



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

UNIDAD SALTILLO

Estudio de biopelículas de las cepas *Escherichia coli* y *Bacillus subtilis* soportadas en biocarbones para su uso como bioánodos en celdas de combustible microbianas

Tesis que presenta

Carlos Antonio Cobos Reyes

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

Dra. Ivonne Liliana Alonso Lemus

Dedicatoria

A todas las personas que me han apoyado y han creído en mí. En especial a mis papás y a mis hermanas. Sin su apoyo y motivación esto no hubiera sido posible.

Agradecimientos

A Dios y a la vida, por permitirme llegar hasta aquí y poder concluir con esta parte de mi proyecto de vida.

A mi familia, en especial a Pedro por su apoyo incondicional.

A mis directores de tesis, Dr. Javier Rodríguez Varela y Dra. Ivonne Alonso Lemus, quienes me formaron en el área de electroquímica y materiales, por el apoyo brindado, así como por su paciencia y dedicación para culminar este proyecto de forma exitosa.

Al Dr. Fabián Fernández Luqueño, por su apoyo constante y por las facilidades proporcionadas para el uso de diversos equipos y reactivos para la realización de esta tesis.

A la Dra. Esther por brindarnos su apoyo en la parte de síntesis, así como permitirnos el uso de materiales y equipos.

A mis revisores, quienes con sus recomendaciones enriquecieron este trabajo de investigación.

A mis compañeros y amigos de la cuarta generación de SRNyE, en especial a Chuy, Ana, Gaby, Omar y Andrés, por las experiencias vividas, el tiempo compartido en este camino y el aprendizaje diario.

A mis amistades Angie, Ace, Karen y Mitchell, porque a pesar de la distancia siempre me han apoyado.

A mis compañeros del La.S.A.E. con quienes siempre hubo apoyo mutuo en la realización de todas nuestras actividades.

A los compañeros del Cinvestav que pude conocer y me aportaron sus conocimientos y amistad, en especial a Angelina y Sandra.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca 615573, otorgada para la realización de los estudios de maestría y los proyectos 241526, 250632 y 253986 para la realización de este trabajo de investigación.

Al personal del Cinvestav Unidad Saltillo, por las facilidades otorgadas. En especial al personal de microscopía y a la Lic. Diana Palacios por todo su apoyo.

Al personal del CICY y del CICATA-IPN Legaria, quienes nos apoyaron en la caracterización fisicoquímica.

Índice

Resumen.....	ix
Abstract.....	xi
Introducción	1
Capítulo 1. Antecedentes y justificación	3
1.1 Abastecimiento de energía y agua: dos problemas urgentes de atender	3
1.2 CCMs: una solución sustentable	4
1.3 Principales retos en el diseño de CCMs	10
1.4 Justificación.....	11
Capítulo 2. Objetivos.....	14
2.1 Objetivo general	14
2.2 Objetivos particulares	14
Capítulo 3. Metodología científica.....	15
3.1 Síntesis de biocarbones	15
3.1.1 AB7.....	15
3.1.2 CG1	15
3.2 Funcionalización de biocarbones.....	16
3.3 Caracterización fisicoquímica de los biocarbones.....	16
3.3.1 Análisis de morfología por microscopía electrónica de barrido.....	16
3.3.2 Difracción de rayos X de polvos.....	17
3.3.3 Espectrometría Raman	17
3.3.4 Análisis por FTIR	17
3.3.5 Análisis textural.....	17
3.4 Obtención de bioánodos.....	17
3.4.1 Preparación de ánodos (soporte con catalizador)	17
3.4.2 Inoculación de bacterias	18
3.4.3 Crecimiento de biopelículas	18
3.5 Evaluación de actividad catalítica	19
3.5.1 Pruebas en media celda	19
3.5.2 Pruebas en celda de combustible microbiana (CCM).....	20
3.5.3 Agua residual farmacéutica (ARF)	22
Capítulo 4. Resultados y discusión	23
4.1 Rendimientos de síntesis.....	23

4.2 Propiedades fisicoquímicas de catalizadores	23
4.3 Análisis de morfología de ánodos y bioánodos	37
4.4 Caracterización de actividad catalítica en media celda	41
4.5 Caracterización en CCM.....	44
4.6 Análisis de ARF	48
Capítulo 5. Conclusiones	49
5.1 Catalizadores	49
5.2 Ánodos y bioánodos.....	49
5.3 Evaluación de la actividad catalítica	49
5.4 Tratamiento de ARF en una CCM	50
Capítulo 6. Bibliografía	51

Índice de figuras

Figura 1.1	CCM de doble cámara en la que se indican los principales componentes (Butti y col.).	5
Figura 3.1	Esquema de la CCM empleada en los experimentos.	20
Figura 4.1	Mapeos elementales de AB7 y AB7-f.	25
Figura 4.2	Mapeos elementales de CG1 y CG1-f.	26
Figura 4.3	Patrones de DRX de AB7 y AB7-f.	27
Figura 4.4	Patrones de DRX de: GAL, CG1 y CG1-f.	28
Figura 4.5	Espectros Raman de los biocarbones AB7, AB7-f, CG1 y CG1-f.	29
Figura 4.6	Espectros de FTIR de GAL y biocarbones.	30
Figura 4.7	Imágenes de MEB de: a) y b) CUE; c) y d) AB7; e) y f) AB7-f.	33
Figura 4.8	Imágenes de MEB de: a) y b) GAL; c) y d) CG1; e) y f) CG1-f.	34
Figura 4.9	Isotermas de adsorción/desorción de: a) AB7, b) AB7-f, c) CG1 y d) CG1-f.	35
Figura 4.10	Imágenes del soporte sin catalizador, a) Electrodo a difusión de gas; b) Micrografía de MEB a 5000x.	37
Figura 4.11	Micrografías de MEB con: a) y b) AB7; c) y d) AB7-f; e) y f) CG1; g) y h) CG1-f.	38
Figura 4.12	Micrografías de MEB de bioánodos conteniendo: a) y b) AB7 + <i>E. coli</i> ; c) y d) AB7-f + <i>E. coli</i> .	39
Figura 4.13	Micrografías de MEB de bioánodos conteniendo: a) y b) AB7-f + <i>B. subtilis</i> ; c) y d) CG1 + <i>B. subtilis</i> ; e) y f) CG1-f + <i>B. subtilis</i> .	40
Figura 4.14	VCs de: soporte (S) sin capa catalítica ni bacterias, soporte sin capa catalítica con biopelícula de <i>B. subtilis</i> , y soporte sin capa catalítica con biopelícula de <i>E. coli</i> .	41
Figura 4.15	VCs de ánodos y bioánodos (<i>E.coli</i> o <i>B. subtilis</i>) con capa catalítica de: a) AB7; b) AB7-f; c) CG1; d) CG1-f.	42
Figura 4.16	Curva de polarización (V-j, triángulo verde) y curva Pa-j (cuadro azul) de la CCM al inicio de la prueba de larga duración. Se muestran los puntos de VCA, 10 k Ω , 5 k Ω , 1.21 k Ω , 1 k Ω y 10 Ω .	44
Figura 4.17	Curvas Pa-j de la CCM, obtenidas durante la prueba de larga duración.	45
Figura 4.18	Evolución del voltaje en la prueba de larga duración ($R_{ext}= 10\text{ k}\Omega$).	46

Índice de tablas

Tabla 1.1	Análisis químico proximal de gallinaza en base seca (E.R.C.O.T. Netherlands).	10
Tabla 3.1	Composición del medio LB.	18
Tabla 3.2	Ecuaciones empleadas para obtener distintos parámetros en la CCM.	22
Tabla 3.3	Parámetros analizados en ARF.	22
Tabla 4.1	Producto y rendimiento de las síntesis efectuadas	23
Tabla 4.2	Composición elemental de materias primas y biocarbones por EDS.	24
Tabla 4.3	Vibraciones IR presentes en los materiales analizado.	31
Tabla 4.4	Propiedades texturales de AB7, AB7-f, CG1 y CG1-f.	37
Tabla 4.5	Parámetros de operación de la CCM durante la prueba de larga duración.	45
Tabla 4.6	Comparación entre este trabajo y algunos reportados en la literatura.	47
Tabla 4.7	Caracterización fisicoquímica de ARF utilizada en la prueba de larga duración.	48

Lista de abreviaturas

AB7	Biocarbón sintetizado a partir de desechos de cuero.
AB7-f	Biocarbón sintetizado a partir de desechos de cuero, funcionalizado.
ARF	Agua residual farmacéutica.
<i>B. subtilis</i>	<i>Bacillus subtilis</i>
CCM	Celda de combustible microbiana.
CCMs	Celdas de combustible microbianas.
CG1	Biocarbón sintetizado a partir de gallinaza.
CG1-f	Biocarbón sintetizado a partir de gallinaza, funcionalizado.
CUE	Desechos de cuero.
DBO ₅	Demanda bioquímica de oxígeno.
DQO	Demanda química de oxígeno.
DRX	Difracción de rayos X.
EDS	Espectroscopía de energía dispersiva de rayos X.
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
e.p.	En peso
FTIR	Espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier.
GAL	Gallinaza.
j	Densidad de corriente
MEB	Microscopía Electrónica de Barrido.
Pa	Densidad de potencia.
Pv	Densidad de potencia volumétrica.
R _{ext}	Resistencia externa.
SSV	Sólidos Suspendidos Volátiles.
v	Velocidad de barrido.
VC	Voltamperograma cíclico.
VCA	Voltaje de circuito abierto.
VCs	Voltamperogramas cíclicos.

Resumen

En este trabajo se sintetizaron biocarbonos activados a partir de residuos abundantes y ampliamente distribuidos, los cuales se utilizaron como catalizadores para el desarrollo de bioánodos en celdas de combustible microbianas (CCMs). Con un tratamiento térmico en atmósfera inerte, desechos de cuero se activaron con KOH para desarrollar el electrocatalizador identificado como AB7, mientras que en el caso de gallinaza se empleó $ZnCl_2$ como activante para obtener el electrocatalizador CG1. Posteriormente, se funcionalizaron AB7 y CG1 con metanol para obtener los electrocatalizadores AB7-f y CG1-f, teniendo como objetivo incrementar su biocompatibilidad con las bacterias utilizadas en este trabajo.

Por separado se hicieron crecer biopelículas de *Escherichia coli* (*E. coli*) y *Bacillus subtilis* (*B. subtilis*) sobre los electrocatalizadores depositados en un electrodo a difusión de gas. La caracterización de morfología indicó que los electrocatalizadores sintetizados a partir de residuos: cuero curtido y gallinaza, son biocompatibles con las bacterias. De este modo se fabricaron bioánodos que se evaluaron en una media celda de tres electrodos utilizando agua residual farmacéutica (ARF) como sustrato.

Las mediciones electroquímicas mostraron un desempeño claramente mayor del bioánodo conteniendo AB7-f con una biopelícula de *B. subtilis* para oxidar la materia orgánica contenida en el ARF, en comparación con el comportamiento de AB7. Por su parte, CG1 y CG1-f, con cualquiera de las biopelículas, mostraron una actividad electroquímica nula. Por otro lado, las curvas de polarización en la CCM mostraron que AB7-f + *B. subtilis* pueden generar un voltaje de circuito abierto (VCA) de 600 mV y una densidad de potencia (Pa) de 77 mW m^{-2} , con ARF como sustrato. Al caracterizar la CCM en pruebas de larga duración, se obtuvo una variación en su desempeño, con una Pa máxima (96.3 mW m^{-2}) a los 7 días de iniciada la medición. La variación en el desempeño se atribuyó al desarrollo de una biopelícula más estable y desarrollada, así como al aprovechamiento de algunos compuestos metabolizables por las bacterias presentes en el bioánodo.

Los resultados mostraron que AB7-f puede ser utilizado como electrocatalizador en bioánodos de CCMs que operen con ARF como sustrato, específicamente con *B. subtilis* como bacteria.

Abstract

In this work, activated biocarbons were synthesized from abundant and widely distributed wastes, and were used as electrocatalysts to develop bioanodes for microbial fuel cells (MFCs). Leather wastes were activated with KOH under heat treatment in an inert atmosphere, to obtain the electrocatalyst labeled as AB7. Poultry manure was activated with ZnCl₂ to produce the CG1 electrocatalyst. Afterwards, AB7 and CG1 were functionalized with methanol with the objective to increase their biocompatibility with the bacteria used in this work, producing the AB7-f and CG1-f electrocatalysts.

Biofilms of *Escherichia coli* (*E. coli*) and *Bacillus subtilis* (*B. subtilis*) were grown (separated) on the surface of the electrocatalysts deposited on a gas diffusion electrode. The morphology characterization showed that electrocatalysts synthesized from leather and poultry manure wastes were biocompatible with both bacteria. This way, bioanodes were fabricated and further evaluated in a three electrodes cell using pharmaceutical wastewater (PWW) as substrate.

The electrochemical measurements showed a higher performance of the bioanode based on AB7-f as electrocatalyst with *B. subtilis* biofilm, to oxidize organic matter from PWW, compared to the performance of AB7. On the other hand, CG1 and CG1-f, showed null electrochemical activity with neither biofilm. The polarization curves in the MFC showed that AB7-f + *B. subtilis* can generate an open circuit voltage of 602 mV and a power density of 77 mW m⁻² with PWW as the substrate. During long-term tests of the MFC, a variation in performance was observed, with a maximum of 96.3 mW m⁻² at day 7. Such variation was attributed to development of more stable biofilm as well as consumption of some compounds metabolized by bacteria grown on the bioanode.

The results showed that AB7 can be used as electrocatalyst in bioanodes for MFCs with PWW as substrate, specifically with *B. subtilis* as microorganism.

Introducción

El agotamiento de los combustibles fósiles y de las reservas de agua, así como la contaminación ambiental, han provocado la generación de enormes esfuerzos hacia formas alternativas de tratamiento y reutilización de las aguas residuales [2]. Actualmente, los procesos de tratamiento de aguas de desecho son generalmente intensivos en el uso de energía y presentan altos costos de inversión y de operación. Además, durante el tratamiento se genera una cantidad considerable de gases de efecto invernadero, como CO_2 , N_2O y otras sustancias volátiles, las cuales se liberan a la atmósfera. Por otro lado, los lodos producidos durante el tratamiento requieren espacio para su disposición [3].

En este contexto, las CCMs son una alternativa para el tratamiento biológico de aguas residuales, ya que son capaces de remover materia orgánica mientras generan energía eléctrica. Sin embargo, se debe reconocer que la capacidad de generación de energía de las CCMs es menor que la de otros tipos de celdas de combustible, por lo que es necesario su escalamiento. Por otro lado, uno de los aspectos más desafiantes para la puesta en operación de las CCMs, es la formación de biopelículas en el ánodo para promover las reacciones bioquímicas [4].

Las CCMs tienen varias ventajas durante la generación de energía: i) alta eficiencia de conversión, ya que puede recuperar hasta el 90% de los electrones transferidos; ii) seguridad y operación estable con respecto a otras fuentes de generación; iii) operación eficiente a temperatura ambiente; iv) energía sustentable; v) conversión eléctrica sin limitantes por el ciclo de Carnot, debido a la conversión directa en electricidad [5]. Sin embargo, el uso de metales nobles (Pd y Pt) en los electrodos eleva los costos de estos sistemas, lo cual ha limitado su desarrollo y producción a gran escala [6].

Ahora bien, el reto que presentan estos atractivos sistemas es el de generar electrodos de bajo costo y con altas eficiencias. El uso de ánodos basados en carbones obtenidos a partir de fuentes de biomasa es una alternativa sustentable y de bajo costo [7]. La biomasa no sólo se puede obtener de organismos vivos como plantas y animales, también se puede encontrar en abundantes desechos como el excremento de animales de granja, lodos y residuos forestales [8].

En este trabajo de investigación, se desarrollaron catalizadores (AB7, AB7-f, CG1 y CG1-f) utilizando biocarbones producidos a partir de residuos animales, los cuales fueron caracterizados fisicoquímicamente. Los catalizadores se depositaron en un soporte (electrodo a difusión de gas) para formar ánodos, y en la superficie de los ánodos se crecieron por separado biopelículas de las bacterias *E. coli* y *B. subtilis* para obtener bioánodos. La caracterización de actividad electroquímica de los bioánodos se realizó en media celda (tres electrodos) y en una CCM de doble cámara. Como sustrato se utilizó ARF. La integración de todos estos elementos dio como resultado un sistema bioelectroquímico en el cual se genera energía a partir de ARF con materiales de bajo costo.

Capítulo 1. Antecedentes y justificación

1.1 Abastecimiento de energía y agua: dos problemas urgentes de atender

Los combustibles fósiles han sido la base de la industrialización y el crecimiento económico a nivel mundial. Sin embargo, su agotamiento, así como la creciente preocupación ambiental (contaminación, emisión de gases de efecto invernadero y el aumento de la temperatura media global) han cambiado la percepción de que sean utilizados como fuente de energía primaria [6, 9].

En la actualidad, la demanda energética mundial es de alrededor de 14 TW y se estima que para el año 2050 se duplicará este valor. Esto equivale a 130,000 TWh o 10^{10} t de petróleo anuales. Debido a la gran cantidad de emisiones que se generarían, se ha propuesto que el incremento en la generación de energía debe de realizarse sin aumentar las emisiones de CO₂ provenientes de fuentes fósiles [10].

La bioenergía es una alternativa de energía renovable, la cual procede de fuentes biomásicas como la agricultura, residuos forestales, desechos, lodos residuales y cultivos energéticos. Tales fuentes se transforman en energía por diversos procesos [11]. Una de las tecnologías más promisorias en la generación de bioenergía son las CCMs, ya que actúan como biorreactores capaces de convertir la energía química de diferentes tipos de sustratos (aguas residuales, soluciones químicas o líquidos con contenido de nutrientes), en energía eléctrica por medio de microorganismos [12]. Los sistemas bioelectroquímicos están generalmente integrados por un ánodo donde ocurre la reacción de oxidación y un cátodo en el que se lleva a cabo la reacción de reducción de oxígeno (RRO). Al menos uno de ellos está catalizado por microorganismos, lo que los convierte en bioánodo o biocátodo [13].

El agua empleada en la agricultura representa aproximadamente el 70% del consumo de esta a nivel global. Existen algunas regiones del mundo en las que hay una limitada disponibilidad de agua con la calidad suficiente para ser utilizada en la agricultura o para consumo humano, esto se debe a la falta de tratamiento de las aguas residuales, así como a la escasez de fuentes de abastecimiento. Aunado a esto, el uso de aguas residuales domésticas e industriales para el riego de cultivos presenta efectos adversos por la cantidad

de contaminantes presentes y la alta cantidad de materia orgánica lo cual tiene como consecuencia el bloqueo de los poros del suelo, dañando severamente la calidad de este [14].

Actualmente los sistemas de tratamiento de aguas residuales aeróbicos son los más utilizados. Sin embargo, sólo permiten recuperar una pequeña porción de la energía contenida en las aguas residuales, principalmente en el tratamiento de los lodos residuales (producción de metano). La energía presente en la fracción orgánica disuelta no se recupera, en cambio sí se elimina por medio del proceso aerobio, el cual consume una gran cantidad de energía (mayor a la obtenida por la digestión de lodos) [15]

Dependiendo del tipo de tratamiento y la composición de las aguas residuales, se requieren entre 0.5 y 2.0 kWh m⁻³ para su tratamiento [16]. Se ha estimado que las aguas residuales contienen entre 3–10 veces la energía necesaria para tratarlas [16]. Esta energía se presenta principalmente en tres formas: i) materia orgánica (~1.79 kWh m⁻³); ii) nutrientes como nitrógeno y fósforo (~0.70 kWh m⁻³); y iii) energía térmica (~7 kWh m⁻³) [15]. Es decir, 26% de la energía contenida en el agua es química (materia orgánica, nitrógeno y fósforo). Esta energía se podría aprovechar empleando CCMs.

1.2 CCMs: una solución sustentable

Las CCMs son dispositivos que utilizan bacterias para oxidar materia orgánica e inorgánica contenida en aguas residuales y generar energía eléctrica [17]. El diseño y la configuración de las CCMs es importante, ya que puede limitar la generación de energía eléctrica. En general, las CCMs se clasifican en dos tipos: de cámara sencilla y de doble cámara. En las CCMs de doble cámara (Figura 1.1), los electrodos están inmersos en un medio líquido en dos cámaras separadas, el medio líquido puede variar dependiendo de la configuración deseada, lo que genera las condiciones para donar y aceptar electrones, respectivamente. Las cámaras se conectan por medio de una membrana de intercambio iónico o con menor frecuencia, a través de un puente salino para el intercambio de iones. Los sistemas de doble cámara están diseñados para ser efectivos en términos de generación de potencia, así como en el tratamiento de líquidos [1].

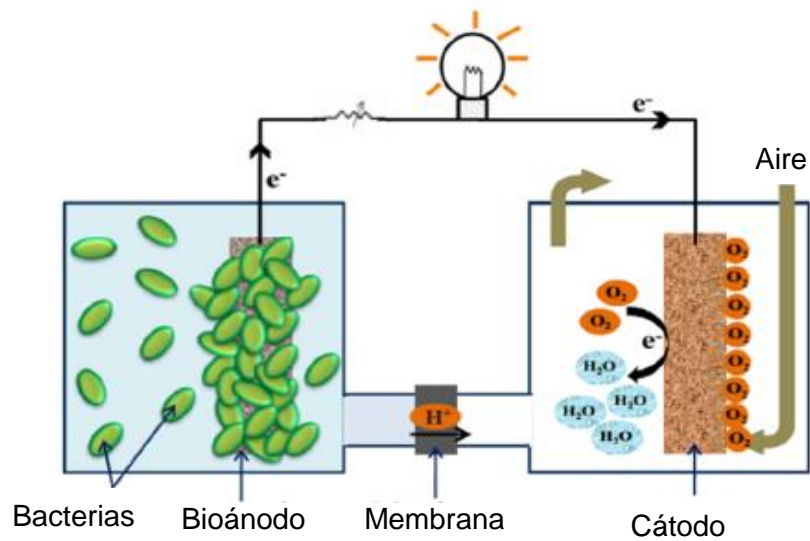


Figura 1.1. CCM de doble cámara en la que se indican los principales componentes [1].

El electrodo en la cámara anódica está compuesto por un soporte (tela de carbón con una capa de difusión básicamente de teflón) en el cual se deposita una capa catalítica que contiene un catalizador, para formar el ánodo. Sobre el ánodo, las bacterias desarrollan una biopelícula para obtener un bioánodo. Para la generación de electricidad, las bacterias en la biopelícula oxidan en condiciones anaerobias los compuestos presentes en el sustrato para generar electrones y transferirlos al catalizador, que a su vez mejora la cinética de la reacción para transportar dichos electrones a un circuito externo y a la cámara catódica, donde se reducen los aceptores (es decir, se lleva a cabo la reacción de reducción de oxígeno) [18].

Uno de los factores que más influencia tiene en la eficiencia de una CCM es la transferencia de electrones de la biopelícula al ánodo. Adicionalmente, se ha trabajado en el aumento de la cinética de transferencia de electrones a través de distintas maneras, como agregar mediadores de electrones, optimizar el diseño de la celda y con el uso de materiales carbonosos como catalizadores en el ánodo [19].

El fenómeno electroquímico que ocurre en el bioánodo cuando las bacterias tienen funciones electrocatalíticas se conoce como electrocatálisis microbiana, reduciendo la energía de activación de las reacciones que se llevan

a cabo en el bioánodo o incrementando la velocidad de la reacción, generando así un flujo de corriente (a un potencial dado) por la acción de las bacterias [19, 20].

Se ha encontrado que una estrategia para determinar los microorganismos que contribuyen a la generación de energía es identificar los ánodos en los que crecen selectivamente. Algunos ejemplos de esto son *Geobacteraceae*, *Gammaproteobacteria*, *Betaproteobacteria*, *Rhizobiales* o *Clostridia*. Sin embargo, en algunos estudios ha habido fallas en el control de los materiales utilizados en el ánodo, ya que no hay transferencia de electrones hacia el cátodo. Estas fallas han sido originadas por la falta de biocompatibilidad entre las bacterias empleadas y los materiales seleccionados como catalizadores [21].

Bajo ciertas circunstancias, diversas biopelículas llevan a cabo procesos metabólicos distintos a la transferencia de electrones a la superficie del ánodo, como la metanogénesis o la respiración. Por lo tanto, cuando compuestos orgánicos son utilizados como combustible, se esperaría que los microorganismos fermentadores de estos sustratos formaran parte de la comunidad microbiana del ánodo. Sin embargo, se ha demostrado que estos microorganismos pueden tener poca o nula capacidad para transferir electrones al ánodo, pero su metabolismo es clave para el funcionamiento de las CCMs [21]. Además, debido a las condiciones de anaerobiosis en la cámara anódica, puede haber fermentación, sin embargo, sólo si los electrones se transfieren al ánodo puede haber generación de electricidad [18]. Esto se puede lograr utilizando catalizadores en el ánodo.

El metabolismo anaerobio produce una menor cantidad de biomasa debido a la baja generación de adenosín trifosfato (ATP). Se estima que el rendimiento celular en los procesos de lodos activados es de alrededor de 0.4 a 0.8 g SSV g DBO₅⁻¹, mientras que la respiración anaerobia genera entre 0.035 y 0.13 g SSV g DBO₅⁻¹ [22]

Las CCMs se han utilizado con una gran variedad de sustratos. Entre ellos destacan los siguientes tipos de aguas residuales: domésticas, de procesamiento de leche, de producción de naranja, ácido 7, amarillo de alizarina y colorante azul reactivo 160, con contenido de p-fluoronitrobenceno, anilina, bifenilos policlorados, cromo hexavalente, cloranfenicol y de estiércol de vacas y

cerdos. También se han tratado residuos de hidrocarburos aromáticos policíclicos en sedimentos que contienen hexaclorobenzeno, y lixiviados [23-26].

Las ARFs son uno de los tipos de aguas residuales más difíciles de tratar. Estas aguas son recalcitrantes, se caracterizan por tener una composición compleja, alta toxicidad y una alta DQO. Contienen una enorme variedad de compuestos orgánicos e inorgánicos, los más importantes son aquellos que tienen una baja biodegradabilidad o inhiben a los sistemas de tratamiento convencionales. En CCMs, el tratamiento de estas aguas de desecho ha generado una densidad de potencia de hasta 205.61 mW m⁻² [27].

Se ha utilizado una amplia variedad de bacterias, desde cultivos puros hasta mezclas de cepas. En algunos casos los inóculos se extraen de lodos o aguas residuales. *Shewanella* y *Geobacter* son las BEAs más estudiadas [28].

E. coli ha sido utilizada en pruebas con distintos materiales en el ánodo (soportes y catalizadores) [29-31]. Sin embargo, en la mayoría de estas pruebas se han utilizado medios sintéticos como sustrato. En estudios en los que se utilizó alcohol de polivinilo (PVA) como agente aglutinante en el ánodo, se generó una densidad de potencia de 1631 mW m⁻², un valor 97% más alto que el obtenido empleando politetrafluoroetileno. Este aumento se atribuye al contenido de grupos oxigenados en el PVA, los cuales aumentan el carácter hidrófilico de este catalizador y por lo tanto su biocompatibilidad [32].

Se ha reportado que el uso de *E. coli* en CCMs en el tratamiento de agua sintética con almidón de papa, empleando una malla de Pt-Ti como soporte anódico, resultó en un 61% de remoción de DQO y la generación de una densidad de potencia máxima de 502 mW m⁻² [33].

Tao y colaboradores [34] propusieron el uso de una estructura polimérica tridimensional porosa con nanofibras, sintetizada a partir de polipirrol, alcohol polivinílico y polietileno de teraftalato en el ánodo de una CCM, con *E. coli* como bacteria formadora de biopelícula. Se utilizaron estos polímeros debido a sus propiedades catalíticas, estabilidad y biocompatibilidad. La densidad de potencia máxima obtenida fue de 2420 mW m⁻². Se utilizó un medio mineral con glucosa para desarrollar este experimento.

B. subtilis ha sido utilizada en agua con glicerol en bajas concentraciones, utilizando tela de carbón como soporte anódico para la biopelícula del

microorganismo en el ánodo. La densidad de potencia máxima obtenida fue de 600 mW m^{-2} [35].

Igualmente, en pruebas de degradación de 2,4-diclorofenol se ha empleado *B. subtilis*. La eficiencia de remoción de este compuesto alcanzó el 60 %. Sin embargo, aunque la densidad de potencia máxima obtenida fue de 9.5 mW m^{-2} , se mostró que *B. subtilis* podría ser una alternativa en el tratamiento de residuos peligrosos [36].

En el tratamiento de aguas residuales de granjas porcinas, se ha reportado que la eficiencia de remoción de DQO fue de 44% y la densidad de potencia máxima de 156 mW m^{-2} , empleando *B. subtilis*. Es necesario resaltar que en muchos de los trabajos realizados con *B. subtilis*, se han utilizado soluciones de glucosa como sustrato [37]. Por lo tanto, existen amplias posibilidades de explorar la utilización de esta bacteria en aguas residuales.

El bioánodo es quizás el elemento más importante en una CCM y es frecuentemente el principal factor limitante para conseguir una mayor eficiencia y generación de corriente. Los materiales del ánodo y su estructura pueden influenciar la fijación de la bacteria para formar la biopelícula, la oxidación del sustrato y la transferencia de electrones [38].

Los siguientes criterios se pueden tomar en cuenta para elegir los catalizadores más idóneos para el ánodo: alta superficie específica; mesoporosidad, alta conductividad eléctrica y térmica; estabilidad en ambientes corrosivos, durabilidad y disponibilidad; bajo costo; y excelente biocompatibilidad con el microorganismo [39].

En general, se han utilizado tres tipos de catalizadores para el desarrollo de bioánodos: i) basados en carbono; ii) basados en metales; y iii) materiales compuestos (carbono y metal). Los catalizadores basados en carbono son los más comúnmente utilizados en sistemas bioenergéticos, debido a su buena biocompatibilidad con diversos microorganismos y a su alta resistencia a la corrosión. Sin embargo, su conductividad eléctrica relativamente baja, así como su baja resistencia mecánica, han limitado su aplicación a gran escala [40].

De acuerdo con Santoro y colaboradores [41], los materiales a base de carbono que han sido utilizados como soportes en CCMs son, de acuerdo a su morfología: tela, cerdas, barras, mallas, velo, papel, fieltro, grafito granulado, cartón carbonizado, placas de grafito y carbón vítreo reticulado.

La biomasa es la única fuente de carbono neutral alternativa a los derivados de petróleo y a compuestos químicos. Esto se debe a su amplia disponibilidad y a la factibilidad económica que representa su producción. Los procesos termoquímicos de pirólisis y gasificación son tecnologías promisorias en la conversión de biomasa en combustibles renovables y materiales químicos [42].

En aplicaciones prácticas, especialmente al considerar costos, es interesante que algunas nanoestructuras de carbón 3D pueden ser fácilmente obtenidas de fuentes naturales. Este tipo de carbones se puede obtener de tallos de plantas, los cuales presentan macroporos ordenados e interconectados, con un tamaño de entre 20 y 60 μm [43]. Un ejemplo es la carbonización directa de cáscaras de toronja, de la cual se obtiene un carbón macroporoso reticulado con un tamaño de poro mayor a 100 μm [43]. La evaluación electroquímica muestra que ambos materiales alcanzan altas eficiencias de densidad de potencia (Pa) en CCMs. Recientemente, un carbón 3D dopado con nitrógeno elaborado con polianulina y esponja de luffa mostró una densidad de potencia volumétrica de alrededor 1090 mW m^{-3} [44].

Huggins y colaboradores [45] han desarrollado un biocarbón a partir de madera, el cual se utilizó como catalizador en un ánodo de una CCM. Se determinó que este catalizador tiene una superficie específica de 470 $\text{m}^2 \text{g}^{-1}$ y está constituido por mesoporos de 29.4 Å en promedio.

También se han evaluado biocarbones elaborados a partir de residuos forestales. Estos catalizadores mostraron resultados satisfactorios en CCMs al compararlos con carbones activados y grafito granulado, con la ventaja de reducir costos [45].

En el año 2015 [46], se reportó el uso de un biocarbón a base de excremento de pollos como bioestimulante en la remediación de suelos contaminados con cobre. Debido a su alta concentración de nutrientes promueve el crecimiento de microorganismos del suelo y, por lo tanto, la remoción de cobre.

De acuerdo con la composición mostrada en la Tabla 1.1, la gallinaza puede ser una buena fuente de heteroátomos como azufre y nitrógeno, los cuales se ha demostrado que aumentan la biocompatibilidad en la formación de biopelículas [47]. Contiene 4.98 % en peso (e.p.) de nitrógeno, por lo que resulta una alternativa interesante en la síntesis de biocarbones autodopados.

Tabla 1.1. Análisis químico proximal de gallinaza en base seca [48].

Elemento	Contenido (% e.p.)
Carbón	35.59
Hidrógeno	4.57
Nitrógeno	4.98
Azufre	1.45
Oxígeno	35.52
Cenizas	21.65

Por otro lado, Alonso-Lemus y colaboradores [49], llevaron a cabo la síntesis de AB7 a partir de cuero curtido, el cual tiene la característica de ser autodopado con nitrógeno. Los materiales dopados con nitrógeno han mostrado mejores características de biocompatibilidad con diversos microorganismos [47]. Además, el AB7 tiene un área específica superior a $2000 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$ y estructura mesoporosa. Se ha utilizado como electrocatalizador para la reacción de reducción de oxígeno, en donde se obtuvo una mayor densidad de corriente al compararlo con Pt/C comercial.

Los carbones activados a partir de biomasa se recomiendan para su aplicación en CCMs, ya que pueden ayudar a reducir los problemas de contaminación, además contribuyen a una menor generación de emisiones de carbono [50]. Algunos materiales con potencial para ser utilizados en la síntesis de carbones activados debido a su composición química, estructura y disponibilidad son: cáscaras de trigo, maíz y huevo, así como conchas de mar.

Muchas investigaciones se han enfocado a explorar la capacidad de estos sistemas para tratar aguas residuales [51-56]. Sin embargo, se requiere mayor investigación para incrementar la potencia generada por las CCMs y avanzar en su comercialización a mediana o gran escala [57].

1.3 Principales retos en el diseño de CCMs

De acuerdo con Rosenbaum y Franks [58], en las CCMs la transferencia de electrones representa uno de los principales retos, ya que la velocidad de generación de electrones está regulada por el metabolismo natural de los microorganismos, el cual tiene límites. Con excepción de *Shewanella oneidensis*

y *Geobacter sulfurreducens*, se conoce muy poco acerca del mecanismo de transferencia de electrones de otras bacterias.

Otro aspecto por considerar es la reducción de las pérdidas internas en las CCMs, que incluyen: pérdidas óhmicas, debidas a la resistencia eléctrica y iónica; sobrepotenciales de activación, originados por las barreras de transferencia electrónica de las bacterias a los electrodos; sobrepotenciales de concentración, ocasionados por la resistencia a la transferencia de masa; y pérdidas coulómbicas.

Kumar y colaboradores [59], proponen las siguientes consideraciones con respecto a las modificaciones en el ánodo en CCMs para mejorar su eficiencia: i) producir CCMs más verdes, utilizando materiales naturales como catalizadores; ii) analizar la influencia de la composición, textura y de las propiedades superficiales de los soportes y catalizadores en la fijación de microorganismos; iii) desarrollar técnicas de modificación de superficies como electrodos de gel y actuadores para promover las cargas positivas; iv) desarrollar catalizadores con un mayor número de sitios activos. Además, mezclar elementos químicos podría aumentar la transferencia de electrones.

Sin embargo, aunque tienen ciertas limitaciones, la contribución de las CCMs estará en la disminución de la energía consumida en el tratamiento de aguas residuales comparado con otros procesos. A pesar de la falta de entendimiento de los procesos biológicos que se llevan a cabo en las CCMs, estos dispositivos tendrán un rol importante en el tratamiento de aguas residuales de manera sustentable [22].

1.4 Justificación

El uso intensivo de combustibles fósiles en la vida diaria ha producido un aumento constante en la emisión de gases de efecto invernadero, lo cual afecta la calidad de vida de todos los seres vivos, ya que modifica las condiciones ambientales del planeta. La escasez de agua en algunas regiones del mundo es preocupante, de igual forma lo es la falta de tratamiento de las aguas residuales.

Es necesario trabajar en el desarrollo y mejora de tecnologías que promuevan la generación de energía limpia. Las CCMs son una alternativa muy atractiva, debido a su capacidad de generar energía y reducir contaminantes en aguas residuales. Sin embargo, existen algunas limitantes para su desarrollo, la

baja potencia en la generación de energía y los costos de los electrodos son algunos de los más importantes.

Aunque en la actualidad el uso de las CCMs no es rentable ni escalable, se están haciendo esfuerzos para reducir costos, principalmente en los materiales de los electrodos, ya que inicialmente se empleaban metales nobles, elevando el costo en gran medida. El uso de materiales carbonosos ha permitido reducir estos costos, sin embargo, no es suficiente, principalmente por la baja densidad de potencia generada.

Por otra parte, existe una gran cantidad de desechos de biomasa con propiedades que los hacen aprovechables como electrocatalizadores. El uso de biocarbones no ha sido explorado totalmente, por lo que se considera importante el desarrollo bioánodos en los cuales se puedan utilizar biocarbones para demostrar la versatilidad de estos materiales obtenidos a partir de residuos. Los materiales dopados con nitrógeno han demostrado buenas propiedades como ánodos en CCMs [44]. Los biocarbones que se utilizarán en este trabajo tienen propiedades electrocatalíticas, aunque nunca han sido evaluados en CCMs. Además, la puesta en marcha de un sistema con bioánodos elaborados a base de biomasa y dos cepas poco exploradas (*B. subtilis* y *E. coli*) en esta aplicación, representa una alternativa muy atractiva para su estudio, ya que de tener altos desempeños se podrían reducir costos en la elaboración de electrodos.

El trabajo que se desarrollará en el presente proyecto tiene como objetivo la generación de novedosos bioánodos que serán evaluados en una CCM. Se busca elevar el desempeño de este sistema para la generación de energía y la reducción de la DQO del agua residual que hará la función de sustrato. Para la obtención de biocarbones se utilizarán como materias primas desechos de cuero de la industria del calzado y excremento de gallina, los cuales son materiales muy abundantes y en la actualidad no son aprovechados al 100%, dándoles un valor agregado. Por lo tanto, en este trabajo se pretenden abordar varios problemas ambientales de interés, al reducir la cantidad de residuos provenientes de biomasa y utilizarlos como bioánodos, generando energía y reduciendo la carga de contaminantes del ARF. Además, de acuerdo con las referencias revisadas, los materiales propuestos para esta investigación no han sido utilizados en celdas de combustible microbianas. Por lo tanto, al tomar en

cuenta sus propiedades y la innovación que representa, se considera factible su uso.

Capítulo 2. Objetivos

2.1 Objetivo general

Evaluar las propiedades electroquímicas de bioánodos integrados por catalizadores a base de carbono y cepas microbianas que han sido poco exploradas para generar energía y tratar agua residual farmacéutica en CCMs.

2.2 Objetivos particulares

- Determinar la viabilidad del uso de biocarbones obtenidos a partir de desechos de cuero (AB7) y gallinaza (CG1) para su aplicación como catalizadores en CCMs.
- Estudiar la biocompatibilidad de los catalizadores con dos cepas que han sido poco exploradas como son *B. subtilis* y *E. coli*.
- Evaluar la actividad bioelectroquímica de bioánodos para oxidar materia orgánica de ARF en una CCM.
- Analizar la capacidad de los bioánodos para tratar el ARF en la CCM y generar bioenergía.

Capítulo 3. Metodología científica

3.1 Síntesis de biocarbones

3.1.1 AB7

Esta metodología está basada en la reportada por Alonso-Lemus y col. [49]. El cuero (CUE) utilizado en este trabajo proviene de talleres de elaboración de calzado, el cual ya se tenía en el laboratorio y no tuvo ningún tratamiento previo de acondicionamiento. Para iniciar, se limpió el cuero superficialmente con etanol (Jalmek, 96 %) y se obtuvieron piezas de 6 x 3 mm, aproximadamente. Las piezas se pirolizaron en atmósfera de N₂ (Infra, 99.99 %) en un horno tubular (Thermo Scientific, Thermolyne F1135), durante 90 min a 700 °C con una rampa de calentamiento de 10 °C min⁻¹. El carbón obtenido se mezcló con hojuelas de KOH (Fermont, 87.5 %), en una relación 2:1 e.p.; la mezcla se pulverizó en un mortero de ágata y se sometió a un tratamiento térmico en atmósfera de N₂ a 750 °C durante 90 min con una rampa de calentamiento de 8 °C min⁻¹. De este modo se obtuvo un biocarbón activado que se pulverizó en un mortero de ágata, se lavó con una solución de HCl (Sigma Aldrich, 37 %) 1 mol L⁻¹ hasta alcanzar un pH igual a 7 y se lavó con agua desionizada. El biocarbón neutro se filtró y se secó en un horno (Thermo Scientific, Heratherm OMS 100) a una temperatura de 80 °C durante 12 h.

3.1.2 CG1

Inicialmente la gallinaza (GAL) estaba mezclada con suelo y otros componentes, se secó y posteriormente se realizó la separación manual de la gallinaza, para la realización de este trabajo ya se contaba con la mezcla desuelo y gallinaza seca. Una vez separada la GAL se pulverizó en un mortero de ágata y se guardó en un recipiente hermético en un lugar libre de humedad. Para la síntesis de los biocarbones se pirolizó GAL en el mismo horno tubular bajo atmósfera de N₂ a 500 °C durante 90 min con una rampa de calentamiento de 5 °C min⁻¹. El carbón obtenido se pulverizó y se mezcló con ZnCl₂ en polvo (Sigma Aldrich, 98 %) en una relación 1:3 e.p. A la mezcla se añadió agua desionizada para obtener una solución en la que el ZnCl₂ representara el 30 % e.p. con respecto al agua. La mezcla se agitó durante 4 h a 60 °C, el sólido impregnado con ZnCl₂ se filtró y se sometió a un proceso de secado a 110 °C durante 12 h.

El biocarbón activado obtenido se pirolizó en atmósfera de N₂ a 900 °C durante 120 min, con una rampa de calentamiento de 5 °C min⁻¹. El carbón resultante se lavó con una solución de HCl 1 mol L⁻¹ hasta alcanzar un pH de 7, y se lavó con agua desionizada. El biocarbón neutro se filtró y secó a 110 °C durante 12 h.

3.2 Funcionalización de biocarbones

Los biocarbones AB7 y CG1 se modificaron mediante un tratamiento de funcionalización por microondas, con la finalidad de aumentar su biocompatibilidad con los microorganismos empleados.

La funcionalización se realizó de la siguiente manera: 300 mg del biocarbón se mezclaron con 30 mL de una solución de metanol (Sigma Aldrich, 99.8%) 0.15 mol L⁻¹, la solución se dispersó en un baño ultrasónico durante 30 min, para posteriormente ser agitada durante 1 h en placa magnética. La muestra se sometió a tratamiento térmico bajo agitación magnética y reflujo en un horno de microondas doméstico adaptado, aplicando pulsos de 25 s encendido y 15 s apagado durante 8 min. Al finalizar, el material se filtró en papel (Whatman, grado 42), se lavó con agua desionizada y se secó a 60 °C durante 12 h. La muestra seca se calcinó a 200 °C durante 30 min en una mufla (Thermo Scientific, Thermolyne FD1535M). A estos materiales se les denominó AB7-f y CG1-f.

La síntesis y funcionalización de cada uno de los biocarbones se realizó en varios lotes, los cuales se mezclaron y homogenizaron al finalizar cada uno de los procesos para su posterior caracterización.

3.3 Caracterización fisicoquímica de los biocarbones

3.3.1 Análisis de morfología por microscopía electrónica de barrido (MEB) y de composición química elemental por EDS

La morfología de los biocarbones se estudió en un Microscopio Electrónico de Barrido Philips XL 30 ESEM. Se realizó el análisis elemental de las muestras de CUE, GAL, AB7, AB7-F, CG1 y CG1-F en un espectrómetro de energía dispersiva de rayos X EDS acoplado al microscopio, el cual trabajó con un voltaje de aceleración de 20 kV. El análisis se realizó en cinco áreas de cada una de las muestras presentándose el promedio.

3.3.2 Difracción de rayos X de polvos

Para determinar la estructura cristalina de los biocarbones y de la materia prima se utilizó un equipo Bruker Phase D2, utilizando un generador de $\text{CuK}\alpha$ ($\lambda=1.54184 \text{ \AA}$) y un detector SSD 160. Los patrones de difracción se obtuvieron en un intervalo 2θ de 10 a 90° .

3.3.3 Espectrometría Raman

Los biocarbones se analizaron por espectrometría Raman utilizando un microscopio Raman Thermo Scientific DXR-RAMAN con una potencia de 0.3 mW, 5 s de exposición y 50 escaneos de 200 a 3500 cm^{-1} .

3.3.4 Análisis por FTIR

Para la determinación de los grupos funcionales en las muestras GAL, AB7, AB7-f, CG1 y CG1-f se empleó un equipo Bruker Tensor II con ATR, en un intervalo de 4000 a 500 cm^{-1} con una resolución de 4 cm^{-1} .

3.3.5 Análisis textural

Se utilizó un equipo ASAP 2050 (Micrometrics, EUA) para determinar las propiedades texturales de los catalizadores. Las muestras se activaron por 14 h a $220 \text{ }^\circ\text{C}$ con una tasa de calentamiento de $3 \text{ }^\circ\text{C min}^{-1}$. Se utilizó nitrógeno para realizar las mediciones.

3.4 Obtención de bioánodos

3.4.1 Preparación de ánodos (soporte con catalizador)

Se cortaron piezas del soporte (electrodo a difusión de gas, BASF) con área geométrica de $1 \times 2 \text{ cm}$. El área expuesta para el depósito de los biocarbones (1 cm^2) se delimitó con resina epóxica. En la parte posterior del soporte se pegó un alambre de cobre con 99 % de pureza, empleando tinta de plata, el cual sirvió de contacto eléctrico.

Los biocarbones (catalizadores) se depositaron sobre los soportes por separado formando una capa catalítica. Para ello, se prepararon tintas catalíticas con 5 mg de biocarbón (con y sin funcionalizar), $64 \text{ }\mu\text{L}$ de Nafion[®] 117 en solución (Aldrich, 5 % e.p.) y $64 \text{ }\mu\text{L}$ de 2-propanol (Sigma Aldrich, 99.5 %), las cuales fueron sometidas a agitación en un baño de ultrasonido (Elma, Elmasonic S30H) durante 30 min.

Los depósitos de los biocarbones se realizaron por goteo utilizando una micropipeta de 20 μL (Socorex, Acura 825), dejando secar la tinta entre cada aplicación para la formación de la capa catalítica. La carga catalítica (5 mg cm^{-2}) se aseguró pesando los soportes con la capa catalítica una vez secos y restando el peso del Nafion[®], el cual se determinó depositando 64 μL en un soporte.

3.4.2 Inoculación de bacterias

B. subtilis se obtuvo de la Colección Nacional de Cepas Microbianas y Cultivos Celulares del Cinvestav. La cepa de *E. coli* utilizada en este trabajo es derivada de ATCC 25922[™] y fue producida por Microbiologics[®].

En ambos casos, bajo condiciones estériles, se inocularon las cepas en matraces Erlenmeyer que contenían medio Luria Bertani (LB, Tabla 3.1) y se incubaron a 28 °C durante 5 días. Posteriormente, por medio de la técnica de siembra masiva se realizó la inoculación de placas Petri con agar LB, las cuales se incubaron a 35 °C durante 4 días. Después del periodo de incubación, se almacenaron en refrigeración a 4 °C. Las bacterias contenidas en las placas Petri han sido utilizadas en este trabajo de investigación.

Tabla 3.1. Composición del medio LB.

Elemento	Cantidad
Peptona de caseína	10 g
Extracto de levadura	5 g
Cloruro de sodio	10 g
Agua	1000 mL

3.4.3 Crecimiento de biopelículas

En dos matraces Erlenmeyer se prepararon 150 mL de caldo LB, esterilizado a 121 °C y 15 lb in⁻², durante 15 min, para su inocularlos por separado con *B. subtilis* y *E. coli*. Enseguida, los medios de cultivo se incubaron durante 3 días a 30 °C en una incubadora orbital (Vichi, INC-C), para ser almacenados.

Por separado, se inocularon *B. subtilis* y *E. coli* (previamente almacenados en refrigeración) en frascos de vidrio conteniendo 50 mL de caldo LB esterilizado. Esto se llevó a cabo en atmósfera estéril.

Los ánodos se colocaron en los frascos sujetándolos con los alambres de cobre en tapones de hule, de tal forma que al tapar los frascos quedaran sumergidos en el caldo LB. Con el fin de promover condiciones de anaerobiosis, se sellaron los tapones con Parafilm "M" (Bemis). Posteriormente se colocaron en una incubadora orbital durante 6 días a 30 °C, para el crecimiento de biopelículas y obtención de bioánodos.

3.5 Evaluación de actividad catalítica

3.5.1 Pruebas en media celda

Con el objetivo de impregnarlos, los ánodos y bioánodos se colocaron en frascos conteniendo ARF a temperatura ambiente por 18 h, a la cual se burbujeó N₂ durante 15 min para mantener las condiciones de anaerobiosis (Ver Sección 3.4). La impregnación tiene como fin que toda la superficie expuesta de los electrodos quede saturada al iniciar las pruebas electroquímicas.

Enseguida, ánodos y bioánodos se caracterizaron por voltamperometría cíclica en un montaje de tres electrodos conectados a un bipotenciostato (BioLogic SAS, VSP-300). Se utilizó como contraelectrodo un alambre de platino y como electrodo de referencia un electrodo de Ag/AgCl (NaCl 3 mol L⁻¹). Por su parte, como electrolito se utilizó ARF. Se empleó una ventana de potencial con respecto al electrodo Ag/AgCl (NaCl 3 mol L⁻¹) entre -0.70 y 0.45 V. En este documento, los resultados se presentan con respecto al electrodo reversible de hidrógeno (RHE).

Durante la caracterización, primero se realizó la activación de los biocarbones contenidos en la capa catalítica al realizar 40 ciclos en una ventana de potencial con respecto al electrodo Ag/AgCl entre -0.70 y 0.45 V, con una velocidad de barrido (v) de 50 mV s⁻¹. Enseguida, se obtuvieron los voltamperogramas cíclicos (VCs) de ánodos y bioánodos en el mismo intervalo de potencial, con $v= 20$ mV s⁻¹. Como comparación, se obtuvieron VCs del soporte solo, además de soportes con biopelículas de *B. subtilis* y *E. Coli* (sin biocarbones). Todas las pruebas se llevaron a cabo en atmósfera de N₂. En este documento, los potenciales se presentan con respecto al electrodo reversible de hidrógeno (RHE), convirtiendo el potencial del electrodo Ag/AgCl mediante la ecuación de Nernst (Ecuación 3.1). Se utilizó el valor del pH del ARF, el potencial del electrodo de referencia Ag/AgCl NaCl 3 mol L⁻¹ es de 0.209 V.

$$E = E^0 + 0.059 (\text{pH}) - E_{\text{Ag}/\text{AgCl}}$$

Ecuación 3.1

3.5.2 Pruebas en celda de combustible microbiana (CCM)

Se empleó una CCM de doble cámara (Figura 3.1), en la cual los compartimientos estaban separados por una membrana. Como bioánodo se utilizó el de mayor actividad catalítica en pruebas de media celda, el cual se colocó en la cámara anódica conteniendo un electrolito de 240 mL de ARF sin diluir, bajo atmósfera de N₂. Previo a su caracterización, se sometió al proceso de impregnación de 18 h, como ha sido descrito con anterioridad.

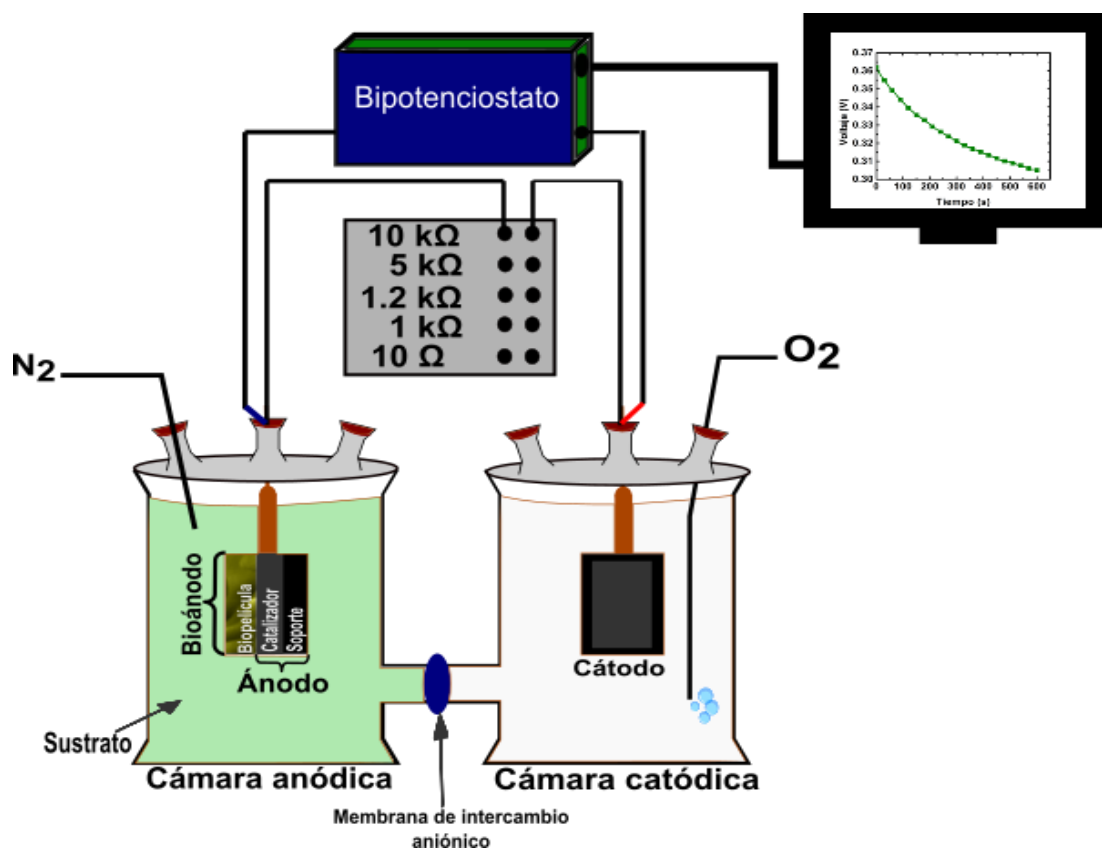


Figura 3.1. Esquema de la CCM empleada en los experimentos.

Por su parte, el cátodo se preparó al depositar en un electrodo a difusión de gas una capa catalítica, siguiendo el mismo procedimiento al descrito para la obtención de los ánodos. Como catalizador se empleó uno del tipo Pt/C comercial (E-Tek, 20:80 relación en peso metal:carbón). La carga de catalizador

fue de 2 mg cm^{-2} . El cátodo fue introducido a la cámara catódica conteniendo 240 mL de KOH con $\text{pH} = 9.7$, con burbujeo de O_2 .

Como membrana se utilizó Nafion® 117 (DuPont), 5 x 5 cm de área geométrica). Debido a que se trata de un polímero ácido, se sometió a un tratamiento con el objetivo de activarla y volverla conductora de aniones como sigue [60]: se colocó en H_2O_2 (10% v/v) a $60 \text{ }^\circ\text{C}$ por 1 h; se lavó con agua desionizada a punto de ebullición por 30 s; se introdujo en una solución de H_2SO_4 0.5 mol L^{-1} a $85 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 1 h; se lavó durante 5 min con agua a punto de ebullición; se colocó en una solución de KOH 6 mol L^{-1} a temperatura ambiente durante 19 h; finalmente se lavó tres veces con agua desionizada a punto de ebullición y se almacenó en un recipiente con agua desionizada a temperatura ambiente hasta su uso.

Para la obtención de las curvas de polarización, se conectaron las terminales del bipotenciostato y una celda dummy a los electrodos de la CCM (Figura 3.1). Primero se determinó el voltaje de circuito abierto (VCA), es decir, considerando una resistencia infinita (corriente $I=0$). Posteriormente, se determinaron los valores de voltaje de la celda (V) variando la resistencia R ($10 \text{ k}\Omega$, $5 \text{ k}\Omega$, $1.21 \text{ k}\Omega$, $1 \text{ k}\Omega$ y $10 \text{ }\Omega$) de la celda dummy. En cada medición, se dejó estabilizar el voltaje por 10 min antes de registrar su valor. Se obtuvieron curvas de polarización al inicio, día 1, día 7 y día 14.

En este documento se han presentado curvas de polarización V-j (densidad de corriente). Del mismo modo, se han elaborado curvas Pa (densidad de potencia)-j. Además, se ha determinado la Pv (densidad de potencia volumétrica). Para obtener los valores de j, Pa y Pv se utilizaron las ecuaciones mostradas en la Tabla 3.2.

Para evaluar el comportamiento del bioánodo en pruebas de larga duración, la CCM se polarizó aplicando una $R_{\text{ext}} = 10 \text{ k}\Omega$, durante 14 días. Este valor se obtuvo al graficar las curvas Pa-j y V-j: teniendo como base el máximo de densidad de potencia se determinó la densidad de corriente en ese punto, para establecer el voltaje correspondiente y enseguida la resistencia. En esta prueba, el voltaje se monitoreó cada 5 s con ayuda del bipotenciostato (Figura 3.1). Además, se obtuvieron curvas V-j en los días 1, 7 y 14.

Tabla 3.2. Ecuaciones empleadas para obtener distintos parámetros en la CCM.

Ecuación	Parámetro	Fórmula	Unidades
3.2	Densidad de corriente (j)	$j = \frac{(V)(1000)}{(R_{ext})(A)}$	mA m ⁻²
3.3	Densidad de potencia (Pa)	$P_a = \frac{(V)(I)(1000)}{(A)}$	mW m ⁻²
3.4	Densidad de potencia volumétrica (Pv)	$P_v = \frac{(V)(I)(1 \times 10^6)}{(vop)}$	mW m ⁻³

donde:

V: voltaje (V).

vop: volumen de ARF en la CCM (mL).

A: área geométrica del bioánodo (m²). I: corriente (A).

R_{ext}: resistencia externa (Ω).

3.5.3 Agua residual farmacéutica (ARF)

El ARF fue proporcionada por una empresa del ramo. Las muestras se colectaron en la planta de tratamiento de aguas residuales en recipientes de polietileno de 1 L, se colocaron en una hielera que contenía geles refrigerantes para disminuir la temperatura de las muestras y evitar reacciones no deseadas. Al llegar a las instalaciones del Cinvestav se determinó el pH y la conductividad. Las muestras se almacenaron en un congelador a -18 °C para conservarlas.

El análisis del ARF se realizó utilizando la metodología señalada en la Tabla 3.3. Cabe aclarar que debido a que el volumen de operación de CCM en la prueba de larga duración fue de 240 mL, no se pudo cumplir con los volúmenes mínimos requeridos por las normas utilizadas. Los análisis se realizaron en el Centro de Innovación Aplicada en Tecnologías Competitivas (CIATEC).

Tabla 3.3. Parámetros analizados en ARF.

Parámetro	Método de referencia
pH	NMX-AA-008-SCFI-2016
Conductividad	NMX-AA-093-SCFI-2000
Demanda Química de Oxígeno (DQO)	NMX-AA-030/2-SCFI-2011
Demanda Bioquímica de Oxígeno (DBO)	NMX-AA-028-SCFI 2001
Nitrógeno de nitratos (N-NO ₃)	NMX-AA-079-SCFI-2001
Fósforo total	NMX-AA-029-SCFI 2001
Ion sulfato (SO ₄ ²⁻)	NMX-AA-074-SCFI 2014
Alcalinidad total	NMX-AA-036-SCFI-2001
Cloruros	NMX-AA-073-SCFI-2001
Sólidos Disueltos Totales (SDT)	NMX-AA-034-SCFI-2015
Sólidos Suspendidos Totales (SST)	NMX-AA-034-SCFI-2015

Capítulo 4. Resultados y discusión

4.1 Rendimientos de síntesis

En la Tabla 4.1 se presenta la cantidad de cada uno de los biocarbones que se obtuvo de los procesos de síntesis y funcionalización, así como el rendimiento que se obtuvo partiendo de la materia prima seca.

Debido a que el rendimiento de la síntesis de biocarbones depende de la naturaleza de la materia prima, del tipo de proceso de síntesis, así como de las condiciones del mismo, se ha evaluado que en la producción de biocarbones por medio de pirólisis lenta se obtienen rendimientos de entre 35 – 50 % [61]. Sin embargo, este valor no toma en cuenta los procesos de activación. Se ha reportado [62] que para los biocarbones activados con KOH (AB7 y AB7-f) la obtención de rendimientos entre 10 y 40% es normal debido a la generación de porosidad y en el caso de los activados con ZnCl₂ (CG1 y CG1-f) los rendimientos son mayores. Por lo que se puede decir que los rendimientos obtenidos en este trabajo se encuentran dentro de los valores esperados.

Tabla 4.1. Producto y rendimiento de las síntesis efectuadas.

Biocarbón	Cantidad (g)	Rendimiento (%)
AB7	5.68	19.6
AB7-f	3.05	18.1
CG1	12.5	47.6
CG1-f	2.77	40.0

4.2 Propiedades fisicoquímicas de catalizadores

Análisis de composición química

Los resultados del análisis elemental por EDS de las materias primas (CUE, GAL) y de los biocarbones (AB7, AB7-f, CG1, CG1-f) se muestran en la Tabla 4.1. CUE tiene un contenido de C (76.25 % e.p.) menor que AB7 y AB7-f. Igualmente, tiene una mayor concentración de O que los catalizadores. Esto puede deberse principalmente a las reacciones que se efectúan durante los procesos de precarbonización y activación, en los cuales se libera agua, CO, CO₂ y H₂ [61]. CUE también tiene trazas de otros elementos.

Para AB7 y AB7-f el contenido de carbono es mayor al 90 % e.p. AB7 presenta trazas de Si y K, lo que puede deberse a la activación con KOH, donde se producen reacciones de gasificación. Además, la interacción entre el carbono y el KOH genera átomos metálicos de potasio, los cuales pudieron intercalarse en la estructura carbonosa [63]. En el caso de AB7-f no se detectó Si ni K, lo que puede atribuirse al tratamiento térmico por microondas durante el proceso de funcionalización, en el que se eleva la temperatura de la mezcla por encima de los 95°C. Los elementos en la estructura carbonosa pudieron liberarse o solubilizarse durante el lavado de la muestra en el proceso de filtración.

Tabla 4.2. Composición elemental de materias primas y biocarbones por EDS.

Material	Elemento													
	C	O	Si	N	S	P	K	Na	Ca	Mg	Al	Fe	Ti	Cl
	(% e. p.)													
CUE	76.25	18.40	0.13	-	3.57	-	-	0.82	0.43	0.40	-	-	-	-
AB7	89.52	7.47	0.13	2.42	0.16	-	0.13	-	-	0.17	-	-	-	-
AB7-f	89.88	7.58	-	2.33	0.07	-	-	-	-	0.14	-	-	-	-
GAL	51.16	27.28	8.41	3.33	0.22	0.86	2.79	0.89	0.81	0.28	1.77	1.13	-	1.07
CG1	57.37	18.44	13.51	1.70	0.03	0.44	1.96	0.84	0.57	0.29	2.98	1.39	0.35	0.12
CG1-f	58.94	18.46	12.72	1.65	0.06	0.46	1.84	0.71	0.56	0.25	2.82	1.14	0.30	0.07

Por su parte, GAL está compuesta de 13 elementos. De acuerdo con el análisis químico proximal de la gallinaza (Tabla 4.2), el carbono y el oxígeno son los elementos predominantes en su composición, lo que se confirma en los resultados de la Tabla 4.2. Al igual que en el caso de CUE, tiene un contenido de C menor (51.16 % e.p.) y uno de oxígeno mayor, que los biocarbones CG1 y CG1-f. Cabe resaltar que los biocarbones tienen los mismos elementos en su composición con excepción de Ti, siendo el carbono el principal (del orden de 58 % e.p.). Por su parte, la concentración de Si en los biocarbones CG1 y CG1-f, es de 13.51 y 12.72 (% e.p.), respectivamente. Este elemento también se encuentra en GAL, lo que puede deberse a la alimentación de las gallinas, al lugar en donde comen (suelo) o a que en algunas granjas avícolas se utilizan acaricidas que contienen SiO₂ [64], los cuales se mezclan con las heces de las gallinas. La solubilidad de Si se modifica por factores como pH, naturaleza del

elemento, estructura del biocarbón, así como por la temperatura. A altas temperaturas disminuye su solubilidad, por lo que se mantiene estable en la mezcla y permanece en los componentes del biocarbón [65].

Se ha determinado que la presencia de los heteroátomos S y N en carbones activados modifica sus propiedades electrónicas, lo que puede incrementar su biocompatibilidad [47]. Los resultados en la Tabla 7.1 indican que los biocarbones contienen S y N en pequeñas cantidades, lo cual podría generar una redistribución de cargas eléctricas para aplicación en CCMs. La disminución del contenido de heteroátomos en la síntesis de biocarbones (con respecto a CUE y GAL) puede deberse a su volatilización durante la etapa de precarbonización [61].

En la Figura 4.1, se observan los mapeos elementales de AB7 y AB7-f. En este caso se aprecia una distribución homogénea de los elementos analizados (C, O, Si, S y Mg). Lo cual indica que los elementos analizados están distribuidos uniformemente en todo el material carbonoso.

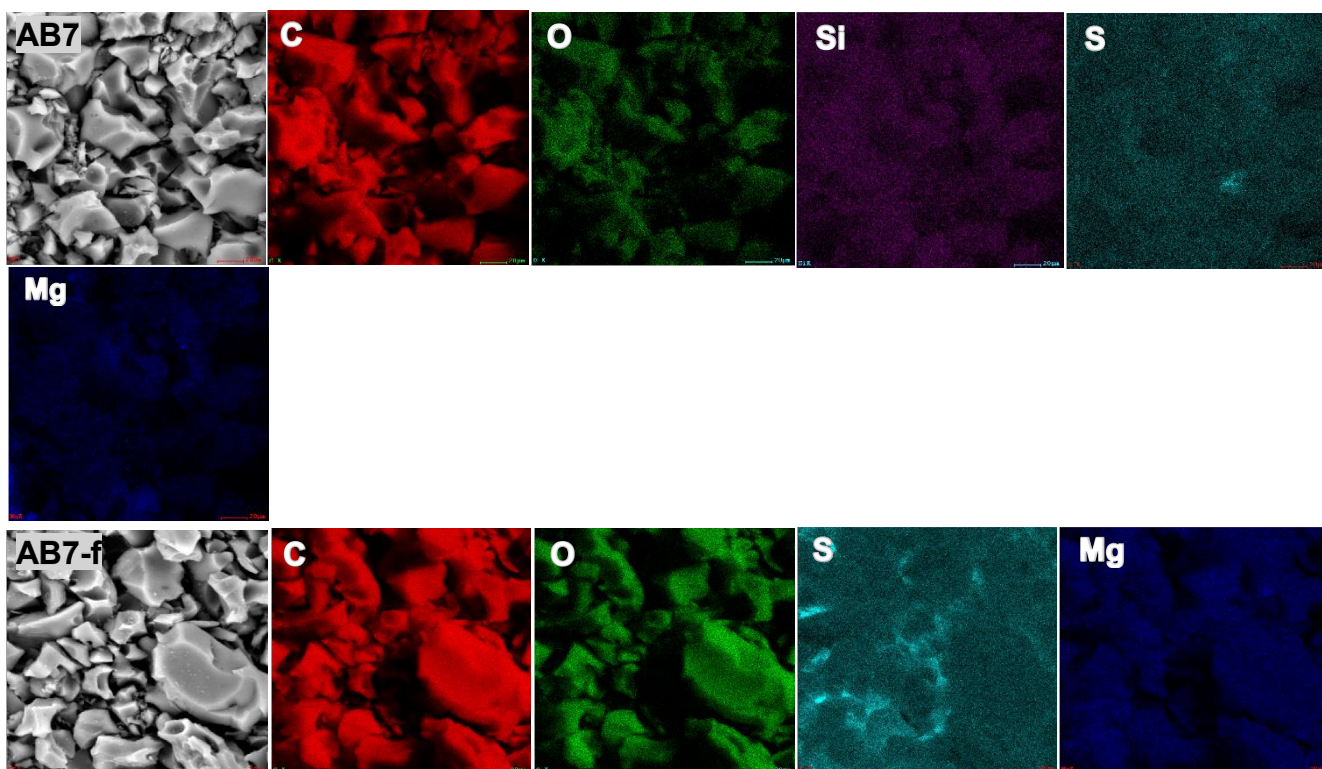


Figura 4.1. Mapeos elementales de AB7 y AB7-f.

En la Figura 4.2 se observan los mapeos de algunos elementos (C, O, Si, S, P, Al, Ca, Mg y K) que contienen los biocarbones CG1 y CG1-f, en ellos se

muestra el contenido químico de las partículas. Elementos como O, Si, S, Al, Mg y K se observan distribuidos homogéneamente en toda la muestra. Por otro lado, C, P y Ca se aprecian distribuidos en áreas específicas. Esta distribución se puede asociar con el tipo de compuestos presentes en las partículas analizadas. Si bien el carbono es el elemento con mayor concentración en estos biocarbones, al realizar los mapeos elementales se observa distribuido solamente en determinadas partículas. Por lo tanto, la distribución elemental no está completamente relacionada con la concentración.

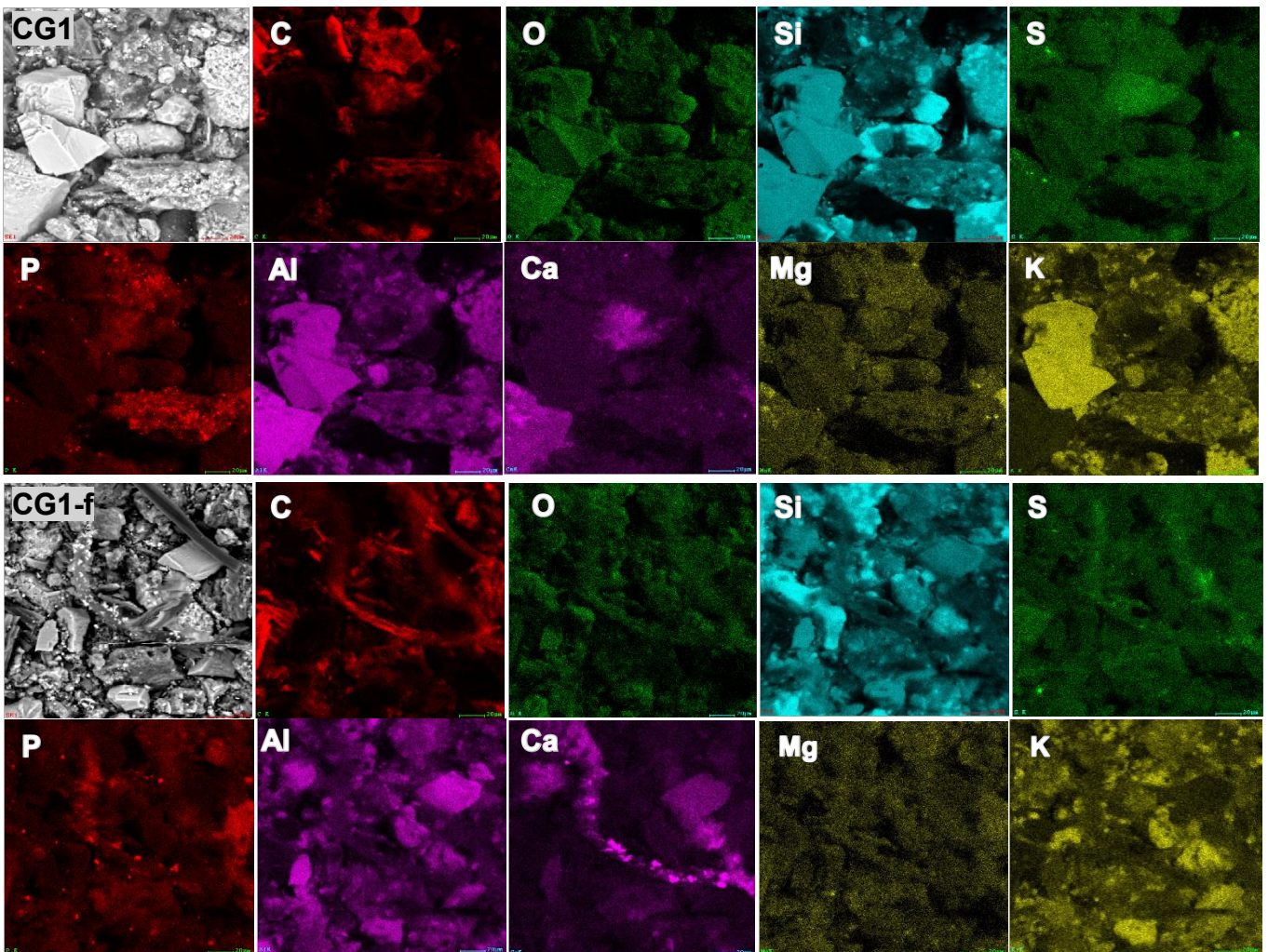


Figura 4.2. Mapeos elementales de CG1 y CG1-f.

Difracción de rayos X (DRX)

Los patrones de DRX de AB7 y AB7-f en la Figura 4.3, indican que tienen una estructura amorfa, ya que las reflexiones cristalinas del grafito que han sido identificadas a $2\theta=26.6^\circ$ y $2\theta=44.6^\circ$ en el difractograma, coinciden con señales

obtenidas que presentan una baja definición (muy anchas), lo que indica una baja grafitización de estos biocarbones y por lo tanto una estructura amorfa [66, 67], esto coincide con lo reportado para este material [68].

No se aprecia una diferencia notable en los patrones de DRX de AB7 y AB7-f, esto sugiere que el proceso de funcionalización no afecta su estructura.

No se obtuvo el patrón del cuero (CUE).

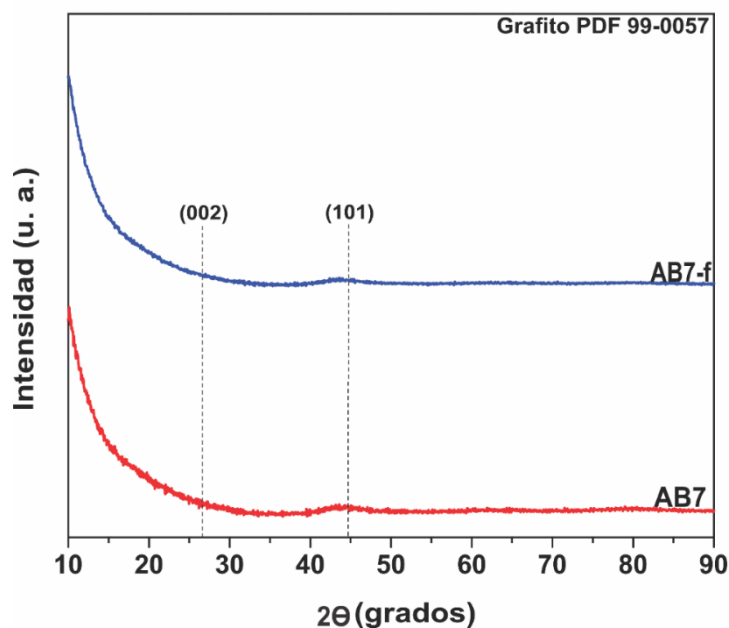


Figura 4.3. Patrones de DRX de AB7 y AB7-f.

Por otra parte, los patrones de DRX de los catalizadores CG1 y CG1-f se presentan en la Figura 4.4. Estos patrones evidencian la presencia de varios compuestos con estructura cristalina como cuarzo (COD 96-900-9687), sanidina (00-010-0353), calcita (COD 96-900-6553) y berlinita (COD 96-900-1299). Estos compuestos se encuentran presentes desde la materia prima (patrón de DRX de GAL), lo que indica que a pesar de la gallinaza fue sometida a un proceso de pirólisis y activación a 900 °C en atmósfera de N₂, estos compuestos no fueron removidos ni sufrieron transformación en sus fases. Por otro lado, se observa que hay una disminución en la intensidad de algunos picos identificados como sanidina, esto puede deberse principalmente a la heterogenicidad de la materia prima, ya que dicho material no se ve afectado por la temperatura de pirólisis ni es soluble en ácido clorhídrico.

Aunque estos catalizadores poseen una gran cantidad de carbono, se considera que la señal relacionada con el carbono gráfico a $2\theta = 26.6^\circ$ puede estar solapada con las del cuarzo, debido a que este compuesto es más cristalino. Más aún, el ensanchamiento en la base de la región localizada entre $25^\circ - 30^\circ 2\theta$, se puede atribuir a la presencia de carbono amorfo en la estructura de los biocarbones.

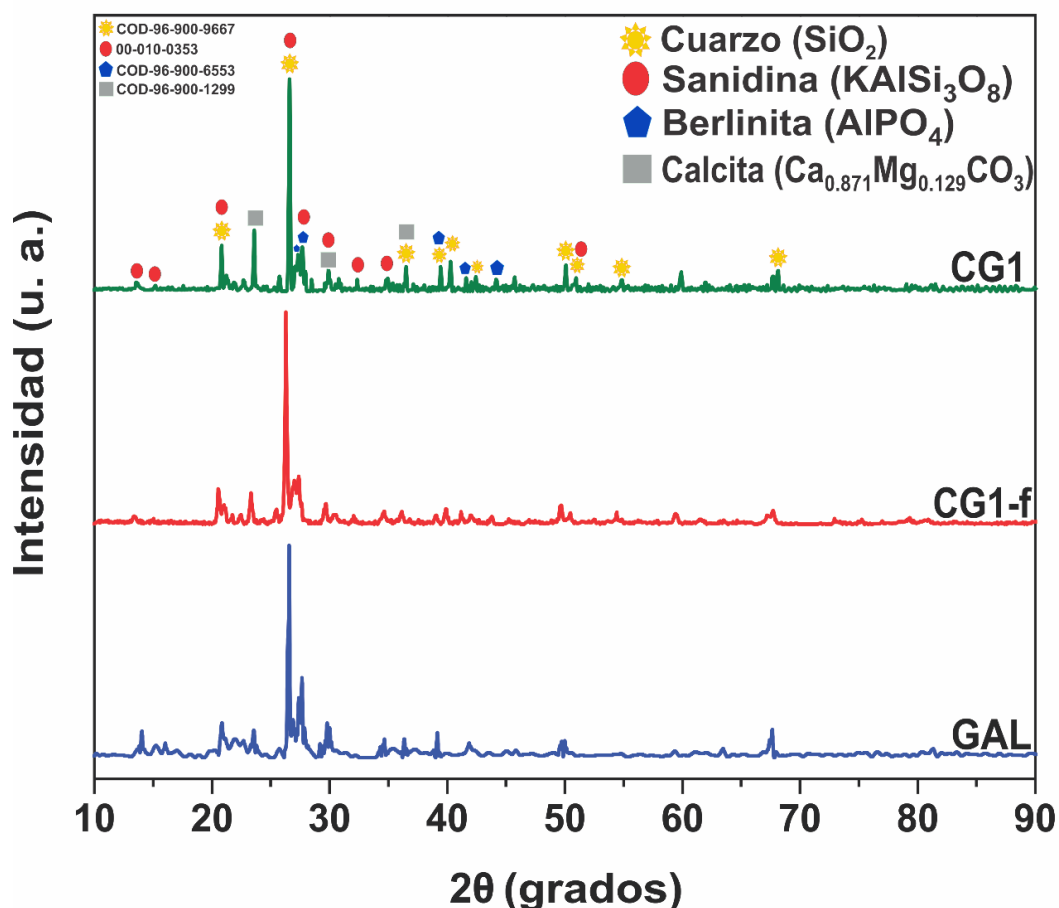


Figura 4.4. Patrones de DRX de: GAL, CG1 y CG1-f.

En este caso se confirma la presencia de los compuestos cristalinos antes mencionados en CG1 y CG1-f a través de los mapeos elementales (Figura 4.2), ya que las combinaciones de los elementos involucrados en esos compuestos (Si, O, K, Al, P, Ca y Mg) coinciden con su composición química

Espectroscopía Raman

En la Figura 4.5 se observan los espectros Raman de los biocarbones sintetizados, en los cuales se identifican la banda D (1325 cm^{-1}) relacionada con

la presencia de defectos o impurezas sp^3 en la estructura del carbón, mientras que la banda G (1600 cm^{-1}) se ha relacionado con una mayor organización, es decir con estructuras sp^2 con menos defectos y dobles enlaces [69] [70].

En todos los casos la banda D es más intensa que la banda G, con una relación de intensidad de ambas bandas (I_D/I_G) se obtuvieron valores cercanos a 1.40, lo que indica que se trata de estructuras con un mayor grado de desorden. Este resultado se relaciona con los patrones de las Figs. 4.3 y 4.4, en las cuales se aprecian señales de carbono amorfo. Sin embargo, se ha observado que en biocarbones activados la banda G puede estar más asociada con la presencia de compuestos policíclicos aromáticos en su estructura que a estructuras gráficas [71] [72] [73]. Esto es acorde con la naturaleza de estos catalizadores, ya que contienen una gran cantidad de compuestos orgánicos.

Por otro lado, los cambios en la relación I_D/I_G de los biocarbones funcionalizados con respecto a los no funcionalizado es muy ligero, por lo que podría considerarse que son similares [74] [75]. Sin embargo, el incremento en la relación I_D/I_G en AB7-f con respecto a AB7 puede deberse al tratamiento térmico al que fue sometido durante la funcionalización, lo cual pudo generar más desorden en la estructura de este biocarbón [70].

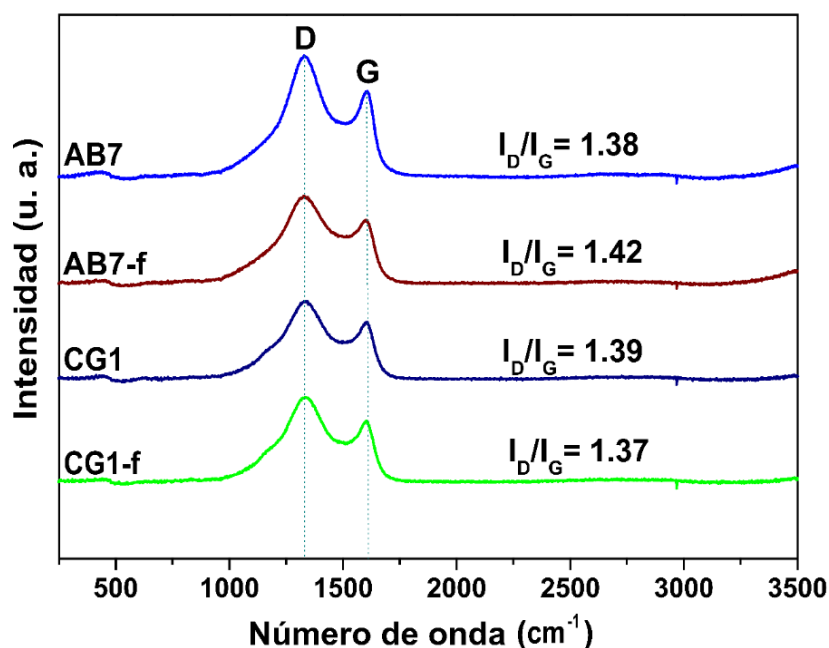


Figura 4.5. Espectros Raman de los biocarbones AB7, AB7-f, CG1 y CG1-f.

Espectrometría de infrarrojo con transformada de Fourier (FTIR)

En la Figura 4.6 se muestran los espectros de transmisión de GAL y los catalizadores. Es relevante señalar que la alimentación de las gallinas incluye granos y cereales, los cuales contienen una alta cantidad de carbohidratos [76], entre ellos la celulosa, la hemicelulosa y la lignina. Por lo tanto, la mayoría de las señales de IR de GAL se pueden deber a la transformación parcial de estos componentes en los procesos digestivos de las gallinas, ya que las bandas identificadas coinciden con lo reportado por Keiluweit y col. [77] para materiales biomásicos que contienen lignina, hemicelulosa y celulosa. Las bandas se identifican en la Tabla 4.3, donde la señal a 1030 cm^{-1} indica la presencia de carbono lignocelulósico.

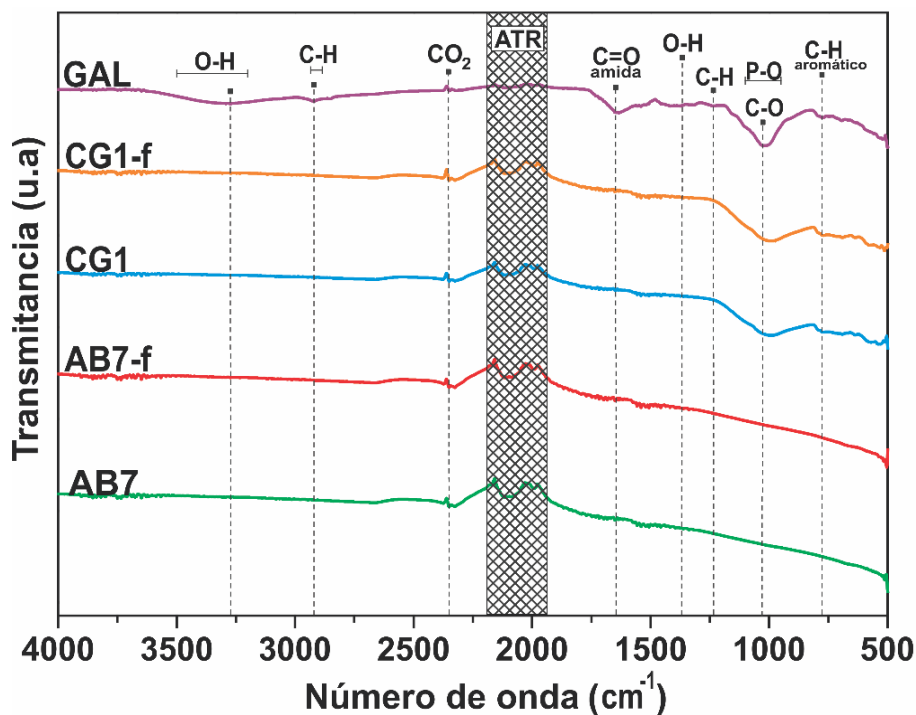


Figura 4.6. Espectros de FTIR de GAL y biocarbones.

En los espectros de CG1 y CG1-f se observan señales atribuidas a enlaces C-O (alrededor de 1030 cm^{-1}), C-H de compuestos aromáticos (alrededor de 770 cm^{-1}), vibraciones de C-H y O-H (1230 cm^{-1}), enlaces O-H fenólicos (1370 cm^{-1}), enlaces C-H (2920 cm^{-1}) y una banda relacionada con enlaces O-H ($3100 - 3500\text{ cm}^{-1}$). Igualmente, emerge una banda entre 890 y

1170 cm⁻¹, la cual se puede atribuir a presencia de componentes inorgánicos como sulfatos y silicatos, así como a enlaces P-O debido a la presencia de fósforo en estas muestras (Tabla 4.2 y presencia de AlPO₄, SiO₂ y KAlSi₃O₈ en la Figura 4.4). Al comparar los espectros de CG1 y CG1-f con el de GAL se puede observar que la mayoría de las especies identificadas en esta última no se encuentran presentes en los biocarbonos. Lo que indica que estas especies se volatilizaron en los tratamientos de carbonización y activación al incrementar la temperatura de síntesis de los biocarbonos (900 °C). Se ha reportado que a temperaturas superiores a 500 °C se descomponen los componentes relacionados con agua, sustituyentes oxigenados y carbonos alifáticos, manteniéndose las vibraciones de los enlaces C-H (750 – 885 cm⁻¹) [77].

Tabla 4.3. Vibraciones IR presentes en los materiales analizado.

Número de onda (cm ⁻¹)	Vibración característica	Funcionalidad	Referencia
3200 – 3500	O-H	Extensión del enlace O-H	[77]
2885 – 2935	C-H	Extensión del enlace C-H 2935 – asimétrico 2885 – simétrico	[77]
1645 - 1653	C=O	Extensión del enlace C=O de amidas	[77]
1370	O-H (fenol)	Flexión en el plano de O-H fenólico, ligado a material lignocelulósico.	[77]
1230	C-H y O-H	Extensión de C-H y deformación de OH de COOH	[78]
1030	C-O	Derivados ácidos, alifáticos C-O-C y O-H de grupos funcionales oxigenados de celulosa, hemicelulosa y grupos metoxi de ligninas.	[77]
970 - 1200	-	Componentes inorgánicos como sulfatos y silicatos (incrementan intensidad de bandas)	[78]
950 -1100	P-O	Extensión simétrica y asimétrica de de PO ₂ y P(OH) ₂ en fosfatos.	[78]
750 – 885	C-H	Deformación fuera del plano de C-H aromático	[77]

Por su parte, en el caso de AB7 y AB7-f no se identificaron grupos funcionales. Esto puede deberse a que los materiales carbonosos son absorbedores intrínsecos, por lo que pueden ser necesarias otras herramientas y técnicas de análisis (espectroscopía de reflectancia difusa o espectroscopía de fotoelectrones de rayos X) [71]. Cabe señalar que estos biocarbonos contienen alrededor de 90% de C (Tabla 4.2).

En todas las muestras se identificó una banda atribuible a CO₂, esta banda se originó debido a la alta sensibilidad del equipo al CO₂ presente en el lugar de medición.

Microscopía electrónica de barrido (MEB)

En las Figuras 4.7 a) y b), se presentan micrografías de CUE obtenidas por MEB previo a ser sometido a los tratamientos de carbonización y activación. De acuerdo con observaciones realizadas por otros autores [79], se infiere que lo observado es un material compuesto principalmente por fibras de colágeno de aproximadamente 50 nm de diámetro, lo cual es de esperarse ya que la piel de vacuno tiene un alto contenido de esta proteína.

Mientras tanto, en las Figuras 4.7 c) y d), se muestran micrografías de MEB del catalizador AB7. Con una morfología de partículas porosas de superficie rugosa y forma irregular en su mayoría superiores a 100 μm. En las Figuras 4.7 e) y f) se muestran imágenes del biocarbón AB7-f. Se observa que el tratamiento de funcionalización por microondas tuvo efecto reduciendo el tamaño de partícula a menos de 100 μm. Sin embargo, continúan teniendo una morfología irregular, porosa y de superficie rugosa.

La diferencia en morfología y porosidad entre CUE y los biocarbones se atribuye al tratamiento térmico y a la activación con KOH. Durante esta última, ocurren reacciones que producen gases CO_x, los que al liberarse provocan la porosidad observada en AB7 y en menor medida en AB7-f [71].

En las micrografías de las Figuras 4.8 a) y b), se observa la morfología de GAL, la cual es altamente heterogénea. Se pueden ver elementos que parecen ser fibras y otros componentes de forma irregular. Debido a la variedad en la alimentación de las gallinas este tipo de fuente de biomasa es muy heterogénea.

Las micrografías de las Figuras 4.8 c) y d) corresponden a CG1, el cual presenta una morfología heterogénea compuesta por partículas de tamaños y formas irregulares (ej. barras, láminas y partículas semiesféricas). Por su parte, las imágenes de MEB del catalizador CG1-f se muestran en las Figuras 4.8 e) y f). Se observa una morfología heterogénea, con partículas de forma irregular, de menor tamaño con respecto a CG1. En general, la morfología de CG1 y CG1-f sugiere que su porosidad es menor que la de AB7 y AB7-f.

Cabe comentar que, Si es un elemento presente en GAL, CG1 y CG1-f (Figura 4.4 y Tabla 4.2), por lo que algunas de las partículas observadas podrían

corresponder a estructuras de cuarzo, esto se puede identificar claramente en los mapeos elementales realizados (Figura 4.2).

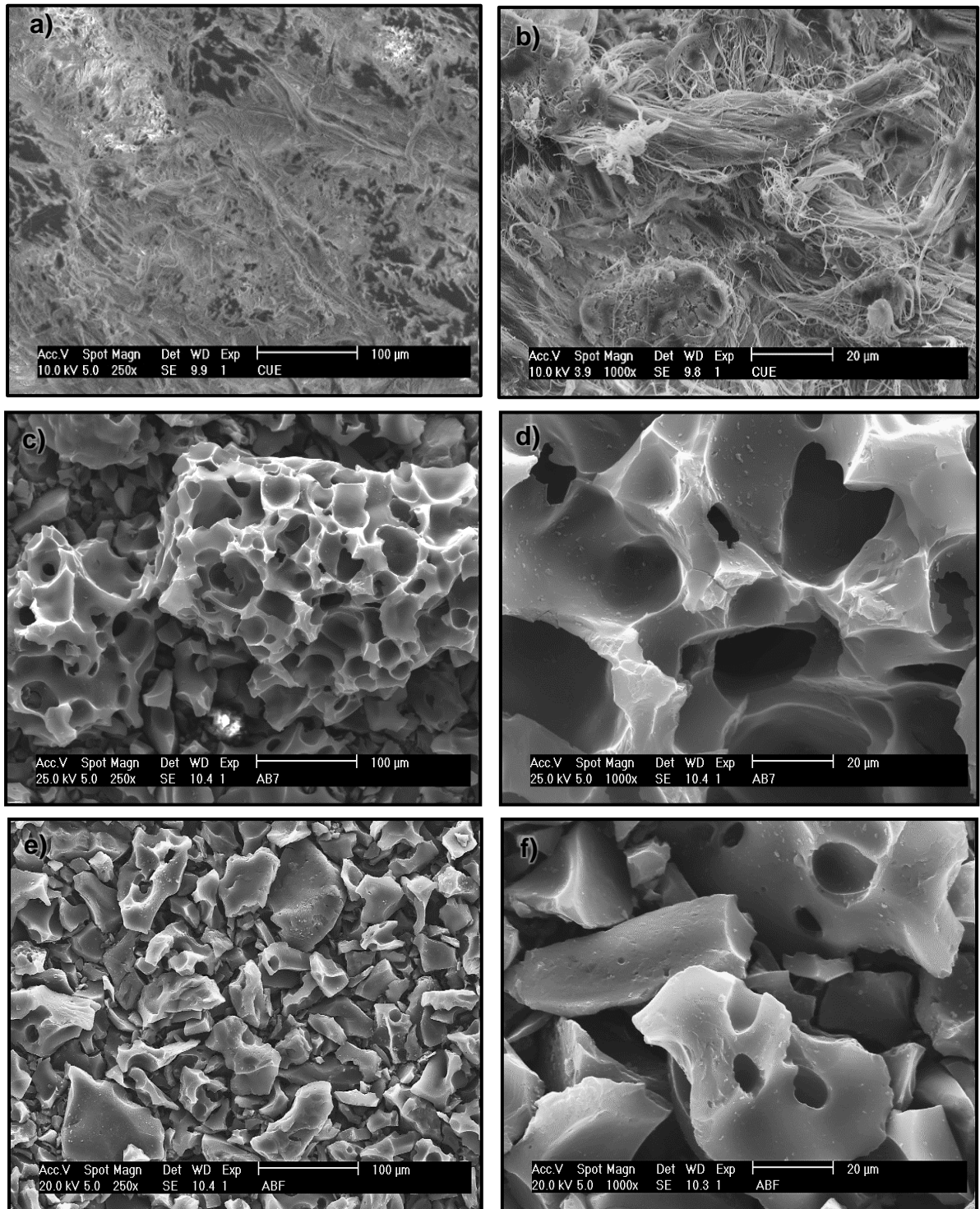


Figura 4.7. Imágenes de MEB de: a) y b) CUE; c) y d) AB7; e) y f) AB7-f.

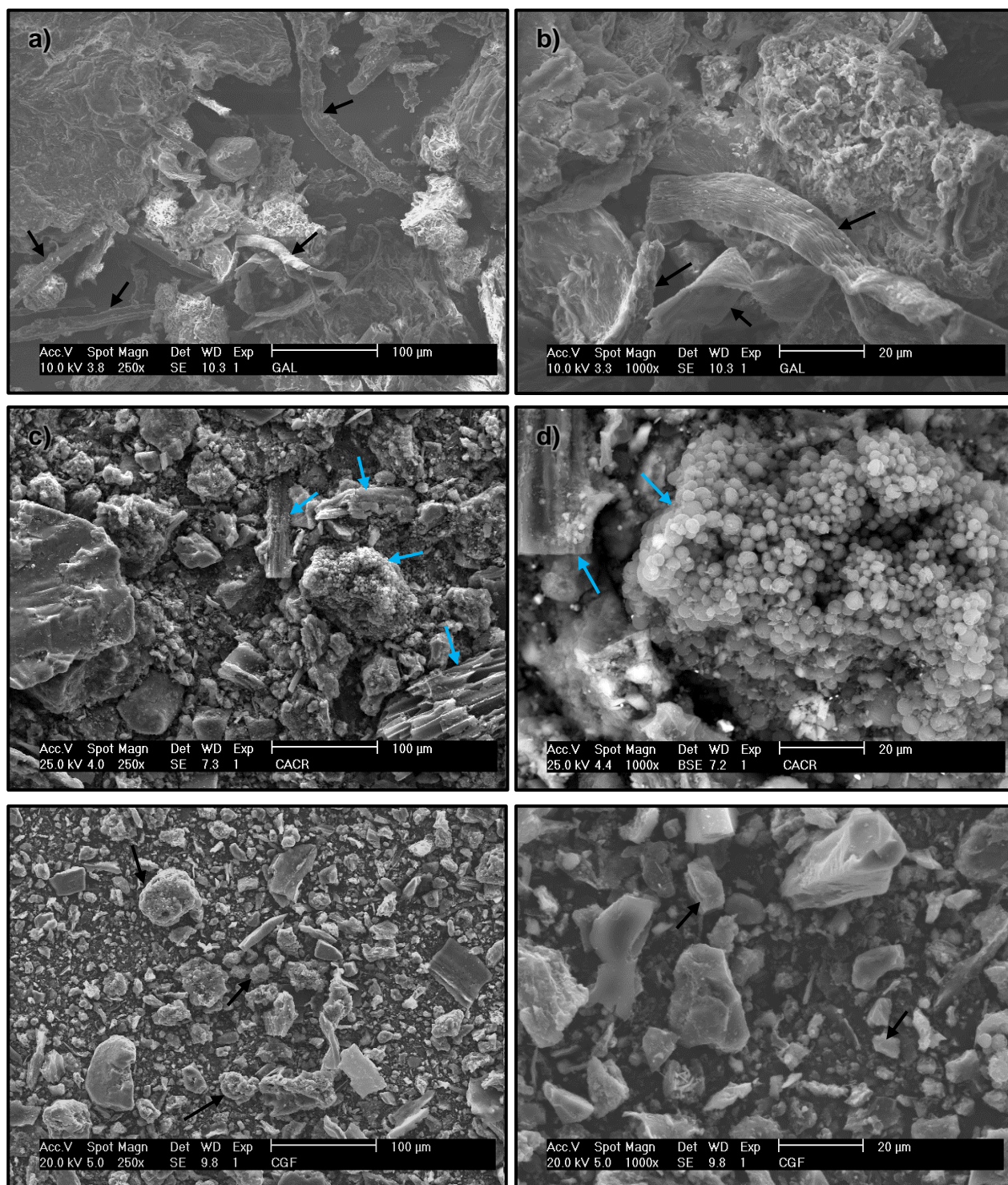


Figura 4.8. Imágenes de MEB de: a) y b) GAL; c) y d) CG1; e) y f) CG1-f.

Adsorción/desorción de N_2

En la Figura 4.9 se presentan las isotermas de adsorción/desorción de los 4 catalizadores. De acuerdo con la clasificación de la IUPAC [80], las isotermas de adsorción de los catalizadores AB7 (Fig. 4.9 a) y AB7-f (Fig. 4.9 b)) son de

tipo IV(a), que se generan cuando existen poros con un tamaño superior a 4 nm, lo cual indica que la adsorción tiene lugar en la mesoporosidad. Ambas isothermas presentan histéresis, fenómeno que ocurre cuando el mecanismo de llenado de los poros por condensación capilar difiere del vaciado de los mismos, es decir, las isothermas de adsorción y desorción son no colineares [71]. Estas isothermas tienen un ciclo de histéresis H4, indicando el llenado de microporos. Este tipo de ciclos son comunes en carbones micro-mesoporosos.

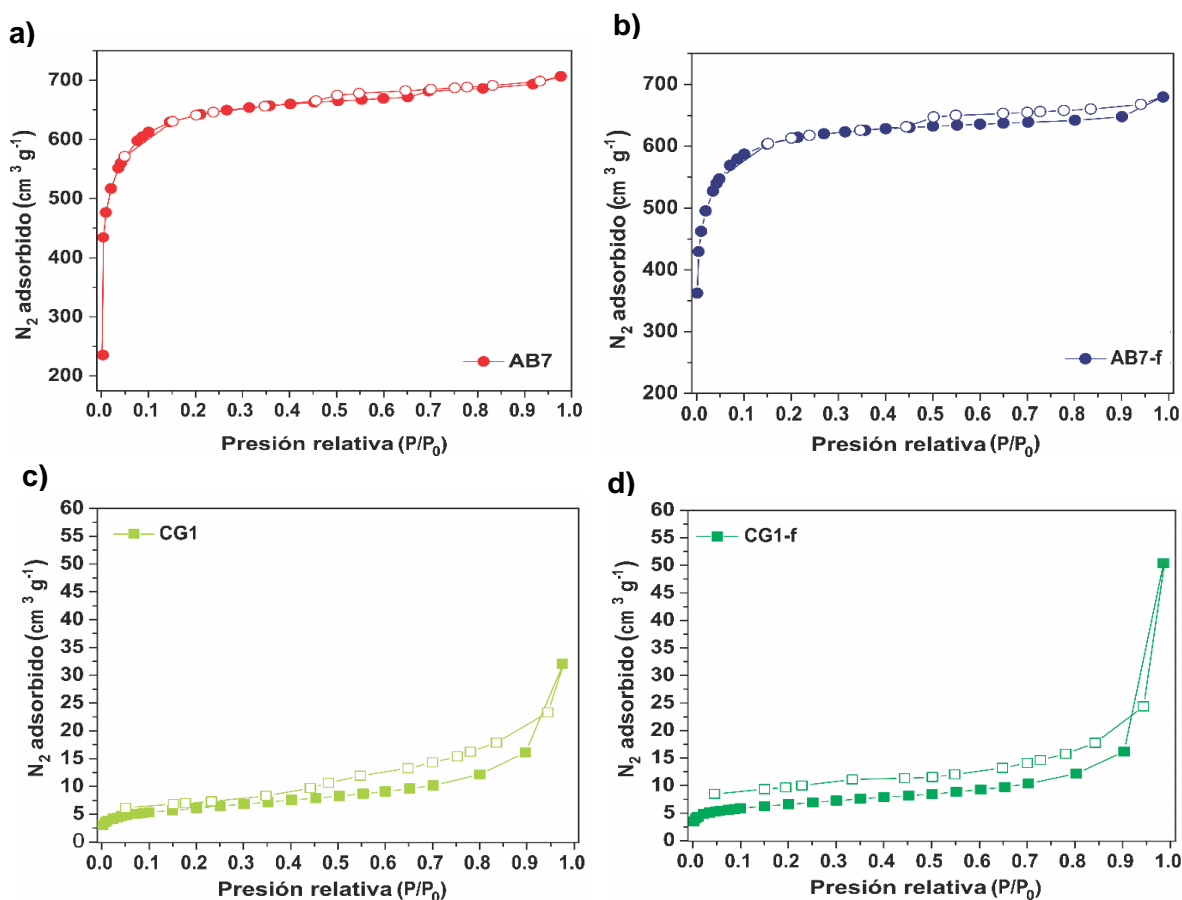


Figura 4.9. Isothermas de adsorción/desorción de: a) AB7, b) AB7-f, c) CG1 y d) CG1-f.

Por otra parte, en las Figuras 4.9 c) y d) se presentan las isothermas de adsorción/desorción de CG1 y CG1-f. De acuerdo con la clasificación de la IUPAC [80], las isothermas de estos catalizadores son de tipo II, ya que presentan puntos de inflexión en la regiones $P/P_0 > 0.1$ y de $P/P_0 > 0.9$ [71]. Tal comportamiento es característico de adsorción en microporos y poros abiertos con formación de multicapa, también pueden describir la adsorción en

microporos. CG1 y CG1-f son catalizadores de morfología altamente heterogénea las cuales podrían ser poros abiertos o con microporos.

CG1 presenta un ciclo de histéresis de tipo H5, el cual está relacionado con mesoporos abiertos y parcialmente bloqueados [80]. En el caso de CG1-f el ciclo de histéresis está abierto, a bajas relaciones de P/P_0 , lo que se atribuye con un cambio en el volumen del adsorbente, es decir, algunas moléculas del adsorbato pueden estar atrapadas en los poros o puede existir el fenómeno de quimisorción [81]. Las diferencias entre CG1 y CG1-f podrían atribuirse a la funcionalización realizada, aunque se requerirían hacer más estudios para confirmarlo.

En la Tabla 4.4 se presentan los valores de área específica (S_{BET}), así como el tamaño de poro determinado por el método de Barret-Joyner-Halenda (BJH) de los catalizadores. AB7 y AB7-f tienen S_{BET} de 1984.2 y 1890.5 $m^2 g^{-1}$, respectivamente. Este valor puede relacionarse con el contenido de C (cerca a 90% e.p., Tabla 4.2) de estos biocarbones. Por su parte, el tamaño de poro es de 4.4 y 5.5 nm para AB7 y AB7-f, respectivamente, por lo que pueden clasificarse como carbones mesoporosos. Estos resultados coinciden con los reportados por Alonso-Lemus y col [68] para biocarbones obtenidos de CUE.

Cuando la activación se realiza con KOH como lo es el caso de AB7 y AB7-f, existe una mayor tendencia a formar microporos con respecto a los carbones activados con $ZnCl_2$ [62], el carbón obtenido experimenta una reducción del tamaño de partícula debido a las reacciones de oxidación y gasificación producidas por este compuesto, generando CO_x , lo cual genera porosidad [71].

Mientras tanto, CG1 y CG1-f tienen valor de S_{BET} significativamente menores (Tabla 4.4). De acuerdo con el análisis de composición elemental (Tabla 4.2), CG1 y CG1-f tiene alrededor de 60% e.p. de C, además de una gran cantidad de otros elementos. Estas características pudieron haber tenido un efecto en el S_{BET} , así como en el tamaño de poro (Tabla 4.4). Los valores de S_{BET} de CG1 y CG1-f son bajos al compararse con los 50.9 $m^2 g^{-1}$ [78] determinados para un biocarbón obtenido sin agente activante. Más aún, para otros carbones activados elaborados a partir de gallinaza se han reportado valores de S_{BET} de 334.7 $m^2 g^{-1}$ [82] y 486 $m^2 g^{-1}$ [83]. Por lo tanto, independientemente del procedimiento utilizado para la síntesis de biocarbones, el área específica de

CG1 y CG1-f es baja. Esto se puede atribuir a un bajo efecto del agente activante en la síntesis del catalizador.

Por otro lado, el tamaño de poro determinado para AB7, AB7-f, CG1 y CG1-f indica que se trata de carbones mesoporosos, de acuerdo con la clasificación de la IUPAC (2 – 50 nm para este tipo de estructuras) [84]

Tabla 4.4. Propiedades texturales de AB7, AB7-f, CG1 y CG1-f.

Catalizador	S_{BET} ($\text{m}^2 \text{g}^{-1}$)	Tamaño de poro (nm)
AB7	1984.2	4.4
AB7-f	1890.5	5.5
CG1	21.1	12.6
CG1-f	22.4	20.2

4.3 Análisis de morfología de ánodos y bioánodos

En la Figura 4.10 se observan dos imágenes del soporte sin catalizador ni biopelícula: a) Electrodo a difusión de gas y b) micrografía de MEB a 5000x. La morfología es rugosa, debido a que se trata de una tela de carbón con una capa de difusión de politetrafluoroetileno (PTFE) que recubre las fibras de la tela de carbón.

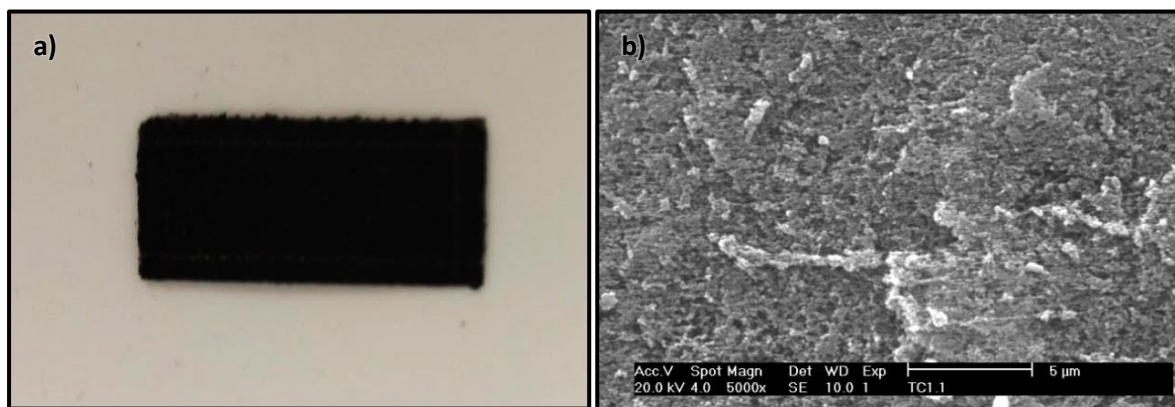


Figura 4.10. Imágenes del soporte sin catalizador, a) Electrodo a difusión de gas; b) Micrografía de MEB a 5000x.

En la Figura 4.11 se observan micrografías de MEB de los ánodos conteniendo capa catalítica de los biocarbones AB7, AB7-f, CG1 y CG1-f. Se pueden apreciar las diferencias morfológicas con respecto al soporte (Figura 4.10 b)), ya que en todos los casos la superficie del soporte ha sido recubierta

completamente por cada uno de los catalizadores. Lo anterior basado en que la morfología de los ánodos coincide con la morfología de sus respectivos catalizadores (Figuras 4.7 y 4.8) sin encontrar zonas en donde se aprecie el soporte. Esto indica que por el método de deposición de catalizadores por medio de goteo se obtienen ánodos con un buen recubrimiento.

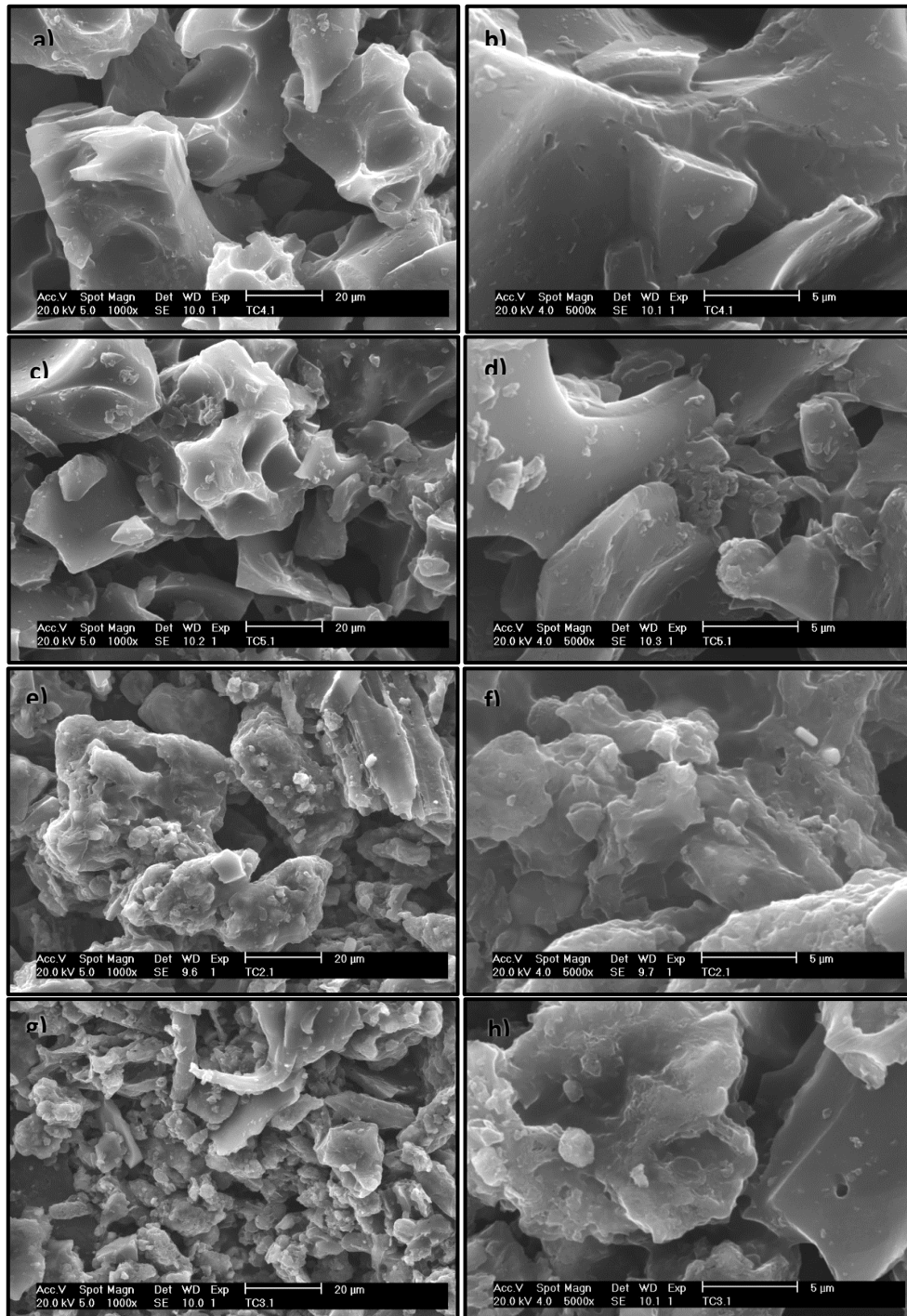


Figura 4.11. Micrografías de MEB con: a) y b) AB7; c) y d) AB7-f; e) y f) CG1; g) y h) CG1-f.

En la Figura 4.12 se muestran las micrografías de los bioánodos con los catalizadores a-b) AB7 y c-d) AB7-f con biopelícula de *E. coli*. En las imágenes a) y c) se puede apreciar la morfología con forma irregular de los catalizadores depositados en los soportes. Al compararlos con los ánodos de la Figura 4.11 se puede ver que los bioánodos tienen una textura suavizada, aparentemente debida a un recubrimiento por polisacáridos excretados por las bacterias, ya que el crecimiento de biopelícula puede incluir la formación y excreción de polisacáridos por las bacterias [85].

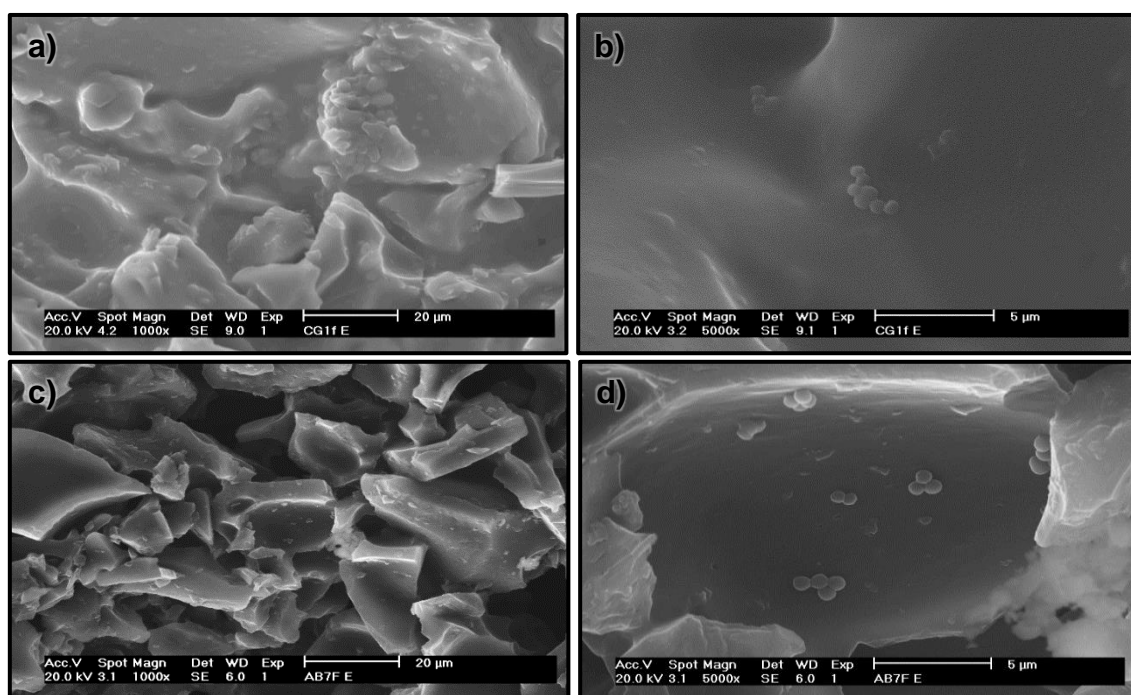


Figura 4.12. Micrografías de MEB de bioánodos conteniendo: a) y b) AB7 + *E. coli*; c) y d) AB7-f + *E. coli*.

Las micrografías de las Figuras 4.12 b) y d) muestran zonas ampliadas de los bioánodos (Figura 4.12 a) y c)), en las cuales se observan conjuntos de bacterias en la superficie del catalizador. Tales bacterias tienen una forma cuasi-esférica, lo que puede indicar que se encuentran en una etapa temprana de desarrollo, ya que la morfología característica de *E. coli* es la de bacilos (de menor tamaño que los de *B. subtilis*). A pesar de la presencia de estas bacterias, no se ha podido establecer el crecimiento homogéneo de biopelícula en toda la superficie de la capa catalítica, así como tampoco su espesor. Debido a ello, no ha sido posible determinar un mecanismo de crecimiento de *E. coli* sobre los biocarbones AB7.

En la Figura 4.13 se observan las micrografías de bioánodos conteniendo capa catalítica de a-b) AB7-f, c-d) CG1, e-f) CG1-f con biopelícula de *B. subtilis*. La morfología es más suave con relación a los ánodos (Figura 4.11), lo que puede atribuirse a los polisacáridos excretados durante la formación de biopelícula (similar a la Figura 4.12) [85]. Sin embargo, con *B. subtilis* se observa un mayor desarrollo de la biopelícula. En las micrografías b, d y f) se pueden observar bacilos alargados característicos de *B. subtilis* en la superficie de los catalizadores. Al utilizar el biocarbón CG1-f como catalizador se tiene una superficie colonizada casi en su totalidad, con una matriz de bacilos, lo que demuestra la formación de una biopelícula (Figura 4.13 f).

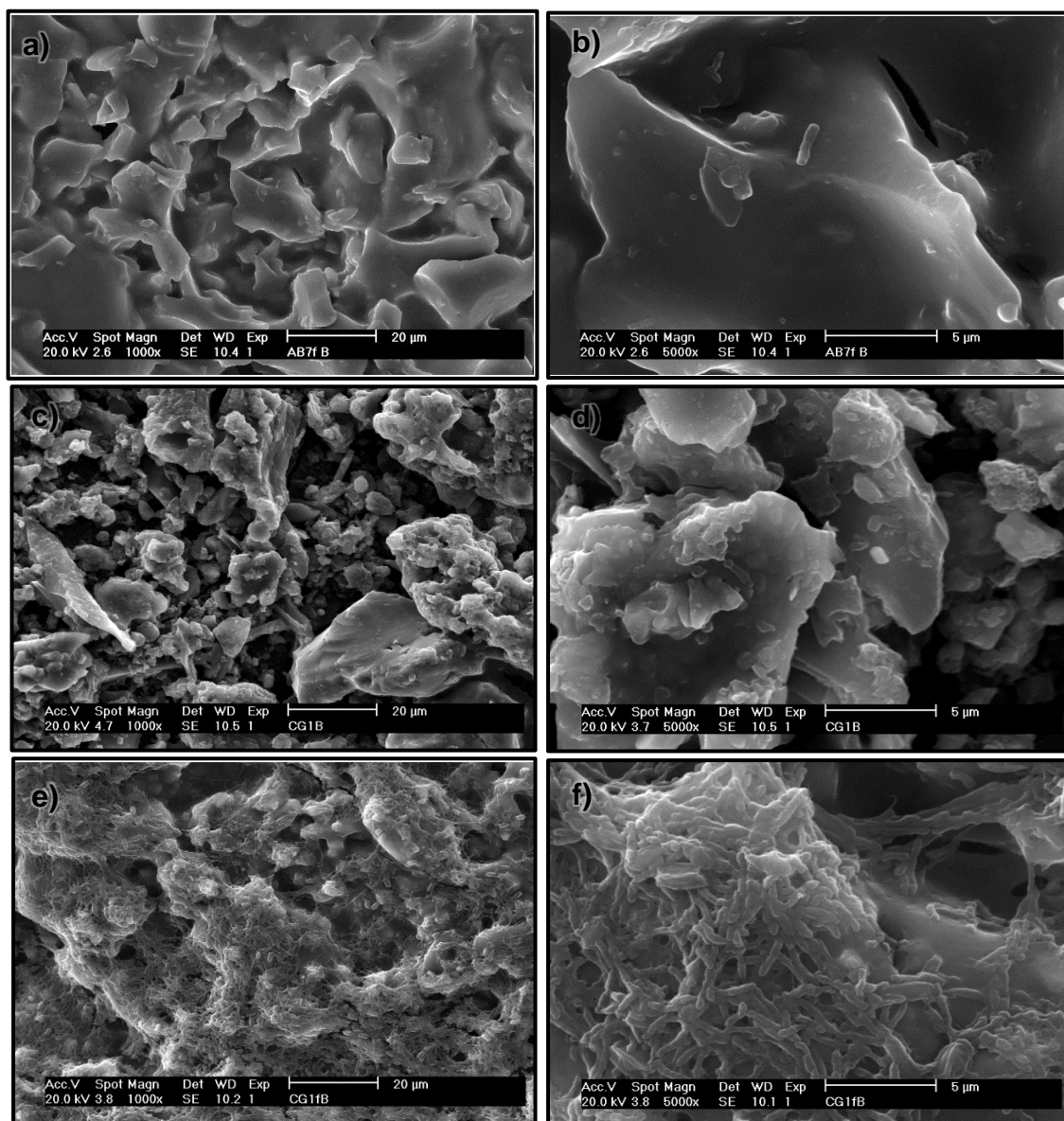


Figura 4.13. Micrografías de MEB de bioánodos conteniendo: a) y b) AB7-f + *B. subtilis*; c) y d) CG1 + *B. subtilis*; e) y f) CG1-f + *B. subtilis*.

La morfología observada en las micrografías de las Figuras 4.12 y 4.13 sugiere un mayor crecimiento de biopelícula de *B. subtilis* sobre los biocarbones comparada con *E. coli*. Este crecimiento aparentemente es más notable sobre CG1 y CG1-f, lo que puede deberse en parte a las características de composición química y texturales de estos últimos. Sin embargo, adicionalmente al análisis morfológico, debe evaluarse la actividad electroquímica de los bioánodos para determinar su posible aplicación en CCMs.

4.4 Caracterización de actividad catalítica en media celda

En la Figura 4.14, se muestran los VCs de: soporte (S, electrodo sin capa catalítica ni biopelícula), soporte con biopelícula de *E. coli* (S + *E. coli*), y soporte con biopelícula de *B. subtilis* (S + *B. subtilis*). El electrolito es agua residual farmacéutica (ARF) saturada con N_2 . En general, el comportamiento electroquímico de los soportes sin y con biopelícula es muy similar. No se observa ningún par redox que indique actividad electroquímica con la materia orgánica presente en el electrolito de agua residual farmacéutica (ARF). En el barrido negativo emerge un pico ancho de densidad de corriente (j) cerca de 0.45 V/RHE, el cual incrementa ligeramente su intensidad en presencia de *B. subtilis*. La forma de los CVs se atribuye a las características del soporte en ARF. Estos resultados indican la necesidad de utilizar catalizadores para promover la generación de pares redox, es decir la generación de energía de ARF.

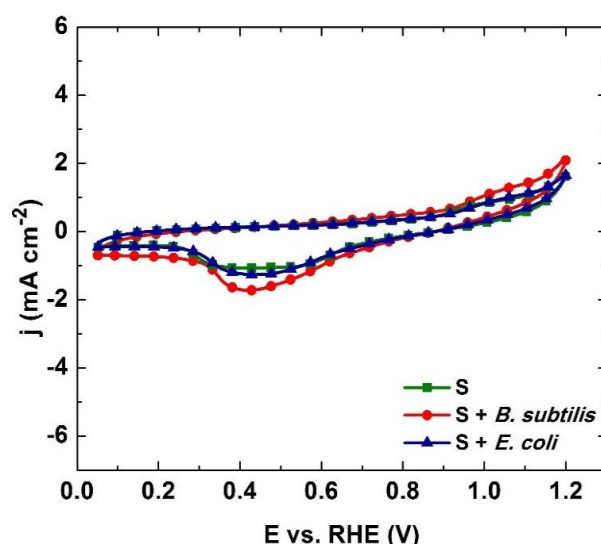


Figura 4.14. VCs de: soporte (S) sin capa catalítica ni bacterias, soporte sin capa catalítica con biopelícula de *B. subtilis*, y soporte sin capa catalítica con biopelícula de *E. coli*. Electrolito: ARF con atmósfera de N_2 ; $v = 20 \text{ mV s}^{-1}$.

En la Figura 4.15 se observan los VCs de: i) ánodos conteniendo S + capa catalítica de biocarbonos sin biopelícula; ii) bioánodos, que incluyen S + capa catalítica de biocarbonos, con biopelículas de *E. coli* o *B. subtilis*.

En la Figura 4.15 a) el VC del ánodo S + AB7 presenta básicamente una forma similar a los de la Figura 4.14, aunque con valores de j más altos en el intervalo de potencial, así como un pico de j a 0.98 V/RHE en el barrido positivo. Estas características son atribuidas al catalizador [86]. Con el bioánodo S + AB7 + *B. subtilis*, j disminuye considerablemente, lo que sugiere una baja electroactividad. Por su parte, el VC del bioánodo S + AB7 + *E. coli* muestra un cambio en la forma, que se vuelve cuasi-capacitiva y sin el pico a 0.45 V/RHE atribuido a S, lo que indica una reacción bioelectroquímica con la materia orgánica del ARF.

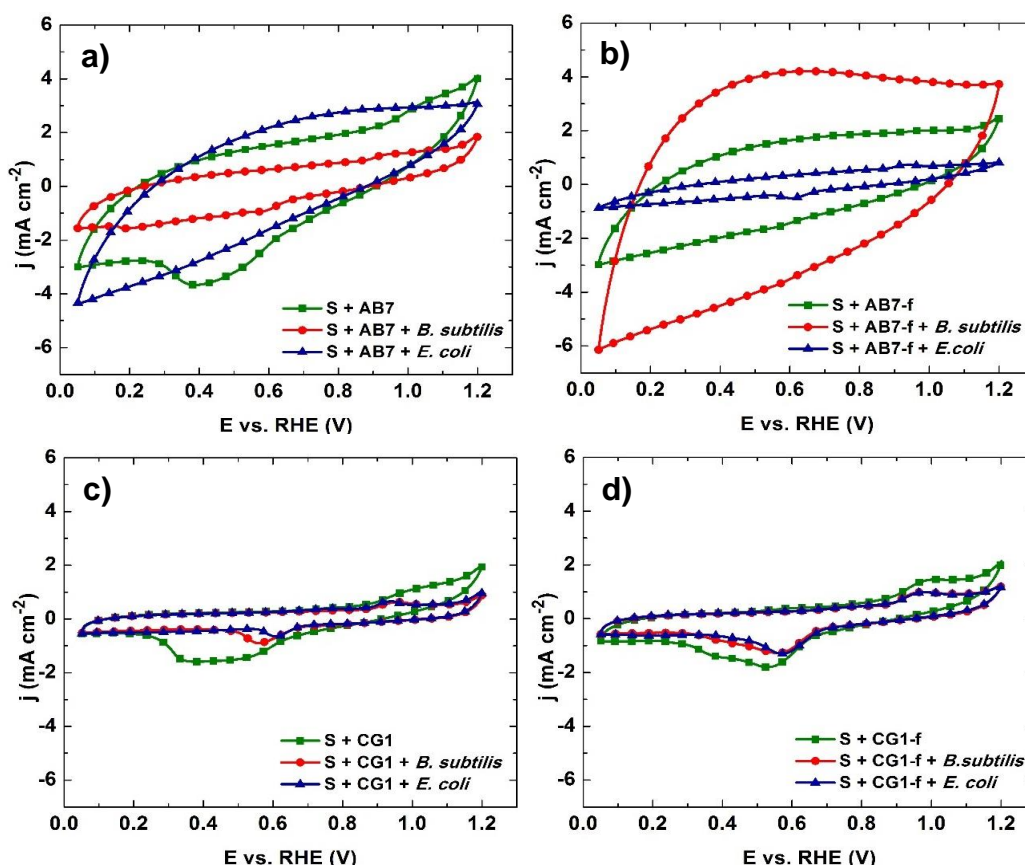


Figura 4.15. VCs de ánodos y bioánodos (*E. coli* o *B. subtilis*) con capa catalítica de: a) AB7; b) AB7-f; c) CG1; d) CG1-f. Electrolito: ARF con atmósfera de N_2 ; $v = 20 \text{ mV s}^{-1}$.

En la Figura 4.15 b) el VC del ánodo S + AB7-f presenta igualmente un comportamiento cuasi-capacitivo, lo que sugiere una actividad catalítica del

biocarbón en ARF. Por su parte, el bioánodo S + AB7-f + *B. subtilis* genera valores de j claramente más altos, con un comportamiento capacitivo. Este comportamiento indica una alta actividad catalítica del bioánodo para oxidar la materia orgánica del ARF, esto a su vez sugiere un efecto positivo del tratamiento de funcionalización al modificar la superficie del catalizador y así mejorar la interacción con la bacteria. En contraste, el VC del bioánodo S + AB7-f + *E. coli* produce valores de j muy bajos, debido a una baja biocompatibilidad del biocarbón con la bacteria y a su vez una baja electroactividad de la misma. Este comportamiento distinto de las bacterias se puede deber a su metabolismo y al mecanismo de transferencia de electrones en ellas. También influye la naturaleza del sustrato, así como las características del catalizador sobre el que han crecido [87].

Por su parte, el VC del ánodo S + CG1 (Figura 4.15 c)) tiene características de S (Figura 4.14). Mientras tanto, S + CG1 + *B. subtilis* y S + CG1 + *E. coli* generan un par redox, aunque con valores de j muy bajos. Lo mismo ocurre con el ánodo y los bioánodos en la Figura 4.15 d). Este comportamiento muestra una baja actividad catalítica en ARF, ello a pesar de que existe biocompatibilidad entre *B. subtilis* y CG1 y CG1-f (Figura 4.13). La baja actividad catalítica se puede atribuir a la baja área superficial y a la presencia de una alta concentración de minerales (SiO_2 , AlPO_4 , etc), lo cual hace que estos catalizadores tengan una mayor impedancia. Sin embargo, es necesario realizar más estudios para confirmar esta hipótesis.

En el caso particular de este estudio, los comportamientos electroquímicos observados en la Figura 4.15 se puede atribuir a la naturaleza de ambos catalizadores (composición química, morfología, área específica, estructura, textura, etc.) ya que se ha reportado [88] que no necesariamente existe una relación directa entre la cantidad de biopelícula y la densidad de corriente generada, ya que se observa una gran cantidad de biomasa en la superficie de CG1-f. Se ha reportado [89, 90] también que la presencia de grupos oxigenados en los catalizadores donde crece la biopelícula puede aumentar la biocompatibilidad catalizador-bacteria.

Una vez evaluados los resultados obtenidos de la caracterización electroquímica en media celda, se ha decidido utilizar el bioánodo conteniendo

catalizador AB7-f con biopelícula de *B. subtilis*, en las pruebas de caracterización electroquímica y degradación de ARF en CCM.

4.5 Caracterización en CCM

En la Figura 4.16 se muestran la curva de polarización V-j y la curva Pa-j obtenidas al inicio de la prueba de larga duración. Los puntos indican el VCA y los valores de j con $R_{ext}= 10\text{ k}\Omega$, $5\text{ k}\Omega$, $1.21\text{ k}\Omega$, $1\text{ k}\Omega$ y $10\ \Omega$. El VCA inicial es de 0.60 V , con un valor máximo de $Pa= 77\text{ mW m}^{-2}$ y una $j= 254\text{ mA m}^{-2}$.

En la curva V-j se observa un comportamiento casi lineal, esto indica una baja limitación del transporte de masa al electrodo, lo cual indica que la biopelícula formada por *B. subtilis* permite solucionar limitaciones difusionales y electroquímicas [91]. No se aprecia una ligera caída de voltaje al inicio, dicha caída se observa en algunas curvas de polarización y representa las pérdidas por activación, las cuales se refieren a la energía necesaria para efectuar una reacción de oxidación o reducción [17, 92]. Esto indica que las pérdidas por activación son bajas en este sistema, esto se puede atribuir a una alta superficie específica del electrodo, catálisis electrolítica, o a la existencia de una biopelícula enriquecida [17].

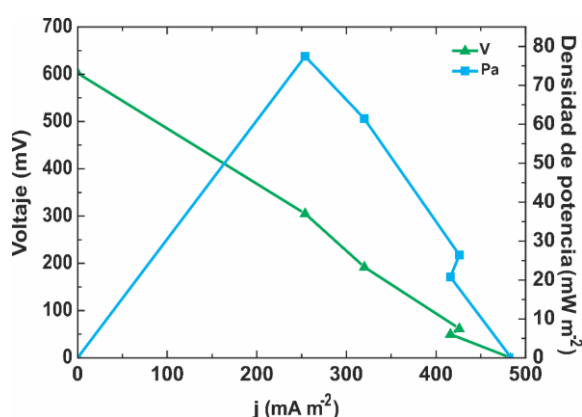


Figura 4.16. Curva de polarización (V-j, triángulo verde) y curva Pa-j (cuadro azul) de la CCM al inicio de la prueba de larga duración. Se muestran los puntos de VCA, $10\text{ k}\Omega$, $5\text{ k}\Omega$, $1.21\text{ k}\Omega$, $1\text{ k}\Omega$ y $10\ \Omega$. Bioánodo: AB7 + *B. subtilis*. Electrolito en ánodo: ARF. Cátodo: Pt/C 20%. Electrolito en cátodo: KOH con $\text{pH}= 9.7$. Membrana: Nafion® 117 alcalina.

En la Figura 4.17 se muestran las curvas Pa-j obtenidas durante la prueba de larga duración (inicial, día 1, 7 y 14). La curva inicial es la misma que en la Figura 4.16, mostrada aquí para comparación. El comportamiento de la CCM varía durante el tiempo, observándose un mejor desempeño el día 7. El

comportamiento oscilante de la CCM se puede deber a que se trata de un sistema dinámico, con interacción de bacteria con materia orgánica. Por un lado, la biopelícula de *B. subtilis* pudo modificarse en presencia de ARF (formación/desprendimiento de otras bacterias) [93]. Por otro lado, las bacterias presentes en el bioánodo pudieron aprovechar compuestos metabolizables en mayor o menor medida durante el desarrollo de la prueba [33].

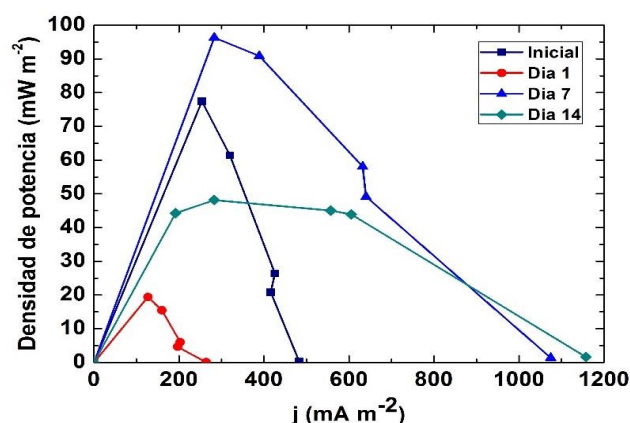


Figura 4.17. Curvas Pa-j de la CCM, obtenidas durante la prueba de larga duración. Mismas condiciones que en la Figura 4.16.

En la Tabla 4.5 se presentan los parámetros obtenidos de las curvas de polarización y las curvas Pa-j. Los valores de VCA inicial y del día 7 son similares a los reportados para este tipo de arreglos (500 – 800 mV) [94], por lo que se puede decir que en estos periodos de tiempo el sistema se encontraba en condiciones óptimas.

Tabla 4.5. Parámetros de operación de la CCM durante la prueba de larga duración.

	VCA (V)	Pa máx (mW m ⁻²)	j (mA m ⁻²)	Pv (mW m ⁻³)
Inicial	0.60	77.4	254	38.7
Día 1	0.31	19.3	127	9.6
Día 7	0.53	96.3	283	48.1
Día 14	0.38	48.1	283	24.0

Por otro lado, los valores de Pa máx presentan el mismo comportamiento que el observado en la Figura 4.17, ya que durante el día 7 se obtuvieron los valores más altos, al comparar estos valores con los obtenidos en otros trabajos de investigación reportados en la literatura (Tabla 4.6) se puede observar que a pesar de que se ha utilizado una ARF cruda (sin tratamiento previo) y un cultivo

puro, los resultados obtenidos en este trabajo son comparables con aquellos en los que utilizan sustratos sintéticos y cultivos mixtos. Sin embargo, es necesario señalar que la comparación entre diferentes tipos de sistemas de CCMs es complicada, ya que existe una gran cantidad de variables, como el sustrato, electrodos, uso de catalizadores, configuración de la celda, temperatura, pH, cultivo, etc [53]. Con esta comparación lo que se pretende es mostrar que el uso de una CCM de doble cámara con ARF como sustrato, con AB7-f como catalizador y *B. subtilis* como microorganismo electroactivo presenta resultados promisorios para la continuidad del desarrollo de sistemas similares (catalizador – sustrato – microorganismo).

La Figura 4.18 muestra la evolución de V al aplicar una R_{ext} de 10 k Ω a la celda durante los 14 días de prueba.

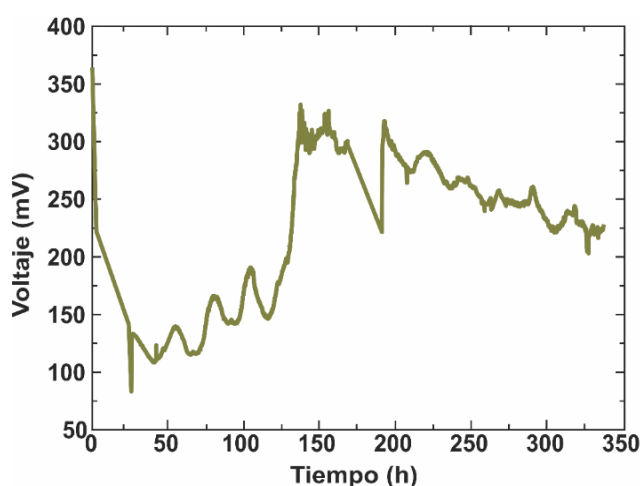


Figura 4.18. Evolución del voltaje en la prueba de larga duración ($R_{ext}= 10\text{ k}\Omega$).

Inicialmente se tiene un voltaje de 360 mV, esto se puede deber a la diferencia de potencial entre los dos electrodos, así como a los factores químicos y biológicos del montaje [93]. Al transcurrir 25 h se tiene el valor mínimo de voltaje de toda la prueba, a partir del cual se registra un incremento inestable hasta las 130 h, este incremento puede ser ocasionado por los procesos de enriquecimiento y formación de la biopelícula eléctricamente activa [33]. Posteriormente se mantiene en un estado estacionario (con ligeras fluctuaciones) durante 30 h. Alrededor de las 160 h hay un decremento marcado debido a una falla en el suministro de oxígeno en la cámara catódica, una vez que el suministro de oxígeno se estabilizó el voltaje comenzó a descender con

un comportamiento similar al observado al incrementar, esto puede deberse a la disminución de nutrientes asimilables por las bacterias cerca del bioánodo, por lo que al finalizar la prueba a las 336 h el voltaje obtenido continuaba disminuyendo.

Sin embargo, esto puede atribuirse a que es un proceso por lote sin agitación, por lo que podrían existir menos nutrientes alrededor del bioánodo, así como a un cambio en el metabolismo de las bacterias presentes en el bioánodo, ocasionado por el agotamiento de una fuente de carbono y el cambio a otra fuente de carbono, este comportamiento también se ha reportado en CCMs con fuentes de carbono complejas como compuestos aromáticos [95], reciclaje de papel [96] y aguas residuales del proceso de producción de coque [97].

Tabla 4.6. Comparación entre este trabajo y algunos reportados en la literatura.

Tipo de CCM (electrodo)	Sustrato	Pa máx (mW m ⁻²)	Cultivo	Referencia
Doble cámara (electrodo a difusión de gas con capa catalítica de AB7-f)	ARF	96.3	<i>B. subtilis</i>	Este trabajo
Doble cámara (tela de carbón).	Sintético (acetato de sodio y nutrientes)	15.6	Mixto	[4]
Doble cámara (fibra de carbón)	Agua sintética de industria láctea.	246	Mixto	[98]
Doble cámara (fieltro de carbón)	Fracción orgánica sintética de desechos sólidos municipales con tratamiento por ultrasonido	9.3	Mixto	[99]
Doble cámara (tela de carbón con polianilina como catalizador)	Medio sintético con acetato de sodio	65	Mixto	[100]
Tubular de cámara sencilla (tela de carbón)	Medio sintético con benceno y fenantreno	6.7	Mixto	[24]
Cámara sencilla (fieltro de carbón)	Medio sintético con glucosa y fenol.	31.3	Mixto	[101]
Doble cámara (placa de grafito cubierto con papel de carbón)	Aguas de proceso de sulfuros	17.6	Mixto	[102]
Doble cámara (papel de carbón)	Sintético con adición de celulosa	190.2	Mixto	[86]
Doble cámara (papel de carbón)	Sintético con adición de celulosa	162	<i>Nocardiosis</i>	[86]
Doble cámara (tela de carbón)	Medio sintético	0.001	<i>B. subtilis</i>	[91] [103]
Doble cámara (vara de grafito y tela de carbón)	Lodos con aguas residuales de vinazas	93	Mixto	[104]

4.6 Análisis de ARF

En la Tabla 4.7 se muestran los resultados del análisis realizado a muestras de ARF recolectadas al inicio y a los días 1, 7 y 14. El ion sulfato (SO_4^{2-}) se incrementa poco más de 3 veces de su valor en el día 14 con respecto al valor inicial. Algunos compuestos en el ARF como la penicilina y sus derivados contienen S. Por lo tanto, el incremento en la concentración de SO_4^{2-} puede deberse en parte a un cambio en el tipo de enlace de S [105] al degradarse la penicilina u otros compuestos, debido al metabolismo de *B. subtilis*, ya que el método empleado sólo permite cuantificar la concentración de iones sulfato presentes en la muestra analizada, por lo tanto, otros compuestos azufrados no son cuantificables por esta técnica [106].

Por otro lado, la concentración de sólidos suspendidos totales (SST) disminuyó alrededor de 50%, probablemente por una reducción de partículas suspendidas de materia orgánica, debido a la hidrólisis ocasionada por el metabolismo anaerobio de los microorganismos [107]

Los demás parámetros analizados se mantuvieron sin cambios mayores durante la prueba de larga duración.

Tabla 4.7. Caracterización fisicoquímica de ARF utilizada en la prueba de larga duración.

Parámetro	Unidad	Muestras			
		Inicial (0 h)	Día 1 (24 h)	Día 7 (168 h)	Día 14 (336 h)
pH		9.20	9.10	8.60	8.50
Conductividad	mS m ⁻¹	2,870	2,830	2,810	2,770
Demanda Química de Oxígeno (DQO)	mg L ⁻¹	27,603	22,694	21,384	-
Demanda Bioquímica de Oxígeno (DBO)	mg L ⁻¹	10,433	-	-	8,900
Nitrógeno de nitratos (N-NO ₃)	mg L ⁻¹	6.13	-	-	6.76
Fósforo total	mg L ⁻¹	93.91	-	-	91.15
Ion sulfato (SO_4^{2-})	mg L ⁻¹	1,161	-	-	3,592
Alcalinidad total	mg L ⁻¹ CaCO ₃	3,574	-	-	3,772
Cloruros	mg L ⁻¹	10,616	-	-	9,466
Sólidos Disueltos Totales (SDT)	mg L ⁻¹	30,540	-	-	27,900
Sólidos Suspendidos Totales (SST)	mg L ⁻¹	3,320	-	-	1,640

-. no determinado

Capítulo 5. Conclusiones

5.1 Catalizadores

- AB7 y AB7-f son catalizadores con un contenido de carbono superior al 90% y de estructura amorfa. Tienen una alta S_{BET} , de 1984 y 1890 $m^2 g^{-1}$, respectivamente, con micro y mesoporos. Presentan una morfología porosa y de forma irregular.
- Por otra parte, los catalizadores CG1 y CG1-f contienen alrededor de 14 elementos en su composición química. Presentan cierta cristalinidad, ya que contiene algunos compuestos minerales como cuarzo, berlinita, calcita y sanidina, mientras que su estructura carbonosa es amorfa. Tienen baja S_{BET} , de 21 y 22 $m^2 g^{-1}$, respectivamente, son mesoporosos. La morfología de ambos catalizadores es muy heterogénea, conteniendo una gran cantidad de partículas de muy diversas formas.
- Con respecto al proceso de funcionalización, no hay modificación considerable de las propiedades fisicoquímicas de los catalizadores.

5.2 Ánodos y bioánodos.

- Los biocarbones funcionan como sustrato para el crecimiento de biopelículas de *B. subtilis* y *E. coli*. Sin embargo, el aparente mayor crecimiento microbiano (biocompatibilidad) no está ligado necesariamente con una mayor actividad catalítica (electroactividad).

5.3 Evaluación de la actividad catalítica

- El conjunto AB7 + *B. subtilis* generó la mayor densidad de corriente y el mejor comportamiento catalítico en el electrolito de ARF (media celda).
- La CCM equipada con este bioánodo generó $V_{CA}=0.60 V$, $P_a \text{ máx} = 96.3 mW m^{-2}$, $P_v= 48.1 mW m^{-3}$ y $j=283 mA m^{-2}$, empleando ARF como sustrato.
- El desempeño de la CCM presentó oscilaciones durante la prueba de larga duración, debido a un comportamiento dinámico de sus componentes.

5.4 Tratamiento de ARF en una CCM

- Hay un aumento de alrededor de tres veces en la concentración del ion sulfato y una reducción del 50% de los sólidos suspendidos totales, ambas modificaciones atribuidas al metabolismo anaerobio de los microorganismos.

Se considera promisorio el desarrollo de catalizadores elaborados a partir de desechos en conjunto con ARF como sustrato y *B. subtilis* como microorganismo electroactivo para su uso en una CCM.

Capítulo 6. Bibliografía

- [1] S.K. Butti, G. Velvizhi, M.L.K. Sulonen, J.M. Haavisto, E. Oguz Koroglu, A. Yusuf Cetinkaya, S. Singh, D. Arya, J. Annie Modestra, K. Vamsi Krishna, A. Verma, B. Ozkaya, A.-M. Lakaniemi, J.A. Puhakka, S. Venkata Mohan. Microbial electrochemical technologies with the perspective of harnessing bioenergy: Maneuvering towards upscaling. *Renew. Sust. Energ. Rev.* 53 (2016) 462-476.
- [2] W.-W. Li, H.-Q. Yu, Z. He. Towards sustainable wastewater treatment by using microbial fuel cells-centered technologies. *Energy Environ. Sci.* 7 (2013) 911-924.
- [3] J.M. Martinez-Duart, J. Hernandez-Moro, S. Serrano-Calle, R. Gomez-Calvet, M. Casanova-Molina. New frontiers in sustainable energy production and storage. *Vacuum.* 122 (2015) 369-375.
- [4] C. Gonzalez-Nava, L.A. Godinez, A.U. Chavez, B. Cercado, L.G. Arriaga, F.J. Rodriguez-Valadez. Study of different carbon materials for their use as bioanodes in microbial fuel cells. *Water Sci. Technol.* 73 (2016) 2849-57.
- [5] A.S. Mathuriya, J.V. Yakhmi. Microbial fuel cells - Applications for generation of electrical power and beyond. *Crit. Rev. Microbiol.* 42 (2016) 127-43.
- [6] J.R. Trapero, L. Horcajada, J.J. Linares, J. Lobato. Is microbial fuel cell technology ready? An economic answer towards industrial commercialization. *Appl. Energ.* 185 (2017) 698-707.
- [7] 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.
- [8] J.S. Cha, S.H. Park, S.-C. Jung, C. Ryu, J.-K. Jeon, M.-C. Shin, Y.-K. Park. Production and utilization of biochar: A review. *J. Ind. Eng. Chem.* 40 (2016) 1-15.
- [9] W.-E. Thung, S.-A. Ong, L.-N. Ho, Y.-S. Wong, F. Ridwan, Y.-L. Oon, Y.-S. Oon, H.K. Lehl. Bioelectricity Generation in Batch-Fed Up-Flow Membrane-Less Microbial Fuel Cell: Effect of Surface Morphology of Carbon Materials as Aqueous Biocathodes. *Water, Air, Soil Pollut.* 227 (2016).

- [10] D. Larcher, J.M. Tarascon. Towards greener and more sustainable batteries for electrical energy storage. *Nat Chem.* 7 (2015) 19-29.
- [11] S. Ömeroğlu, F.D. Sanin. Bioelectricity Generation From Wastewater Sludge Using Microbial Fuel Cells: A Critical Review. *CLEAN - Soil, Air, Water.* 44 (2016) 1225-1233.
- [12] K.Y. Kim, W. Yang, P.J. Evans, B.E. Logan. Continuous treatment of high strength wastewaters using air-cathode microbial fuel cells. *Bioresour. Technol.* 221 (2016) 96-101.
- [13] M. Sharma, S. Bajracharya, S. Gildemyn, S.A. Patil, Y. Alvarez-Gallego, D. Pant, K. Rabaey, X. Dominguez-Benetton. A critical revisit of the key parameters used to describe microbial electrochemical systems. *Electrochim. Acta.* 140 (2014) 191-208.
- [14] C. Abourached, M.J. English, H. Liu. Wastewater treatment by Microbial Fuel Cell (MFC) prior irrigation water reuse. *J. Clean. Prod.* 137 (2016) 144-149.
- [15] P.L. Mccarty, J. Bae, J. Kim. Domestic wastewater treatment as a net energy producer--can this be achieved? *Environ. Sci. Technol.* 45 (2011) 7100-6.
- [16] V.G. Gude. Energy and water autarky of wastewater treatment and power generation systems. *Renew. Sust. Energ. Rev.* 45 (2015) 52-68.
- [17] B.E. Logan, B. Hamelers, R. Rozendal, U. Schröder, J. Keller, S. Freguia, P. Aelterman, W. Verstraete, K. Rabaey. Microbial fuel cells: methodology and technology. *Environ. Sci. Technol.* 40 (2006) 5181-5192.
- [18] B.E. Logan. Simultaneous wastewater treatment and biological electricity generation. *Water Sci. Technol.* 52 (2005) 31-37.
- [19] M. Rahimnejad, A. Adhami, S. Darvari, A. Zirepour, S.-E. Oh. Microbial fuel cell as new technology for bioelectricity generation: A review. *Alexandria Engineering Journal.* 54 (2015) 745-756.
- [20] U. Schröder, F. Harnisch, L.T. Angenent. Microbial electrochemistry and technology: terminology and classification. *Energy Environ. Sci.* 8 (2015) 513-519.
- [21] D.R. Lovley. The microbe electric: conversion of organic matter to electricity. *Curr. Opin. Biotechnol.* 19 (2008) 564-71.

- [22] S.T. Oh, J.R. Kim, G.C. Premier, T.H. Lee, C. Kim, W.T. Sloan. Sustainable wastewater treatment: how might microbial fuel cells contribute. *Biotechnol. Adv.* 28 (2010) 871-81.
- [23] Q. Zhang, J. Hu, D.J. Lee. Microbial fuel cells as pollutant treatment units: Research updates. *Bioresour. Technol.* 217 (2016) 121-8.
- [24] O. Adelaja, T. Keshavarz, G. Kyazze. Treatment of phenanthrene and benzene using microbial fuel cells operated continuously for possible in situ and ex situ applications. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 116 (2017) 91-103.
- [25] G. Zhang, D.J. Lee, F. Cheng. Treatment of domestic sewage with anoxic/oxic membrane-less microbial fuel cell with intermittent aeration. *Bioresour. Technol.* 218 (2016) 680-6.
- [26] W. Guo. Removal of Chloramphenicol and Simultaneous Electricity Generation by Using Microbial Fuel Cell Technology. *International Journal of Electrochemical Science.* (2016) 5128-5139.
- [27] 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. *Renew. Energ.* 101 (2017) 1256-1265.
- [28] L.E. Doyle, E. Marsili. Methods for enrichment of novel electrochemically-active microorganisms. *Bioresour. Technol.* 195 (2015) 273-82.
- [29] Y.-M. Chen, C.-T. Wang, Y.-C. Yang, W.-J. Chen. Application of aluminum-alloy mesh composite carbon cloth for the design of anode/cathode electrodes in *Escherichia coli* microbial fuel cell. *Int. J. Hydrogen Energy.* 38 (2013) 11131-11137.
- [30] H.-Y. Tsai, W.-H. Hsu, Y.-C. Huang. Characterization of Carbon Nanotube/Graphene on Carbon Cloth as an Electrode for Air-Cathode Microbial Fuel Cells. *Journal of Nanomaterials.* 2015 (2015) 1-7.
- [31] H.T. Chou, H.J. Lee, C.Y. Lee, N.H. Tai, H.Y. Chang. Highly durable anodes of microbial fuel cells using a reduced graphene oxide/carbon nanotube-coated scaffold. *Bioresour. Technol.* 169 (2014) 532-6.
- [32] X.F. Chen, X.S. Wang, K.T. Liao, L.Z. Zeng, L.D. Xing, X.W. Zhou, X.W. Zheng, W.S. Li. Improved power output by incorporating polyvinyl alcohol

- into the anode of a microbial fuel cell. *J. Mater. Chem. A.* 3 (2015) 19402-19409.
- [33] E. Herrero-Hernández, T. Smith, R. Akid. Electricity generation from wastewaters with starch as carbon source using a mediatorless microbial fuel cell. *Biosens. Bioelectron.* 39 (2013) 194-198.
- [34] Y. Tao, Q. Liu, J. Chen, B. Wang, Y. Wang, K. Liu, M. Li, H. Jiang, Z. Lu, D. Wang. Hierarchically Three-Dimensional Nanofiber Based Textile with High Conductivity and Biocompatibility As a Microbial Fuel Cell Anode. *Environ. Sci. Technol.* 50 (2016) 7889-95.
- [35] 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 (2011) 2629-2634.
- [36] 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.
- [37] Y. Jeon, C.-H. Park, S. Kim. Electricity Generation from Swine Wastewater in Mediatorless Single-Chamber Microbial Fuel Cells. *Bull. Korean Chem. Soc.* 37 (2016) 1148-1151.
- [38] A. Rinaldi, B. Mecheri, V. Garavaglia, S. Licoccia, P. Di Nardo, E. Traversa. Engineering materials and biology to boost performance of microbial fuel cells: a critical review. *Energ. Environ. Sci.* 1 (2008) 417.
- [39] Mustakeem. Electrode materials for microbial fuel cells: nanomaterial approach. *Mater. Renew. Sustain. Energy.* 4 (2015).
- [40] K. Guo, A. Prevoteau, S.A. Patil, K. Rabaey. Engineering electrodes for microbial electrocatalysis. *Curr. Opin. Biotechnol.* 33 (2015) 149-56.
- [41] C. Santoro, C. Arbizzani, B. Erable, I. Ieropoulos. Microbial fuel cells: From fundamentals to applications. A review. *J. Power Sources.* 356 (2017) 225-244.
- [42] J. Lee, K.-H. Kim, E.E. Kwon. Biochar as a Catalyst. *Renew. Sust. Energ. Rev.* 77 (2017) 70-79.
- [43] S. Chen, G. He, X. Hu, M. Xie, S. Wang, D. Zeng, H. Hou, U. Schroder. A three-dimensionally ordered macroporous carbon derived from a natural resource as anode for microbial bioelectrochemical systems. *ChemSusChem.* 5 (2012) 1059-63.

- [44] S. Li, C. Cheng, A. Thomas. Carbon-Based Microbial-Fuel-Cell Electrodes: From Conductive Supports to Active Catalysts. *Adv. Mater.* 29 (2017).
- [45] T. Huggins, H. Wang, J. Kearns, P. Jenkins, Z.J. Ren. Biochar as a sustainable electrode material for electricity production in microbial fuel cells. *Bioresour. Technol.* 157 (2014) 114-9.
- [46] S. Meier, G. Curaqueo, N. Khan, N. Bolan, M. Cea, G.M. Eugenia, P. Cornejo, Y.S. Ok, F. Borie. Chicken-manure-derived biochar reduced bioavailability of copper in a contaminated soil. *J. Soils Sed.* 17 (2015) 741-750.
- [47] W. Kiciński, M. Szala, T. Cłapa, M. Syczewski, A. Borkowski. Interactions between bacteria and heteroatom-modified nanoporous carbon: The influence of nitrogen and sulfur doping. *Carbon.* 127 (2018) 479-490.
- [48] E.R.C.O.T. Netherlands. Phyllis2, database for biomass and waste. 2018-01-30]; Available from: <https://www.ecn.nl/phyllis2>.
- [49] D. Lardizabal-Guitierrez, D. González-Quijano, P. Bartolo-Pérez, B. Escobar-Morales, F.J. Rodríguez-Varela, I.L. Alonso-Lemus. Communication—Synthesis of Self-Doped Metal-Free Electrocatalysts from Waste Leather with High ORR Activity. *J. Electrochem. Soc.* 163 (2015) H15-H17.
- [50] P.Y. You, S.K. Kamarudin. Recent progress of carbonaceous materials in fuel cell applications: An overview. *Chem. Eng. J.* 309 (2017) 489-502.
- [51] H. Hiegemann, D. Herzer, E. Nettmann, M. Lubken, P. Schulte, K.G. Schmelz, S. Gredigk-Hoffmann, M. Wichern. An integrated 45L pilot microbial fuel cell system at a full-scale wastewater treatment plant. *Bioresour. Technol.* 218 (2016) 115-22.
- [52] K. Hamamoto, M. Miyahara, A. Kouzuma, A. Matsumoto, M. Yoda, T. Ishiguro, K. Watanabe. Evaluation of microbial fuel cells for electricity generation from oil-contaminated wastewater. *J. Biosci. Bioeng.* 122 (2016) 589-593.
- [53] E.D. Penteado, C.M. Fernandez-Marchante, M. Zaiat, P. Cañizares, E.R. Gonzalez, M.a.R. Rodrigo. Energy recovery from winery wastewater using a dual chamber microbial fuel cell. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 91 (2016) 1802-1808.

- [54] S. Srikanth, M. Kumar, D. Singh, M.P. Singh, B.P. Das. Electro-biocatalytic treatment of petroleum refinery wastewater using microbial fuel cell (MFC) in continuous mode operation. *Bioresour. Technol.* 221 (2016) 70-77.
- [55] C.S. He, Z.X. Mu, H.Y. Yang, Y.Z. Wang, Y. Mu, H.Q. Yu. Electron acceptors for energy generation in microbial fuel cells fed with wastewaters: A mini-review. *Chemosphere.* 140 (2015) 12-7.
- [56] C. Jayashree, K. Tamilarasan, M. Rajkumar, P. Arulazhagan, K.N. Yogalakshmi, M. Srikanth, J.R. Banu. Treatment of seafood processing wastewater using upflow microbial fuel cell for power generation and identification of bacterial community in anodic biofilm. *J. Environ. Manage.* 180 (2016) 351-8.
- [57] L. He, P. Du, Y. Chen, H. Lu, X. Cheng, B. Chang, Z. Wang. Advances in microbial fuel cells for wastewater treatment. *Renew. Sust. Energ. Rev.* 71 (2017) 388-403.
- [58] M.A. Rosenbaum, A.E. Franks. Microbial catalysis in bioelectrochemical technologies: status quo, challenges and perspectives. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 98 (2014) 509-18.
- [59] G.G. Kumar, V.G. 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) 461-75.
- [60] L. L. De Souza. Direct Oxidation of Ethylene Glycol on PtSn/C for Application in Alkaline Fuel Cell. *International Journal of Electrochemical Science.* (2017) 11855-11874.
- [61] W.J. Liu, H. Jiang, H.Q. Yu. Development of Biochar-Based Functional Materials: Toward a Sustainable Platform Carbon Material. *Chem. Rev.* 115 (2015) 12251-85.
- [62] T.S. Hui, M.a.A. Zaini. Potassium hydroxide activation of activated carbon: a commentary. *Carbon letters.* 16 (2015) 275-280.
- [63] Y. Huang, E. Ma, G. Zhao. Thermal and structure analysis on reaction mechanisms during the preparation of activated carbon fibers by KOH activation from liquefied wood-based fibers. *Industrial Crops and Products.* 69 (2015) 447-455.
- [64] J. Schulz, J. Berk, J. Suhl, L. Schrader, S. Kaufhold, I. Mewis, H.M. Hafez, C. Ulrichs. Characterization, mode of action, and efficacy of twelve silica-

- based acaricides against poultry red mite (*Dermanyssus gallinae*) in vitro. *Parasitol. Res.* 113 (2014) 3167-75.
- [65] X. Xiao, B. Chen, L. Zhu. Transformation, morphology, and dissolution of silicon and carbon in rice straw-derived biochars under different pyrolytic temperatures. *Environ. Sci. Technol.* 48 (2014) 3411-9.
- [66] A. Lazzarini, A. Piovano, R. Pellegrini, G. Agostini, S. Rudić, C. Lamberti, E. Groppo. Graphitization of Activated Carbons: A Molecular-level Investigation by INS, DRIFT, XRD and Raman Techniques. *Physics Procedia.* 85 (2016) 20-26.
- [67] A. Lazzarini, A. Piovano, R. Pellegrini, G. Leofanti, G. Agostini, S. Rudić, M.R. Chierotti, R. Gobetto, A. Battiato, G. Spoto, A. Zecchina, C. Lamberti, E. Groppo. A comprehensive approach to investigate the structural and surface properties of activated carbons and related Pd-based catalysts. *Catalysis Science & Technology.* 6 (2016) 4910-4922.
- [68] 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 (2016) 23409-23416.
- [69] C.H. Chia, B. Gong, S.D. Joseph, C.E. Marjo, P. Munroe, A.M. Rich. Imaging of mineral-enriched biochar by FTIR, Raman and SEM–EDX. *Vib. Spectrosc.* 62 (2012) 248-257.
- [70] F.G. Mendonca, I.T.D. Cunha, R.R. Soares, J.C. Tristao, R.M. Lago. Tuning the surface properties of biochar by thermal treatment. *Bioresour. Technol.* 246 (2017) 28-33.
- [71] H. Marsh, F.R. Reinoso, *Activated Carbon.* 2006, Oxford, U.K.: Elsevier Science.
- [72] P. Mohanty, S. Nanda, K.K. Pant, S. Naik, J.A. Kozinski, A.K. Dalai. Evaluation of the physiochemical development of biochars obtained from pyrolysis of wheat straw, timothy grass and pinewood: Effects of heating rate. *J. Anal. Appl. Pyrolysis.* 104 (2013) 485-493.
- [73] D.M. Keown, X. Li, J.-I. Hayashi, C.-Z. Li. Characterization of the structural features of char from the pyrolysis of cane trash using Fourier transform–Raman spectroscopy. *Energy & fuels.* 21 (2007) 1816-1821.

- [74] L. Zhao, X. Cao, O. Masek, A. Zimmerman. Heterogeneity of biochar properties as a function of feedstock sources and production temperatures. *J. Hazard. Mater.* 256-257 (2013) 1-9.
- [75] K. Zhang, P. Sun, M.C.a.S. Faye, Y. Zhang. Characterization of biochar derived from rice husks and its potential in chlorobenzene degradation. *Carbon.* 130 (2018) 730-740.
- [76] O.D.L.N.U.P.L.a.Y.L.A. (Fao), Manual para el personal auxiliar de sanidad animal primaria. 1995: Roma, Italia.
- [77] M. Keiluweit, P.S. Nico, M.G. Johnson, M. Kleber. Dynamic molecular structure of plant biomass-derived black carbon (biochar). *Environ. Sci. Technol.* 44 (2010) 1247-1253.
- [78] K.B. Cantrell, P.G. Hunt, M. Uchimiya, J.M. Novak, K.S. Ro. Impact of pyrolysis temperature and manure source on physicochemical characteristics of biochar. *Bioresour. Technol.* 107 (2012) 419-28.
- [79] M. Kääh, I. Ap Gwynn, H. Nötzli. Collagen fibre arrangement in the tibial plateau articular cartilage of man and other mammalian species. *The Journal of Anatomy.* 193 (1998) 23-34.
- [80] M. Thommes, K. Kaneko, A.V. Neimark, J.P. Olivier, F. Rodriguez-Reinoso, J. Rouquerol, K.S.W. Sing. Physisorption of gases, with special reference to the evaluation of surface area and pore size distribution (IUPAC Technical Report). *Pure Appl. Chem.* 87 (2015).
- [81] S. Lowell, J.E. Shields, M.A. Thomas, M. Thommes, Characterization of porous solids and powders: surface area, pore size and density. Vol. 16. 2012: Springer Science & Business Media.
- [82] M.-V. Nguyen, B.-K. Lee. Removal of Dimethyl Sulfide from Aqueous Solution Using Cost-Effective Modified Chicken Manure Biochar Produced from Slow Pyrolysis. *Sustainability-Basel.* 7 (2015) 15057-15072.
- [83] S. Koutcheiko, C.M. Monreal, H. Kodama, T. Mccracken, L. Kotlyar. Preparation and characterization of activated carbon derived from the thermo-chemical conversion of chicken manure. *Bioresour. Technol.* 98 (2007) 2459-64.
- [84] D. Everett. Manual of symbols and terminology for physicochemical quantities and units, appendix II: Definitions, terminology and symbols in colloid and surface chemistry. *Pure Appl. Chem.* 31 (1972) 577-638.

- [85] M. Schechter, A. Schechter, S. Rozenfeld, E. Efrat, R. Cahan, Anode biofilm, in Technology and Application of Microbial Fuel Cells. 2014, InTech.
- [86] S.H. Hassan, Y.S. Kim, S.E. Oh. Power generation from cellulose using mixed and pure cultures of cellulose-degrading bacteria in a microbial fuel cell. *Enzyme Microb. Technol.* 51 (2012) 269-73.
- [87] A.A. Carmona-Martinez, F. Harnisch, L.A. Fitzgerald, J.C. Biffinger, B.R. Ringeisen, U. Schroder. Cyclic voltammetric analysis of the electron transfer of *Shewanella oneidensis* MR-1 and nanofilament and cytochrome knock-out mutants. *Bioelectrochemistry.* 81 (2011) 74-80.
- [88] S.A. Patil, F. Harnisch, B. Kapadnis, U. Schroder. Electroactive mixed culture biofilms in microbial bioelectrochemical systems: the role of temperature for biofilm formation and performance. *Biosens. Bioelectron.* 26 (2010) 803-8.
- [89] Y. Zhao, Y. Ma, T. Li, Z. Dong, Y. Wang. Modification of carbon felt anodes using double-oxidant HNO₃/H₂O₂ for application in microbial fuel cells. *RSC Advances.* 8 (2018) 2059-2064.
- [90] X. Zhou, X. Chen, H. Li, J. Xiong, X. Li, W. Li. Surface oxygen-rich titanium as anode for high performance microbial fuel cell. *Electrochim. Acta.* 209 (2016) 582-590.
- [91] 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 (2009) 258-263.
- [92] L. Peixoto, B. Min, G. Martins, A.G. Brito, P. Kroff, P. Parpot, I. Angelidaki, R. Nogueira. In situ microbial fuel cell-based biosensor for organic carbon. *Bioelectrochemistry.* 81 (2011) 99-103.
- [93] B. Min, J. Kim, S. Oh, J.M. Regan, B.E. Logan. Electricity generation from swine wastewater using microbial fuel cells. *Water Res.* 39 (2005) 4961-8.
- [94] L. Peixoto, A.L. Rodrigues, G. Martins, A. Nicolau, A.G. Brito, M.M. Silva, P. Parpot, R. Nogueira. A flat microbial fuel cell for decentralized wastewater valorization: process performance and optimization potential. *Environ. Technol.* 34 (2013) 1947-1956.

- [95] S.K. Marashi, H.R. Kariminia, I.S. Savizi. Bimodal electricity generation and aromatic compounds removal from purified terephthalic acid plant wastewater in a microbial fuel cell. *Biotechnol. Lett.* 35 (2013) 197-203.
- [96] L. Huang, B.E. Logan. Electricity generation and treatment of paper recycling wastewater using a microbial fuel cell. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 80 (2008) 349-355.
- [97] L. Huang, X. Yang, X. Quan, J. Chen, F. Yang. A microbial fuel cell–electro-oxidation system for coking wastewater treatment and bioelectricity generation. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 85 (2010) 621-627.
- [98] A. Faria, L. Gonçalves, J.M. Peixoto, L. Peixoto, A.G. Brito, G. Martins. Resources recovery in the dairy industry: bioelectricity production using a continuous microbial fuel cell. *J. Clean. Prod.* 140 (2017) 971-976.
- [99] H.Y. Chiu, T.Y. Pai, M.H. Liu, C.A. Chang, F.C. Lo, T.C. Chang, H.M. Lo, C.F. Chiang, K.P. Chao, W.Y. Lo, S.W. Lo, Y.L. Chu. Electricity production from municipal solid waste using microbial fuel cells. *Waste Manag Res.* 34 (2016) 619-29.
- [100] D. Hidalgo, T. Tommasi, K. Velayutham, B. Ruggeri. Long term testing of Microbial Fuel Cells: Comparison of different anode materials. *Bioresour. Technol.* 219 (2016) 37-44.
- [101] T.S. Song, X.Y. Wu, C.C. Zhou. Effect of different acclimation methods on the performance of microbial fuel cells using phenol as substrate. *Bioprocess Biosyst Eng.* 37 (2014) 133-8.
- [102] M.L. Sulonen, M.E. Kokko, A.M. Lakaniemi, J.A. Puhakka. Electricity generation from tetrathionate in microbial fuel cells by acidophiles. *J. Hazard. Mater.* 284 (2015) 182-9.
- [103] 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 (2010) 5427-5428.
- [104] C.K. Sakdaronnarong, S. Thanosawan, S. Chaithong, N. Sinbuathong, C. Jeraputra. Electricity production from ethanol stillage in two-compartment MFC. *Fuel.* 107 (2013) 382-386.

- [105] D. Li, M. Yang, J. Hu, Y. Zhang, H. Chang, F. Jin. Determination of penicillin G and its degradation products in a penicillin production wastewater treatment plant and the receiving river. *Water Res.* 42 (2008) 307-17.
- [106] NMX-AA-074SCFI-2014, ANÁLISIS DE AGUA - MEDICIÓN DE ION SULFATO EN AGUAS NATURALES, RESIDUALES Y RESIDUALES TRATADAS - MÉTODO DE PRUEBA.
- [107] J. Ma, Z. Wang, X. Li, Y. Wang, Z. Wu. Bioelectricity generation through microbial fuel cell using organic matters recovered from municipal wastewater. *Environmental Progress & Sustainable Energy.* 33 (2014) 290-297.