funcionalizado, respectivamente. En ambos aparecen señales que sugieren la presencia de los grupos funcionales  $\text{-C-O}$  ( $1196\text{ cm}^{-1}$ ) y  $\text{=C-H}$  ( $951\text{ cm}^{-1}$ ) [52, 53]. En los espectros no se aprecian cambios significativos al funcionalizar el Vulcan con etanol. Los espectros de Grafito y Grafito funcionalizado se presentan en las Figuras 3.3 d) y e), respectivamente. En el caso del Grafito se presentan las bandas de los grupos funcionales  $\text{-C-O}$  en  $1211\text{ cm}^{-1}$  y  $\text{=C-H}$  en  $975\text{ cm}^{-1}$ , mientras que en el Grafito funcionalizado aparecen en  $1187\text{ cm}^{-1}$  y  $987\text{ cm}^{-1}$ . El Grafito funcionalizado presenta una señal a  $3437\text{ cm}^{-1}$ , característica del grupo funcional  $\text{-O-H}$ , lo que puede deberse a la funcionalización de este material con metanol.



**Figura 3.3** Espectros de FT-IR de los electrodos: a) tela de carbón sin catalizador; b) Vulcan; c) Vulcan funcionalizado; d) Grafito; e) Grafito funcionalizado; f) CMO; g) CMO funcionalizado

En las Figuras 3.3 f) se muestra el espectro de CMO, con bandas en  $1208\text{ cm}^{-1}$  y  $960\text{ cm}^{-1}$  propias de los grupos funcionales  $-\text{C-O}$  y  $=\text{C-H}$ , respectivamente. Por su parte, el CMO funcionalizado en la Figura g) tiene señales en  $1220\text{ cm}^{-1}$  y  $971\text{ cm}^{-1}$  debidas a los grupos funcionales  $-\text{C-O}$  y  $=\text{C-H}$  [41, 54].

En los electrodos conteniendo Vulcan y CMO funcionalizados no se detecta la presencia de grupos O-H, como ocurre en el caso de Grafito funcionalizado. Esto se atribuye a que los estudios de FTIR se realizaron a electrodos de tela de carbón con capa catalítica, lo que pudo ocasionar una interferencia en la identificación de las bandas.

### 3.2.4 Caracterización por Espectroscopia de Energía Dispersiva de Rayos X (EDX)

Los resultados del análisis de composición química de los catalizadores se muestran en la Tabla 3.2. En general, los materiales están compuestos de cerca de 90 % e.p. de carbono, con el resto de oxígeno.

**Tabla 3.2** Composición química de los catalizadores carbonosos.

Elemento	Material carbonoso					
	Vulcan XC-72	Vulcan Funcionalizado	XC-72 Grafito	Grafito Funcionalizado	CMO	CMO Funcionalizado
C (% e.p.)	89.86	88.23	90.75	87.42	89.64	88.26
O (% e.p.)	10.14	11.77	9.25	12.58	10.36	11.74

### 3.2.5 Análisis de área específica por el método de BET

En la Tabla 3.3 se muestran los resultados del análisis de textura por el método de BET de Vulcan y CMO. Los resultados indican un ligero efecto de la funcionalización en el área superficial de Vulcan (228.8 y 213.6 m<sup>2</sup>/g antes y después de funcionalización), valores acordes con la literatura [55]. Lo mismo ocurre para CMO (416.3 y 407.2 m<sup>2</sup>/g antes y después de funcionalización), valores que se aproximan a los reportados para materiales similares [51, 41].

El diámetro promedio de poro de Vulcan y CMO es el esperado para materiales mesoporosos. En el caso de CMO es de 2.040 y 2.215 nm antes y después de funcionalización, valores inferiores a los reportados previamente [51, 41]. Este resultado confirma la formación de una estructura mesoporosa siguiendo el procedimiento de síntesis de CMO.

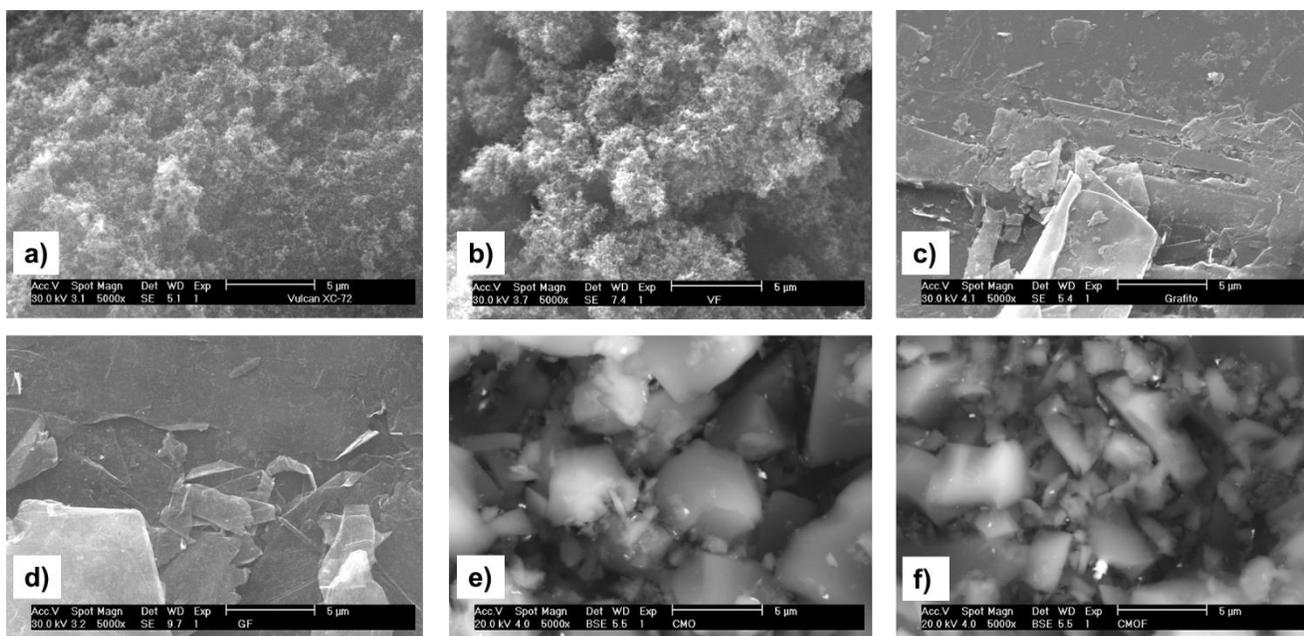
**Tabla 3.3** Área superficial específica y diámetro promedio de poro de catalizadores de Vulcan y CMO.

Material Carbonoso	Superficie de área BET (m <sup>2</sup> /g)	Diámetro de poro promedio (nm)
Vulcan	228.8	23.46
Vulcan Funcionalizado	213.6	18.26
CMO	416.3	2.040
CMO Funcionalizado	407.2	2.215

### 3.2.6 Análisis por Microscopía Electrónica de Barrido (MEB) de polvos de los catalizadores.

En la Figura 3.4 se muestran las imágenes de MEB de los polvos de catalizadores, tanto no funcionalizados como funcionalizados con metanol. El Vulcan no funcionalizado y funcionalizado (Figuras a y b) presenta una morfología formada por partículas semi-esféricas, en concordancia con la referencia [49]. Por su parte, el Grafito y el Grafito funcionalizado (Figuras c y d) muestran la presencia de capas laminares, una morfología, típica en este tipo de materiales [56]. Mientras tanto, la morfología tanto de CMO como de CMO funcionalizado (Figuras e y f) muestra la presencia de partículas con forma irregular, donde destacan aquellas de forma cúbica. En conclusión, debido a que la modificación superficial de los materiales

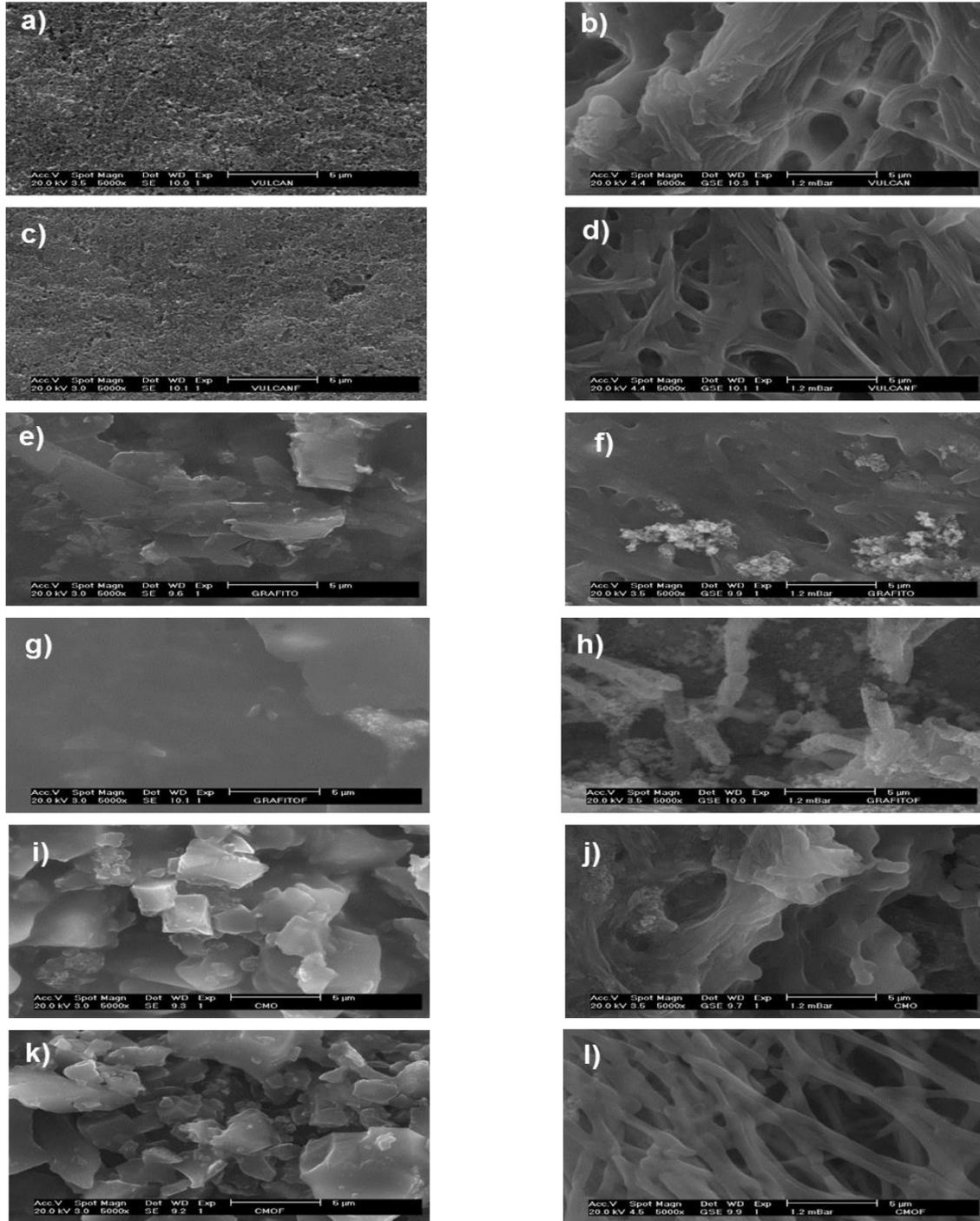
carbonosos se realizó con metanol, un agente químico suave, no se aprecian diferencias significativas entre las muestras tratadas y aquellas sin tratar.



**Figura 3.4** Imágenes de MEB de a y b) Vulcan XC-72 y Vulcan XC-72 funcionalizado, c y d) Grafito y Grafito funcionalizado, e y f) CMO y CMO funcionalizado.

### 3.2.7 Análisis por Microscopía Electrónica de Barrido (MEB) de los electrodos.

En la Figura 3.5 se muestran las micrografías de MEB de los electrodos conteniendo catalizador sin y con biopelícula de *B. subtilis*. Respectivamente: a y b) Vulcan; c y d) Vulcan funcionalizado; e y f) Grafito; g y h) Grafito funcionalizado; i y j) CMO; k y l) CMO funcionalizado.



**Figura 3.5** Imágenes de MEB de electrodos sin y con biopelícula: a y b) Vulcan; c y d) Vulcan funcionalizado; e y f) Grafito; g y h) Grafito funcionalizado; i y j) CMO; k y l) CMO funcionalizado.

Se observa que los electrodos sin biopelícula (columna de imágenes de la izquierda) presentan una morfología como la descrita para cada catalizador en la sección 3.2.6. Por su parte, en los electrodos con biopelícula (columna de imágenes de la derecha) se presenta la formación de una matriz extracelular sobre la superficie parecida a redes de fibrillas [57]. Esta biopelícula está formada por el microorganismo *B.subtilis*, el cual tuvo un proceso de crecimiento de 6 días sobre los electrodos. El microorganismo crece formando colonias parecidas a tiras largas [57], lo cual se pudo comprobar en las micrografías.

Los resultados muestran una biopelícula más gruesa en los casos de Vulcan y CMO, en comparación con Grafito donde tiene un crecimiento incipiente. La matriz extracelular se observa con un desarrollo más estructurado sobre los electrodos conteniendo Vulcan y CMO funcionalizados (Figuras d y l), lo que sugiere que la presencia de grupos funcionales promueve su formación.

## **Capítulo 4. Evaluación Electroquímica de Catalizadores Carbonosos**

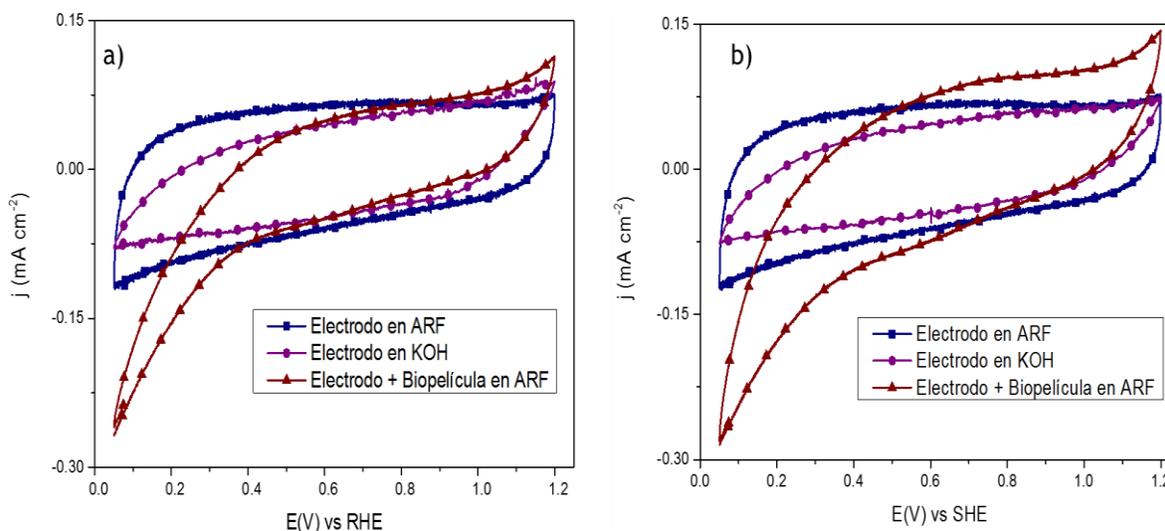
## 4.1 Evaluación en media celda

### 4.1.1. Comportamiento de electrodos con catalizadores de Grafito sin funcionalizar y funcionalizado

En la figura 4.1 se muestran los VCs de los electrodos conteniendo a) Grafito y b) Grafito funcionalizado en dos electrolitos: i) Agua Residual Farmacéutica (ARF), y ii) KOH con  $\text{pH} = 9.6$ . Se presentan también los VCs correspondientes a los electrodos donde se formó una biopelícula de *B. subtilis*, en el electrolito de ARF. En ambos casos, en ausencia de biopelícula el comportamiento en soluciones de ARF y KOH es puramente capacitivo, es decir, no se observan corrientes Faradaicas producto de reacciones redox. Llama la atención que en ARF, una solución novedosa en aplicaciones electroquímicas, se tengan VCs de forma cuasi-rectangular y un potencial de retorno relativamente rápido. Ello indica que el ARF no bloquea el comportamiento capacitivo del Grafito en ambas figuras.

En contraste, la forma de los VCs de los electrodos conteniendo *B. subtilis* es diferente, un comportamiento electroquímico que indica un cambio de mecanismo de reacción. Al formarse la biopelícula, se generan densidades de corriente ( $j$ ) debidas a reacciones redox, lo cual sugiere la transferencia de electrones de los microorganismos a los catalizadores. Además, el potencial de inicio de la reacción se desplaza a potenciales más positivos, en relación al potencial en ausencia de biopelícula.

Los valores de  $j$  generados por Grafito funcionalizado (figura b) son más altos que los de Grafito en la figura a), lo que indica un efecto positivo de la modificación superficial con metanol.



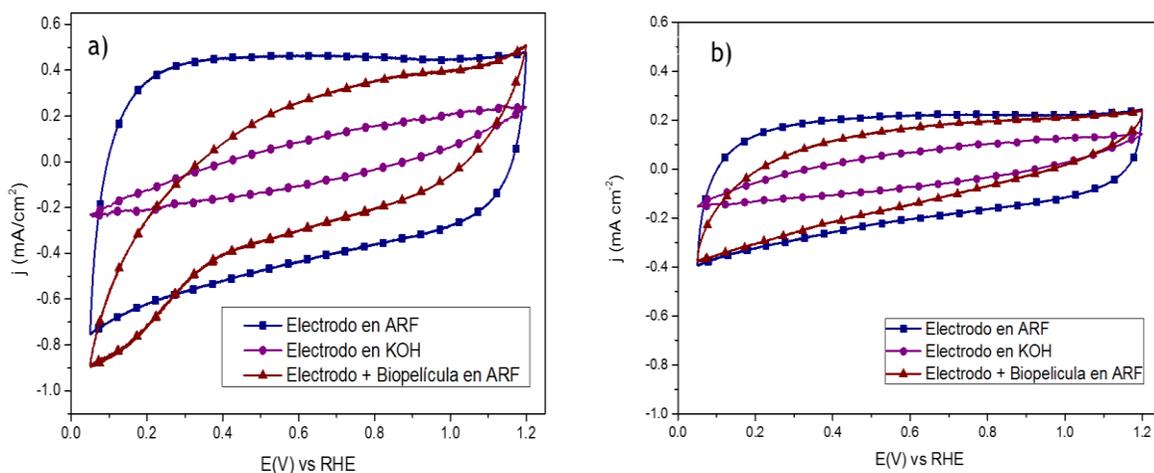
**Figura 4.1** VCs de los electrodos conteniendo a) Grafito y b) Grafito funcionalizado, sin y con biopelícula de *B.subtilis*. Electrolitos sin biopelícula: ARF y KOH con pH = 9.6. Electrolito con biopelícula: ARF.  $v = 20 \text{ mV s}^{-1}$ .

#### 4.1.2 Comportamiento de electrodos de Vulcan XC-72 y Vulcan XC-72 funcionalizado

En la Figura 4.2 se presentan los VCs de electrodos con capa catalítica de a) Vulcan XC-72 y b) Vulcan XC-72 funcionalizado. Al igual que en el caso anterior, los VCs de electrodos sin biopelícula se adquirieron en electrolitos de ARF y KOH con pH = 9.6. Para los electrodos con biopelícula de *B.subtilis* se obtuvieron en ARF. Al igual que el Grafito, en ARF y KOH, el comportamiento de los electrodos sin biopelícula es capacitivo. Destaca que en solución de ARF los valores de  $j$  son considerablemente más altos que en KOH, lo que puede deberse al bajo pH de esta última, destacando el Vulcan sin funcionalizar en la figura a).

El comportamiento del Vulcan cambia cuando el electrodo tiene la biopelícula formada por *B.subtilis* en solución de ARF, ya que se generan densidades de corriente debidas a reacciones redox y el potencial de inicio se desplaza a valores más positivos. Este comportamiento es particularmente evidente en el caso de Vulcan sin funcionalizar en la figura a). Sin embargo, los valores de  $j$  en presencia

de biopelícula son del mismo orden que las generadas sin *B. subtilis*. A diferencia del Grafito, el Vulcan no funcionalizado genera valores de  $j$  más altos que aquellos del material funcionalizado. Este resultado indica un efecto negativo de la funcionalización del Vulcan con metanol para este tipo de reacciones.



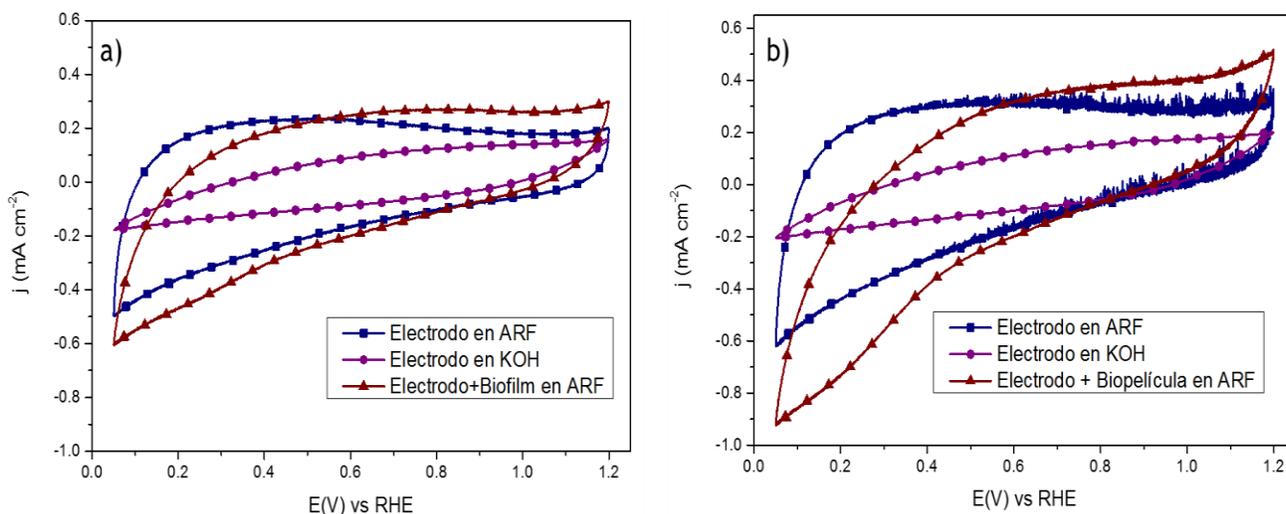
**Figura 4.2** VCs de los electrodos conteniendo a) Vulcan y b) Vulcan funcionalizado, sin y con biopelícula de *B. subtilis*. Electrolitos sin biopelícula: ARF y KOH con pH = 9.6. Electrolito con biopelícula: ARF.  $v = 20 \text{ mV s}^{-1}$ .

#### 4.1.3 Comportamiento de electrodos con catalizadores de Carbón Mesoporoso Ordenado (CMO) sin funcionalizar y funcionalizado

En la figura 4.3 se muestran los VC's de electrodos conteniendo a) CMO y b) CMO funcionalizado, bajo las mismas condiciones que las descritas para Grafito y Vulcan. Ambos electrodos de CMO sin biopelícula presentan un comportamiento capacitivo.

El comportamiento electroquímico de los electrodos con biopelícula de *B. subtilis* cambia, para generar densidades de corriente debidas a procesos redox en electrolito de ARF. Igualmente, el potencial de inicio de la reacción se desplaza a potenciales más positivos. Ello indica que se lleva a cabo un proceso de transferencia electrónica hacia los ánodos de CMO debido a la formación de una

matriz extracelular. Este comportamiento concuerda con lo observado en la figura 3.5 donde se aprecia la formación de la biopelícula en el electrodo. En el caso del CMO, la modificación superficial con metanol tiene un efecto positivo ya que los valores de  $j$  del material funcionalizado son más altos que los del CMO sin tratamiento.

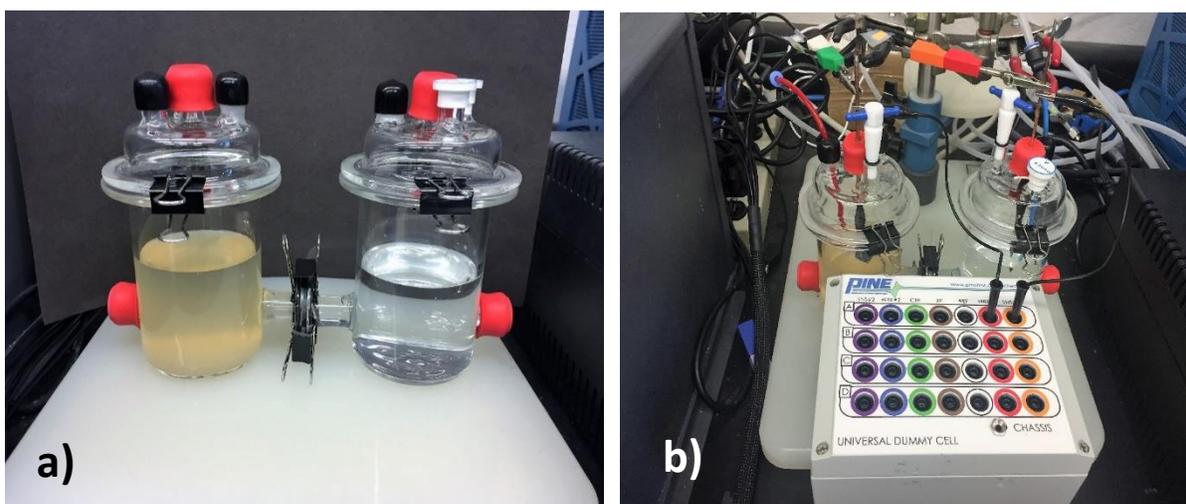


**Figura 4.3** VCs de los electrodos conteniendo a) CMO y b) CMO funcionalizado, sin y con biopelícula de *B.subtilis*. Electrolitos sin biopelícula: ARF y KOH con pH = 9.6. Electrolito con biopelícula: ARF.  $\nu = 20 \text{ mV s}^{-1}$ .

Al comparar el desempeño de los electrodos en las Figuras 4.1 a 4.3, los catalizadores que muestran la mayor actividad catalítica al generar los valores de  $j$  más altos, son el Vulcan no funcionalizado y el CMO funcionalizado (Figuras 4.2 a y 4.3 b, respectivamente).

## 4.2 Caracterización de los catalizadores como ánodos en una Celda de Combustible Microbiana (CCM)

En la figura 4.4 a) se muestra un detalle de la CCM (ver sección 2.9) donde se aprecia la cámara anódica conteniendo ARF, así como la catódica con electrolito KOH de pH = 9.6. Se observa la unión entre cámaras donde se tiene la membrana de Nafión® que actúa como separador y medio para intercambio de especies aniónicas. En la Figura 4.4. b) se aprecia el montaje de la CCM con los electrodos (ánodo y cátodo), la conexión al potenciostato y la celda Dummy donde se pueden realizar diversas configuraciones para variar la resistencia, denominada  $R_{ext}$ . Este es el parámetro variable para obtener las curvas de polarización de la CCM.



**Figura 4.4** a) Detalle de la CCM; b) montaje de la CCM conectada al potenciostato y a la celda Dummy.

En la tabla 4.1 se presentan los catalizadores utilizados tanto para el ánodo como para el cátodo, así como las condiciones de cada cámara.

**Tabla 4.1** Condiciones de la CCM durante operación con diferentes ánodos.

Componente	Ánodo	Cátodo
Electrodo	Vulcan + <i>B.subtilis</i>	Pt/C (comercial)
	CMO + <i>B.subtilis</i>	
	CMO funcionalizado + <i>B.subtilis</i>	
Electrolito	Agua Residual Farmacéutica	KOH
	pH= 9.6	pH= 9.6
	Conductividad 11.53 mS cm <sup>-1</sup>	31.63 μS cm <sup>-1</sup>
Atmósfera	N <sub>2</sub>	O <sub>2</sub>

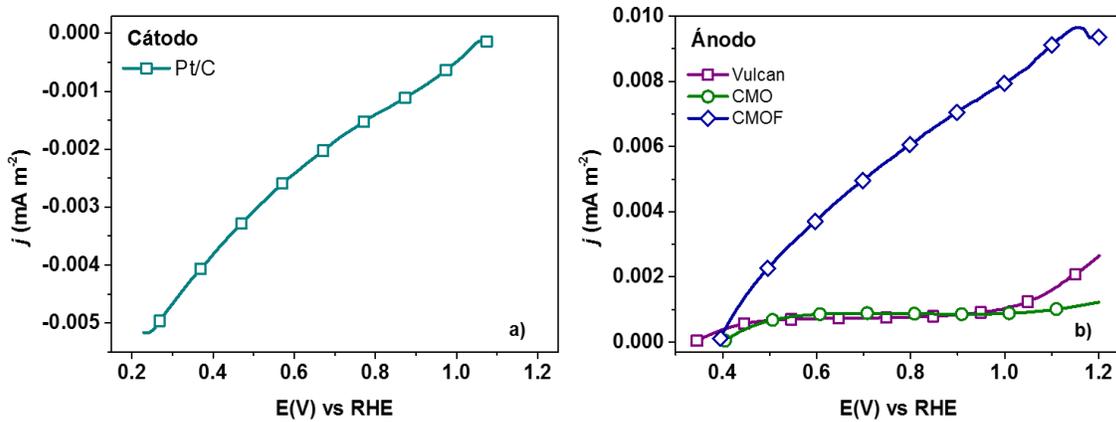
#### 4.2.1 Evaluación de comportamiento de ánodos y cátodo mediante Barrido Lineal de Potencial (BLP)

En la figura 4.5 a) se presenta la curva de BLP del cátodo (electrodo conteniendo capa catalítica de Pt/C comercial), en el electrolito de KOH (pH= 9.6) saturado de O<sub>2</sub>. En este caso, el contraelectrodo es el ánodo con CMO funcionalizado. Al realizar el barrido en el sentido negativo se incrementa la corriente, debido a que se lleva a cabo la Reacción de Reducción de Oxígeno (RRO). El potencial de inicio de la RRO es cercano a 1.1 V vs. RHE.

En la figura 4.5 b) se observan los BLPs (barrido en el sentido positivo) de los diferentes ánodos (ver Tabla 4.1). Tanto Vulcan + *B. subtilis* como CMO + *B. subtilis* presentan densidades de corriente muy bajas en el intervalo de potencial entre 0.4 y 1.0 V vs. RHE. A valores más altos de 1.05 V, la densidad de corriente se incrementa en el caso de Vulcan + *B. subtilis*.

Por su parte, el ánodo con CMO funcionalizado + *B. subtilis* genera una densidad de corriente significativamente mayor en comparación de los otros dos materiales, la cual comienza a incrementarse prácticamente al iniciar el BLP. Este comportamiento indica una alta actividad catalítica de CMO funcionalizado +

*B. subtilis* para promover las reacciones bioquímicas y electrocatalíticas en la cámara anódica de la CCM.



**Figura 4.5** Curvas de BLP en la CCM: a) Cátodo (electrodo: Pt/C comercial) como electrodo de trabajo; b) Ánodos (Vulcan, CMO + *B. subtilis* y CMO funcionalizado + *B. subtilis*) como electrodos de trabajo.

## 4.2.2 Evaluación en Electrocatalizadores Carbonosos Celda de Combustible Microbiana.

### 4.2.2.1 Curvas de polarización

En la figura 4.6 se presentan las curvas de polarización de los siguientes ánodos: a) Pt/C *B. subtilis* (comercial, caracterizado a modo de comparación), b) Vulcan no funcionalizado + *B. subtilis*, c) CMO no funcionalizado + *B. subtilis*, d) CMO funcionalizado + *B. subtilis*. Como cátodo se empleó un electrodo conteniendo capa catalítica de Pt/C comercial, sin biopelícula. Los valores fueron obtenidos al variar la  $R_{ext}$  de la celda Dummy con los siguientes valores: 10  $\Omega$ , 100  $\Omega$ , 1 K $\Omega$ , 1.2 K $\Omega$ , 5 K $\Omega$  y 100 K $\Omega$ .

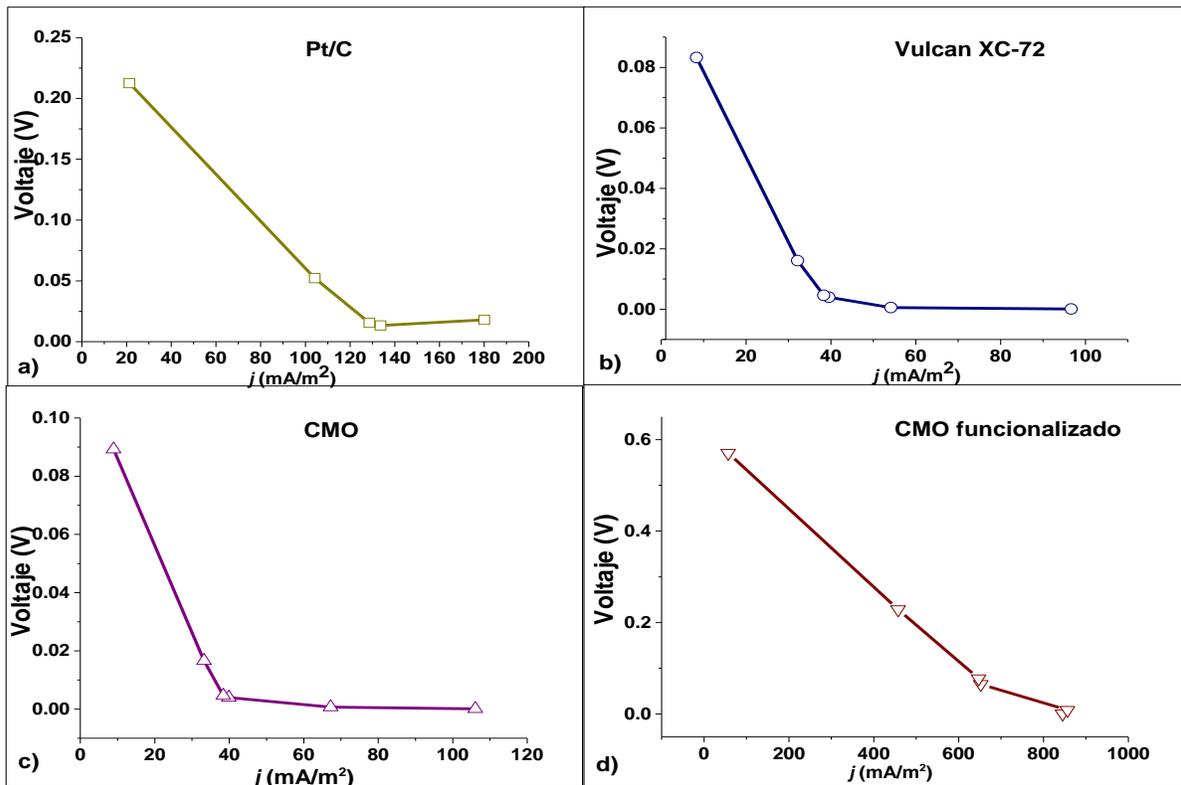
En los gráficos se puede observar que al utilizar el ánodo de Pt/C, la CCM genera un voltaje de circuito abierto ( $E_{celda}$ ) de 0.22 V y un valor densidad de corriente de la celda máximo ( $j_{celda}$ ) de 180 mA m<sup>-2</sup>. Los ánodos Vulcan no funcionalizado + *B.*

*subtilis* y CMO no funcionalizado + *B. subtilis* generan valores de  $E_{\text{celda}}$  y  $j_{\text{celda}}$  claramente menores que el basado en Pt/C. El desempeño de estos materiales carbonosos es muy bajo.

Por su parte, al ánodo conteniendo CMO funcionalizado + *B. subtilis* genera valores de  $E_{\text{celda}}$  y  $j_{\text{celda}}$  de 0.580 V y 854 mA m<sup>-2</sup>, los cuales son significativamente mayores que los obtenidos con el ánodo de Pt/C comercial. El valor de  $E_{\text{celda}}$  es 2.6 veces más alto, mientras que el de  $j_{\text{celda}}$  es 4.7 veces mayor al utilizar el ánodo basado en CMO funcionalizado.

Al comparar con lo reportado en la literatura, el desempeño de la celda en la Figura 4.6 b) tiene un valor más alto de  $E_{\text{celda}}$  que un sistema equivalente operando con almidón como combustible (0.50 V), aunque más bajo que el mismo dispositivo con glucosa como combustible (0.73 V) [58]. En términos de  $j_{\text{celda}}$ , los valores reportados en la referencia son mayores tanto con almidón como con glucosa.

Sin embargo, los resultados de la caracterización de la CCM conteniendo materiales carbonosos en este trabajo son relevantes, ya que se demuestra que: i) un catalizador libre de metal y por lo tanto económico como el CMO tiene un mejor desempeño que el Pt/C; ii) el *B. subtilis* es un microorganismo capaz de promover la generación de energía eléctrica a partir de ARF.



**Figura 4.6** Curvas de polarización de la CCM con diferentes ánodos: a) Pt/C + *B. subtilis*, b) Vulcan no funcionalizado + *B. subtilis*, c) CMO no funcionalizado + *B. subtilis*, d) CMO funcionalizado + *B. subtilis*. Cátodo en todas las pruebas: Pt/C comercial sin biopelícula.

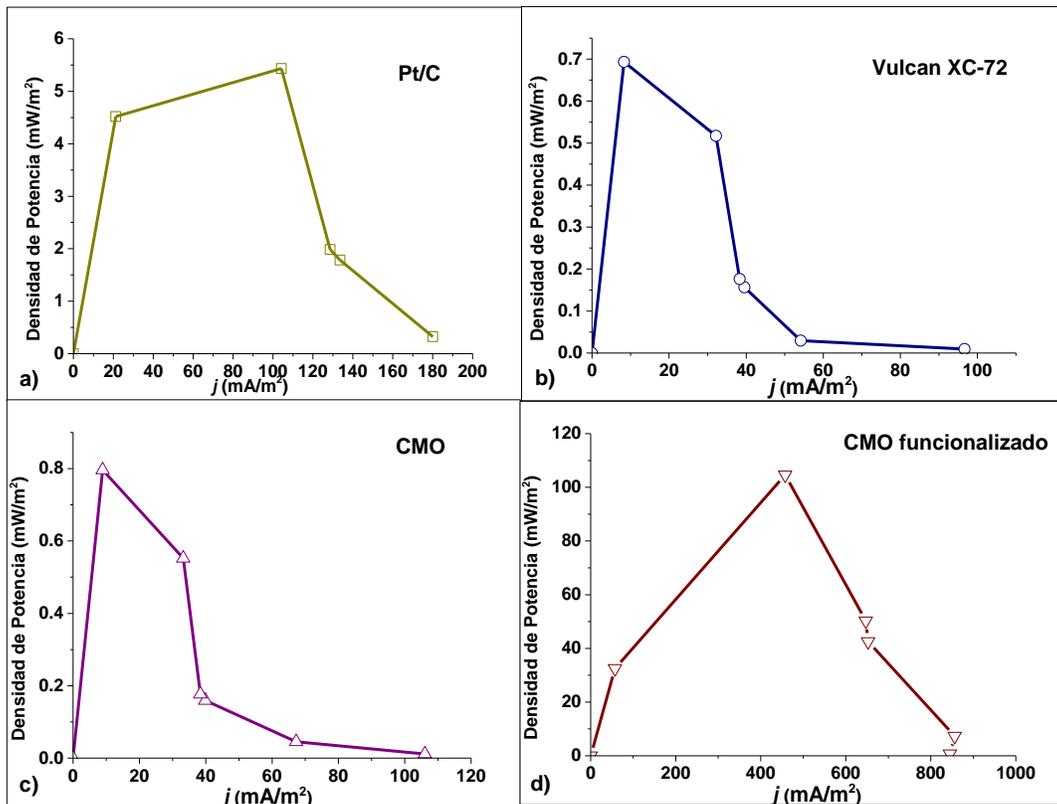
#### 4.2.2.2 Curvas de densidad de potencia

En la figura 4.7 se presentan las curvas de densidad de potencia ( $P_{\text{celda}}$ ) vs.  $j_{\text{celda}}$  de la CCM con los ánodos de: a) Pt/C + *B. subtilis*, b) Vulcan no funcionalizado + *B. subtilis*, c) CMO no funcionalizado + *B. subtilis* y d) CMO funcionalizado + *B. subtilis*. Con el ánodo basado en Pt/C se genera un valor de  $P_{\text{celda}}$  máximo de  $5.42 \text{ mW m}^{-2}$ .

Los ánodos conteniendo Vulcan y CMO sin funcionalizar presentaron valores de  $P_{\text{celda}}$  más bajos ( $0.69 \text{ mW m}^{-2}$  y  $0.79 \text{ mW m}^{-2}$ , respectivamente), lo que confirma

que estos dos materiales carbonosos tiene un bajo desempeño como ánodos en la CCM.

Por su parte, el CMO funcionalizado genera un valor de  $P_{\text{celda}}$  de  $105 \text{ mW m}^{-2}$ , 19 veces mayor que Pt/C.



**Figura 4.7** Curvas  $P_{\text{celda}}$  vs.  $j_{\text{celda}}$  de la CCM equipada con los ánodos a) Pt/C + *B. subtilis*, b) Vulcan no funcionalizado + *B. subtilis*; c) CMO no funcionalizado + *B. subtilis*; y c) CMO funcionalizado + *B. subtilis*. Cátodo: en todas las pruebas: Pt/C comercial sin biopelícula.

## **Conclusiones generales**

## Caracterización Físicoquímica

- XRD: se confirmó la estructura de carbón de los materiales carbonosos.
- RAMAN: se determinó que el CMO tiene una mayor grafitización que Vulcan. Después de funcionalización se incrementó el orden del CMO.
- MEB:
  - Se definió la morfología de los materiales carbonosos.
  - Se demostró el crecimiento microbiano sobre la superficie de los electrodos para formar una biopelícula de *B. subtilis*.
  - Se determinó la alta biocompatibilidad de CMO funcionalizado con la bacteria.
- Análisis BET: se demostró la naturaleza mesoporosa del CMO.

## Caracterización Electroquímica

- Los catalizadores a base de carbono + biopelícula de *B. subtilis* generaron densidades de corriente debidas a procesos redox en la solución de ARF.
- Ello sugiere la transferencia de electrones de los microorganismos hacia los catalizadores debido a la presencia de *B. subtilis*.
- La funcionalización con metanol tuvo un efecto positivo en el CMO, ya que se incrementó el valor de  $j$  generada en ARF.
- El catalizador más activo tanto en media celda como en CCM fue el CMO funcionalizado + biopelícula de *B. subtilis*.
- El desempeño electroquímico de este material carbonoso de bajo costo lo convierte en un potencial ánodo para aplicaciones en CCMs.

## Agua residual

- El agua residual mostró ser un sustrato con buenas propiedades físicoquímicas para aplicación en CCMs.

### ***Bacillus subtilis***

- El microorganismo mostró ser electroactivo, además de crecer en el medio a temperatura ambiente y pH básico.
- Lo anterior puede convertirlo en un microorganismo de fácil acceso y uso en este tipo de aplicaciones.

## Bibliografía

- [1] D. Lovely. Powering microbes with electricity: direct electron transfer from electrodes to microbes. *Env Microbiol Rep.* 3 (2011) 27-35.
- [2] Y. Sharma y P. Kundu. Biocatalysts in microbial fuel cells. *Enzyme Microb Tech.* 47 (2010) 179-188.
- [3] S. Zheng, F. Yang, S. Chen, L. Liu, Q. Xiong, T. Yu, F. Zhao, U. Schröder y H. Hou. Binder-free carbon black/stainless steel mesh composite electrode for high-performance anode in microbial fuel cells. *J Power Sources.* 284 (2015) 252-257.
- [4] D. Revelo, N. Hurtado y J. Ruiz. Celdas de Combustible Microbianas (CCMs): Un Reto para la Remoción de Materia Orgánica y la Generación de Eléctrica. *Información Tecnológica.* 24 (2013) 17-28.
- [5] S. Kazemi, M. Mohseni y K. Fatih. Passive air breathing flat-plate microbial fuel cell operation. *J Chem Technol Biot.* 90 (2014) 468-475.
- [6] C. Fuentes-Albarrán, A. Del Razo, K. Juárez y A. Alvarez-Gallegos. Influence of NaCl, Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and O<sub>2</sub> on power generation from microbial fuel cells with non-catalyzed carbon electrodes and natural inocula. *Sol Energy.* 86 (2012) 1099-1107.
- [7] D. Lovley. Electromicrobiology. *Annual Review of Microbiology.* 66 (2012) 391-409.
- [8] X. Chen, D. Cui, X. Wang, X. Wang y W. Li. Porous carbon with defined pore size as anode of microbial fuel cell. *Biosens Bioelectron.* 69 (2015) 135-141.
- [9] D. Lovley. Microbial fuel cells: novel microbial physiologies and engineering approaches. *Curr Opin Biotechnol.* 17 (2006) 327-332.
- [10] S. Read, P. Dutta, P. Bond, J. Keller y K. Rabaey. Initial development and structure of biofilms on microbial fuel cells anodes. *BMC Microbiol.* 10 (2010) 98.
- [11] G. Sun, D. Rodrigues, A. Thygesen, G. Daniel, D. Fernando y A. Meyer. Inocula selection in microbial fuel cells based on anodic biofilm abundance of *Geobacter sulfureducens*. *Chinese J Chem Eng.* 24 (2016) 379-387.
- [12] G. Sun, A. Thygesen, M. Ale, M. Mensah, F. Poulsen y M. A.S. The significance of the initiation process parameters and reactor design for maximizing the efficiency of microbial fuel cells. *Appl Microbiol Biotechnol.* 98 (2014) 2415-2427.
- [13] D. Pant, G. Van Bogaert, L. Diels y K. Vanbroekhoven. A review of the substrates used in microbial fuel cells (MFC's) for sustainable energy production. *Bioresource Technol.* 101 (2010) 1533-1543.

- [14] P. Ledezma, B. Donose, S. Freguia y J. Keller. Oxidised stainless steel: a very effective electrode material for microbial fuel cell bioanodes but at high risk of corrosion. *Electrochim Acta*. 158 (2015) 356-360.
- [15] Z. Du, H. Li y T. Gu. A state of the art review on microbial fuel cells: A promising technology for wastewater treatment and bioenergy. *Biotechnol Adv*. 25 (2007) 464-482.
- [16] W.-W. Li, G. Shen, W. Liu y H. Yu. Recent advances in the separators for microbial fuel cells. *Bioresource Technol*. 102 (2011) 244-252.
- [17] A. Sotres, J. Díaz-Marcos, M. Guivernau, J. Illa, A. Magri, F. Prenafeta-Boldu, A. Bonmatí y M. Viñas. Microbial community dynamics in two-chambered microbial fuel cells: Effect of different ion exchange membranes. *J Chem Technol Biotechnol*. 90 (2015) 1497-1506.
- [18] A. ElMekawy, H. Hegab, X. Dominguez-Benetton y D. Pant. Internal resistance of microfluidic microbial fuel cell: Challenges and potential opportunities. *Bioresource Technol*. 142 (2013) 672-682.
- [19] B. Lai, X. Tang, Z. Li y Q. Zhang. Power production enhancement with a polyaniline modified anode in microbial fuel cells. *Biosens Bioelectron*. 28 (2011) 373-377.
- M. Gutierrez, Z. García-Carvajal, M. Hortiguera, L. Yuste, F. Roja, M. Ferrer y F. Del
- [20] Monte. Biocompatible MWCNT scaffolds for immobilization and proliferation of *E.coli*. *J Mater Chem*. 17 (2007) 2992-2995.
- [21] Y. Wang, B. Li, D. Cui, X. Xiang y W. Li. Nano-molybdenum carbide/carbon nanotubes composite as bifunctional anode catalyst for high-performance *Escherichia coli*-based microbial fuel cell. *Biosens Bioelectron*. 51 (2014) 349-355.
- [22] D. Cui, Y. Wang, L. Xing y W. Li. Which determines power generation of microbial fuel cell based on carbon anode, surface morphology or oxygen-containing group?. *Int J Hydrogen Energ*. 39 (2014) 15081-15087.
- [23] N. Krishnaraj, R. Karthikeyan, S. Berchmans, S. Chandran y P. Pal. Functionalization of electrochemically deposited chitosan films with alginate and Prussian blue for enhanced performance of microbial fuel cells. *Electrochim Acta*. 112 (2013) 465-472.
- [24] N. Chabert, A. O.A. y W. Achouak. All ecosystems potentially host electrogenic bacteria. *Bioelectrochemis*. 106 (2015) 88-96.
- [25] K. Watanabe. Recent Developments in Microbial Fuel Cell Technologies for Sustainable Bioenergy. *J Biosci Bioeng*. 106 (2008) 528-536.

- [26] E. Guerrini, M. Grattieri, S. Trasatti, M. Bestetti y P. Cristiani. Performance explorations of single chamber microbial fuel cells by using various microelectrodes applied to biocathodes. *Int J Hydrogen Energ.* 39 (2014) 21837-21846.
- [27] L. Wang, Q. Lin, J. Zhang, J. Wang, Y. Zhou y X. Feng. New progress in microbial fuel cells and its outlook. *Adv Mater Research.* 860 (2014) 816-821.
- [28] B. Maestro, J. Ortiz, G. Schrott, J. Busalmen, V. Climent y J. Feliu. Crystallographic orientation and electrode nature are key factors for electric current generation by *Geobacter sulfurreducens*. *Bioelectrochemis.* 98 (2011) 11-19.
- [29] D. Lovley. The microbe electric: conversion of organic matter to electricity. *Curr Opin Biotech.* 19 (2008) 564-571.
- [30] E. Fernando, T. Keschavarz y G. Kyazze. Simultaneous co-metabolic decolourisation of azo dye mixtures and bio-electricity generation under thermophilic (50 °C) and saline conditions by an adapted anaerobic mixed culture in microbial fuel cells. *Bioresource Technol.* 127 (2013) 1-8.
- [31] H. Yuan y Z. He. Graphene-Modified Electrodes for Enhancing the Performance of Microbial Fuel Cells. *Nanoscale.* 7 (2015) 7022-7029.
- [32] D. Pant, G. Bogaert, C. Porto-Carrero, D. L. y K. Vanbroekhoven. Anode and cathode materials characterization for a microbial fuel cell in half cell configuration. *Water Sci Technol.* 63 (2011) 2457-2461.
- [33] M. Sulonen, M. Kokko, A.-M. Lakaniemi y J. Puhakka. Electricity generation from tetrathionate in microbial fuel cells by acidophiles. *J Hazard Mater.* 284 (2015) 182-189.
- [34] D. Karadag, O. Köroglu, B. Ozkaya, M. Cakmakci, S. Heaven y C. Banks. A review on fermentative hydrogen production from dairy industry wastewater. *J Chem Technol Biotechnol.* 89 (2014) 1627-1636.
- [35] A. González, J. Perez, P. Cañizares, M. Rodrigo y F. L. J. Fernandez. Study of a photosynthetic MFC for energy recovery from synthetic industrial fruit juice wastewater. *Int J Hydrogen Energ.* 39 (2014) 21828-21836.
- [36] B. Coday, B. Yaffe, P. Xu y T. Cath. Rejection of trace organic compounds by forward osmosis membranes: A literature review. *Environ Sci Technol.* 48 (2014) 3612-3624.
- [37] M. Zhou, M. Chi, J. Luo, H. He y T. Jin. An Overview of Electrode Materials in Microbial Fuel Cells. *J Power Sources.* 196 (2011) 4427-4435.
- [38] H. Wang, D. Heil, Z. Ren y P. Xu. Removal and fate of trace organic compounds in microbial fuel cells. *Chemosphere.* 125 (2015) 94-101.

- [39] T. Schulze, G. Streck y A. Paschke. Sampling and Conservation. Treatise on Water Science, Germany, Elsevier 3 (2011) 131-152.
- [40] J. Harley y L. Prescott, Laboratory Exercises in Microbiology. Mc Graw Hill (1999).
- [41] D. Morales-Acosta, F. Rodríguez-Varela y R. Benavides. Template-free synthesis of ordered mesoporous carbon: Application as support of highly active Pt nanoparticles for the oxidation of organic fuels. *Int. J. Hydrogen Energ.* 41 (2016) 3387-3398.
- [42] Q. He, J. Dai, L. Zhu, K. Xiao y Y. Yin. Synthesis and lead absorptin properties of sintered activated carbon supported zero-valent iron nanoparticle. *J Alloy Compd.* 687 (2016) 326-333.
- [43] J. Gao, X. Wang, Y. Zhang, Q. Lu, M. Chen y Y. Bai. Preparation and supercapacitive performance of nanosized manganese dioxide/ordered mesoporous carbon composites. *Electrochim Acta.* 192 (2016) 234-242.
- [44] T. Xu, H. Zhang, H. Zhong, Y. Ma, H. Jin y Y. Zhang. Improved stability of TiO<sub>2</sub> modified Ru<sub>85</sub>Se<sub>15</sub>/C electrocatalyst for proton exchange membrane fuel cells. *J Power Sources.* 195 (2010) 8075-8079.
- [45] G. Saravanan y S. Mohan. Pt nanoparticles embedded on reduced graphite oxide with excellent electrocatalytic properties. *Appl Surf Sci.* 386 (2016) 96-102.
- [46] X. Tan, H. Liu, Y. Jiang, G. Liu, Y. Guo, L. Sun y W. Chu. Graphite assisted synthesis of nanoparticles interconnected porous two-dimensional LiMn<sub>2</sub>O<sub>4</sub> nanoplates with superior performance. *J Power Sources.* 328 (2016) 345-354.
- [47] S. Peng, X. Fan, S. Li y J. Zhang. Green synthesis and characterization of graphite oxide by orthogonal experiment. *J Chil Chem Soc.* 58 (2013) 4.
- [48] T. Iwazaki, H. Yang, R. Obinata, W. Sugimoto y Y. Takasu. Oxygen-reduction activity of silk-derived carbons. *J Power Sources.* 195 (2010) 5840-5847.
- [49] Y. Ma, H. Wang, S. Ji, J. Goh, H. Feng y R. Wang. Highly active Vulcan Carbon composite for oxygen reduction reaction in alkaline medium. *Electrochim Acta.* 133 (2014) 391-398.
- [50] S. Paszkiewicz, A. Szymczyk, X. Sui, H. Wagner, A. Linares, A. Cireira, A. Varea, T. Ezquerra y Z. Roslaniec. Electrical conductivity and transparency of polymer hybrid nanocomposites based on poly (trimethylene terephthalate) containing single walled carbon nanotubes and expanded graphite. *J Appl Polym Sci.* 44370 (2016) 1-9.

- [51] W. Shou, B. Chao, A. Ahmad y D. Gang. Ordered mesoporous carbon preparation by the in situ radial polymerization of acrylamide and its application for resorcinol removal. *J Appl Polym Sci.* 43426 (2016) 1-11.
- [52] X. Peng, X. Chu, W. Liu, S. Wang, Y. Zou y X. Wang. Bioelectricity-generating behavior of a chemically modified carbon black anode in microbial fuel cells. *Chinese J Catal.* 36 (2015) 1326-1332.
- [53] E. Leal da Silva, M. Ortega Vega, P. dos Santos Correa, A. Cuña, N. Tancredi y C. de Fraga Malfatti. Influence of activated carbon porous texture on catalyst activity for ethanol electro-oxidation. *Int J Hydrogen Energ.* 39 (2014) 214760-14767.
- [54] J. Gao, X. Wang, Q. Zhao, Y. Zhang y J. Liu. Synthesis and supercapacitive performance of three-dimensional cubic-ordered mesoporous carbons. *Electrochim Acta.* 163 (2015) 223-231.
- [55] A. Lytkina, N. Orekhova, M. Ermilova, S. Belenov, V. Guterman, M. Efimov y A. Yaroslavtsev. Bimetallic carbon nanocatalysts for methanol steam reforming in conventional and membrane reactors. *Catal Today.* 268 (2016) 60-67.
- [56] L. Jiang, J. Zhang, X. Xu, J. Zhang, H. Liu, Z. Guo, Y. Kang, Y. Li y J. Xu. Characterization and application of expanded graphite modified with phosphoric acid and glucose for the removal of Ni (II) from aqueous solution. *Appl Surf Sci.* 357 (2015) 2355-2363.
- [57] A. Bridier, T. Meylheuc y R. Briandet. Realistic representation of *Bacillus subtilis* biofilms architecture using combined microscopy (CLSM, ESEM and FESEM). *Micron.* 48 (2013) 65-69.
- [58] L. Zhang, S. Zhou, L. Zhuang, W. Li, J. Zhang, N. Lu y L. Deng. Microbial fuel cell based on *Klebsiella pneumoniae* biofilm. *Electrochemistry Commun.* 10 (2008) 1641-1643.