



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN INGENIERÍA
INGENIERÍA AMBIENTAL - AGUA

**EVALUACIÓN DE LOS FACTORES QUE AFECTAN LA CÁMARA ANÓDICA Y
CATÓDICA EN CELDAS DE ELECTRÓLISIS MICROBIANAS UTILIZADAS
PARA LA PRODUCCIÓN DE HIDRÓGENO**

TESIS
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
DOCTOR EN INGENIERÍA
(INGENIERÍA AMBIENTAL)

PRESENTA:
RENÉ CARDEÑA DÁVILA

TUTOR PRINCIPAL

DR. GERMÁN BUITRÓN MÉNDEZ, INSTITUTO DE INGENIERÍA

COMITÉ TUTOR

DR. SIMÓN GONZÁLEZ MARTÍNEZ, INSTITUTO DE INGENIERÍA

DR. JAIME ALBERTO MORENO PÉREZ, INSTITUTO DE INGENIERÍA

DRA. BIBIANA CERCADO QUEZADA, CIDETEQ

DRA. GEORGINA FERNÁNDEZ VILLAGÓMEZ, FACULTAD DE INGENIERÍA

QUERÉTARO, QRO. MAYO 2018



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO:

Presidente:	Dr. Simón González Martínez
Secretario:	Dr. Jaime Alberto Moreno Pérez
1er. Vocal:	Dra. Bibiana Cercado Quezada
2do. Vocal:	Dra. Georgina Fernández Villagómez
3er. Vocal:	Dr. Germán Buitrón Méndez

Laboratorio de Investigación en Procesos Avanzados para el Tratamiento de Aguas
Unidad de Académica Juriquilla, Instituto de Ingeniería, Querétaro, Qro.

TUTOR DE TESIS:

DR. GERMÁN BUITRÓN MÉNDEZ

FIRMA

Esta investigación fue financiada por el Fondo de Sustentabilidad Energética SENER-
CONACYT por el proyecto **247006** del Clúster de Biocombustibles Gaseosos

Durante la realización del trabajo el autor recibió una beca académica del Consejo
Nacional de Ciencia y Tecnología (**378288**) y del Instituto de Ingeniería UNAM

DEDICATORIA

*A mis padres que son el motor de mi vida,
por todo lo que me han enseñado
y el llegar a este punto es gracias a ellos*

*A mis hermanos por todo lo que hemos vivido juntos,
soportarme y darme aliento en los momentos difíciles,
los quiero mucho*

*A la sociedad mexicana ya que este trabajo se realizó
gracias a las aportaciones monetarias que realizan,
espero que el conocimiento generado sea de mucha utilidad*

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Germán Buitrón Méndez, por la formación y el apoyo brindado a lo largo de los años que he pasado como su becario. Estoy muy agradecido por las oportunidades que me ha brindado y el permitirme trabajar a su lado. No olvidaré todo lo que he aprendido.

Al Dr. Simón Gonzalez por todos sus comentarios y aportaciones durante la realización del trabajo de investigación y que me permitió crecer profesional y personalmente.

A la Dra. Georgina Fernández, Dra. Bibiana Cercado, Dr. Jaime Moreno por acompañarme durante este trayecto y haber contribuido a que el trabajo de investigación mejorará con sus correcciones y comentarios.

A la M.C. Gloria Moreno no tengo palabras para expresar todo el gran afecto y cariño que le tengo. Porque siempre ha estado en los momentos bueno y malos y con grandes consejos que atesoro.

Al M.C. Jaime Pérez por todo el apoyo recibido y por esas pláticas laborales que siempre hicieron tan ameno el trabajo.

A mi mejor amiga Ángeles que a pesar de los años no cambia y me ha brindado siempre su apoyo. Gracias por todo. A Dianita que nunca dejará de ser mi Betty.

A Paco por todo lo que has aportado a mi vida. Gracias por todo el apoyo.

A Sonia mi amiguita que siempre estuvimos el uno para el otro en esos momentos tan complicados, la vida en el laboratorio no habría sido la misma sin ti. A Gerardo que siempre tenía comentarios interesantes y agradables para pensar en cosas diferentes al trabajo. A Eliane y Aidé ese año que convivimos ha sido de los mejores espero que nos volvamos a juntar los 3. A Majo y Lupita por las pláticas tan agradables y sin sentido que teníamos.

A Brisbane y Diddy que fueron las primeras estudiantes de estancia que tuve a mi cargo y me ayudaron y aprendimos juntos. A Sharon y Gamaliel por toda la ayuda que me brindaron, espero a verlos ayudado también. Un especial agradecimiento a Sarai que me ha ayudado grandemente en este último tramo del trabajo realizado.

En general a toda la comunidad de la Unidad Académica Juriquilla a la que considero mi segunda familia.

CONTENIDO

CONTENIDO	I
RESUMEN	VII
INTRODUCCIÓN	1
CAPÍTULO I	3
1. ANTECEDENTES	3
1.1 AGUAS RESIDUALES Y BIORREFINERÍA	3
1.1.1 <i>Hidrógeno</i>	4
1.1.2 <i>Fermentación oscura y limitantes termodinámicas</i>	4
1.2 CELDAS DE ELECTRÓLISIS MICROBIANAS	5
1.2.1 <i>Características y principios</i>	7
1.2.2 <i>Microorganismos y transferencia extracelular de electrones</i>	10
1.2.2.1 <i>Inóculo</i>	12
1.2.3 <i>Reactores y configuraciones</i>	13
1.2.4 <i>Cámara anódica</i>	17
1.2.4.1 <i>Ánodo</i>	17
1.2.4.2 <i>Anolito (Sustrato)</i>	18
1.2.4.2 <i>pH</i>	20
1.2.5 <i>Cámara catódica</i>	21
1.2.5.1 <i>Cátodo</i>	21
1.2.5.2 <i>Catolito</i>	25
1.2.5.3 <i>pH</i>	27
1.2.6 <i>Membranas</i>	27
1.2.7 <i>Parámetros operacionales</i>	28
1.2.7.1 <i>Voltaje aplicado y potencial anódico</i>	28
1.2.7.2 <i>Relación Anolito-Catolito-Cátodo-Voltaje</i>	29
1.2.7.3 <i>Temperatura</i>	30
1.3 TÉCNICAS ELECTROANALÍTICAS.....	30
1.3.1 <i>Cronoamperometría (CA)</i>	30
1.3.2 <i>Voltamperometría cíclica (VC)</i>	32
1.3 PERSPECTIVAS.....	32
CAPÍTULO II	35
2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	35
2.2 OBJETIVOS	36
2.2.1 <i>Objetivo general</i>	36
2.2.2 <i>Objetivos particulares</i>	36
2.2.3 <i>Alcances y limitaciones</i>	36

CAPÍTULO III	37
3. MATERIALES Y MÉTODOS	37
3.1 ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	37
3.2 ARQUITECTURA DE REACTORES Y CONFIGURACIÓN	39
3.3 MICROORGANISMOS Y ELECTROLITOS	41
3.4 FORMACIÓN DE BIOPELÍCULA ELECTROACTIVA Y OPERACIÓN DE CEM.....	42
3.5 TÉCNICAS ANALÍTICAS	44
3.5.1 Determinación de biogás.....	44
3.5.2 Determinación de DQO y metabolitos.....	44
3.5.3 Determinación de proteína celular.....	45
3.5.4 Análisis de la biopelícula microbiana	45
3.6 TÉCNICAS ELECTROANALÍTICAS.....	46
3.6.1 Cronoamperometría.....	46
3.7 CÁLCULOS PARA LA EVALUACIÓN DEL DESEMPEÑO DE LA CEM	47
3.7.1 Densidad de corriente	47
3.6.2 Eficiencia coulombica	47
3.6.3 Recuperación y rendimiento de hidrógeno en el cátodo.....	48
3.6.3 Eficiencia energética.....	49
CAPÍTULO IV	51
4. MEJORA DE LA PRODUCCIÓN DE HIDRÓGENO AL IMPLEMENTAR UNA ESTRATEGIA DE PUESTA EN MARCHA DISMINUYENDO EL POTENCIAL ANÓDICO EN CEMS	51
4.1 INTRODUCCIÓN	51
4.2 MATERIALES Y MÉTODOS.....	53
4.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN	54
4.3.1 Colonización.....	54
4.3.2 Efecto del E_{an} sobre la producción de H_2 en CEM	56
4.3.2 Efecto de la composición de sustrato sobre la producción de H_2 en CEM	58
4.3.2 Análisis de la biopelícula.....	61
4.4 CONCLUSIONES	66
CAPÍTULO V	67
5. ROBUSTEZ DE BIOPELÍCULA ELECTROACTIVA PARA LA PRODUCCIÓN DE HIDRÓGENO EN CEMS: PERTURBACIONES DE CARGA ORGÁNICA INICIAL Y POTENCIAL ANÓDICO	67
5.1 INTRODUCCIÓN	67
5.2 MATERIALES Y MÉTODOS.....	69
5.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	71
5.3.1 Efecto de la variación de DQO inicial sobre la producción de H_2 en CEM	71

5.3.2 Efecto de aplicar perturbaciones de E_{an} sobre la producción de H_2 en CEM.....	76
5.3.3 Análisis de la comunidad microbiana que forma las biopelículas	80
5.4 CONCLUSIONES	82
CAPÍTULO VI.....	84
6. INTERACCIÓN DEL PH DEL ANOLITO, CONCENTRACIÓN DE CATOLITO Y E_{AN} EN LA PRODUCCIÓN DE HIDRÓGENO EN CEMS.....	84
6.1 INTRODUCCIÓN	84
6.2 MATERIALES Y MÉTODOS.....	86
6.2.1 Diseño experimental – Central Compuesto	86
6.2.2 Reactores CEM y operación	88
6.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN	89
6.4 CONCLUSIONES	100
CAPÍTULO VII.....	101
CONCLUSIONES GENERALES	101
CAPÍTULO VIII	103
PERSPECTIVAS.....	103
PRODUCTOS.....	104
REFERENCIAS	106

Índice de Figuras

Figura 1.1 Biorrefinería de aguas residuales.....	3
Figura 1.2 Producción de ácidos grasos volátiles por fermentación oscura.....	5
Figura 1.3. Esquema de una celda de electrólisis microbiana de dos cámaras.	8
Figura 1.4. Esquema de los posibles mecanismos de transferencia extracelular de electrones en sistemas bioelectroquímicos (Kumar et al., 2012).	10
Figura 1.5. a) Efecto del pH inicial del anolito vs concentración de NaCl sobre la tasa de producción de hidrógeno (Nam and Logan, 2012), b) Tasas de producción de hidrógeno en 4 diferentes materiales a 2 pH iniciales (Ribot-Llobet et al., 2013).	29
Figura 1.6. Gráfica de una cronoamperometría en lote, inoculada con aguas residuales basada en el crecimiento de una biopelícula.....	31
Figura 1.7. 1) Voltamogramas cíclicos Nonturnover de una biopelícula con <i>G. sulfurreducen</i> . Velocidad de lectura: (A) 50 mV/s, (B) 1 mV/s; (C) recorte de B, lo que demuestra la densidad de corriente máxima (J_{pA}) y el potencial de pico respectivo (E_{pA}) del ánodo en los máximos. En correspondencia a los mínimos se muestran la densidad de corriente máxima (J_{pC}) y el potencial de pico respectivo (E_{pC}) del cátodo. El potencial E_f formal y la separación de pico ΔE_p . 2) Voltamogramas cíclicos Turnover (A) velocidad de barrido fue de 5 mV/s. (B) Primera derivada de la curva voltamétrica. Indicando cuales son los potenciales formales de los sitios reales TEE: $E^{f,2}$ y $E^{f,3}$	32
Figura 3.1. Estrategia experimental empleada para la evaluación de los factores que afectan la cámara anódica y catódica para la producción de hidrógeno.	37
Figura 3.2. CEM de dos cámaras con bordes cuadrados.....	39
Figura 3.3. Electrodo: A) Ánodo: Filtro de grafito; B) Cátodo: Espuma de níquel; C) Membrana: MIA-AMI 7001	40
Figura 3.4. Diseño optimizado de CEM de dos cámaras con bordes redondeados.....	41
Figura 3.5. Conexiones de la CEM al potencióstato: El electrodo de trabajo corresponde al ánodo en el cual se mantuvo fijo el potencial (filtro de grafito), el contraelectrodo es el cátodo (espuma de Ni) y el electrodo de referencia (Ag/AgCl) que se coloca junto al electrodo de trabajo (cámara anódica).	43
Figura 3.6. Arreglo experimental en laboratorio.....	43
Figura 4.1. Cronoamperometría general obtenida durante la actividad experimental.	55
Figura 4.2. Rendimiento: A) densidad de corriente y tasa de producción de hidrógeno; B) rendimiento y eficiencia coulombica de la CEM bajo diferentes condiciones de operación. Todos los resultados son duplicados. Las variables de respuesta se determinaron a partir de la media de $n = 6$ para la condición 1, $n = 12$ para la condición 2 y $n = 16$ para la condición 3. ($n =$ número de ciclos).....	57
Figura 4.3. Comparación de la remoción de metabolitos en las tres condiciones de operación. Todos los resultados son duplicados. Las variables de respuesta se determinaron a partir de la media de $n = 6$ para la condición 1, $n = 12$ para la condición 2 y $n = 16$ para la condición 3. ($n =$ número de ciclos).	60

Figura 4.4. Micrografías SEM del crecimiento de la biopelícula sobre el fieltro de grafito. A) control, B-D) biopelícula electroactiva sobre el ánodo observado después de más de 80 días de operación de la CEM. Las barras de escala se indican en la parte inferior izquierda para todas las imágenes (A-B: 20 μm , C: 2 μm , D: 1 μm).	63
Figura 4.5. Abundancia relativa en las comunidades microbianas: inóculo vs biopelícula electroactiva en los niveles de clase (A) phylum (B) y en el nivel de género (C) solo para la biopelícula.	64
Figura 5.1. A) CEM de bordes redondeados utilizadas para evaluar la robustez de la biopelícula electroactiva. B) Arreglo experimental utilizado para todas las pruebas realizadas.	69
Figura 5.2. Cronoamperometría obtenida durante la operación de una CEM con variación de la DQO_i	71
Figura 5.3. Tasas de producción de hidrógeno (Q) y densidades de corriente (j_v) obtenidas durante la evaluación de la DQO_i en CEM	73
Figura 5.4. Relación entre la biomasa adherida al ánodo y parámetros de respuesta al variar la DQO_i : A) eficiencia coulombica, DQO removida y recuperación de H_2 en el cátodo, B) recuperación total de H_2 , eficiencia energética total.	74
Figura 5.5. Relación entre la DQO alimentada y DQO removida.	76
Figura 5.6. Cronoamperometría obtenida durante la operación de una CEM con variación del E_{an}	77
Figura 5.7. Tasas de producción de hidrógeno (Q) y densidades de corriente (j_v) obtenidas durante la evaluación del E_{an} en CEM	78
Figura 5.8. Relación entre la biomasa adherida al ánodo y parámetros de respuesta al variar el E_{an} : A) eficiencia coulombica, DQO removida y recuperación de H_2 en el cátodo, B) recuperación total de H_2 , eficiencia energética total.	79
Figura 5.9 Abundancia relativa de los géneros microbianos presentes en las biopelículas al final de la operación de la CEM sometida a variaciones en: A) concentración inicial de sustrato y B) E_{an} . .	81
Figura 6.1. CEM de bordes redondeados utilizadas para evaluar la robustez de la biopelícula electroactiva y arreglo experimental utilizado para el DCC.	88
Figura 6.2. Densidad de corriente y tasa de producción de corrida 2 ($E_{an} = 0.8 \text{ V}$, 80 mM NaCl y pH 7.0).	89
Figura 6.3. Superficies de respuesta para el volumen de H_2 en función del pH del anolito, catolito (mM NaCl) y E_{an}	92
Figura 6.4. Superficies de respuesta para la Q en función del pH del anolito, catolito (mM NaCl) y E_{an}	93
Figura 6.5. Interacciones del pH del anolito, catolito (mM NaCl) y E_{an} respecto a la DQO removida.	94
Figura 6.6. Interacciones del pH del anolito, catolito (mM NaCl) y E_{an} respecto a la E_C	95
Figura 6.7. Interacciones del pH del anolito, catolito (mM NaCl) y E_{an} respecto a la r_{cat}	97

Figura 6.8. Interacciones del pH del anolito, catolito (mM NaCl) y E_{an} respecto al YH ₂	98
--	----

Índice de Tablas

Tabla 1.1. Composición de efluentes acidogénicos provenientes de fermentación oscura.	6
Tabla 1.2. Producción de hidrógeno en sistemas electroquímicos	9
Tabla 1.3. Descripción de configuraciones e inóculos utilizados durante el arranque de operación de CEMs.....	14
Tabla 1.5. Características y operación de diferentes CEM en función de sustratos utilizados.	22
Tabla 4.1. Características del efluente de la fermentación oscura del tratamiento de residuos alimenticios.	54
Tabla 4.2. Resumen de los resultados de la CEM a las diferentes condiciones operacionales.	58
Tabla 4.3. Resultados obtenidos en estudios que han utilizados efluentes acidogénicos como sustrato para la producción de hidrógeno en CEM (FO=Fermentación oscura).	62
Tabla 5.1. Concentraciones de sustrato evaluadas en CEM.	70
Tabla 5.2. Potenciales anódicos (E_{an}) evaluados en CEM.....	70
Tabla 5.3. Desempeño de la CEM obtenido de la variación de la concentración inicial de sustrato.	75
Tabla 5.4. Desempeño de la CEM obtenido de la variación del E_{an}	80
Tabla 6.1. Valores empleados en diseño experimental Central Compuesto.....	87
Tabla 6.2. Corridas arrojadas por el diseño central compuesto usando el Minitab 15.	87
Tabla 6.3. Desempeño de las pruebas en CEM obtenidos a partir de la evaluación de las pruebas arrojadas por el DCC.....	91

RESUMEN

El presente trabajo de investigación estudió los factores operacionales que afectan el funcionamiento de la cámara anódica y catódica dentro celdas de electrólisis microbianas de dos cámaras (CEM) para la producción de hidrógeno y usando como sustrato ácidos grasos volátiles. La CEM de dos cámaras ofrece la ventaja de obtener altas purzas de hidrógeno sin la necesidad de un postratamiento de purificación. Las CEMs utilizadas en esta investigación utilizaron fieltro de grafito como material para el ánodo por su alta área superficial y bicompatibilidad con microorganismos electroactivos. Para el cátodo se utilizó espuma de níquel ya que es un buen catalizador de hidrógeno por el bajo sobrepotencial que genera y su estabilidad en condiciones alcalinas.

Se desarrolló e implementó una estrategia de arranque en celdas de electrólisis microbiana de dos cámaras que redujó los tiempos de formación de la biopelícula electroactiva usando como presión de selección el potencial anódico (E_{an}) y como sustrato efluentes acidogénicos. La estrategia de puesta en marcha en la que E_{an} disminuye después de la formación de la biopelícula electroactiva mostró un aumento en la producción de hidrógeno. Se obtuvo una biopelícula electroactiva en 7 días mientras se usaba un E_{an} de 0.5 V. La tasa de producción de hidrógeno aumentó un 68% cuando se disminuyó el E_{an} a 0.3 V. El efluente acidogénico usado como sustrato que contenía más acetato en su composición produjo más hidrógeno. *Geobacter* sp fue el género bacteriano más abundante en la biopelícula.

Se evaluó la robustez de la biopelícula electroactiva a variaciones de concentración inicial de DQO y E_{an} sobre el desempeño de la CEM para la producción de hidrógeno. La variación de la concentración del sustrato afectó significativamente la biopelícula adherida al ánodo influyendo en los parámetros de respuesta. Para mantener un desempeño estable de la CEM es necesario mantener la concentración de sustrato en un rango regulado (± 0.5 g DQO/L). La recuperación de hidrógeno en el cátodo no se vio afectada por ninguna de las variaciones (DQO_i y E_{an}), lo que significa que la actividad catalítica de la espuma de níquel permanece constante brindando robustez al funcionamiento de la CEM. Mientras que la variación del E_{an} tuvo un efecto significativo sobre el crecimiento y actividad de la biopelícula electroactiva y ésta a su vez tuvo un efecto significativo sobre la producción de hidrógeno, remoción de DQO y densidad de corriente. Por tanto, es importante definir los E_{an} de

operación de los sistemas bioelectroquímicos productores de hidrógeno ya que variaciones prolongadas de este parámetro afectarán significativamente la actividad de las bacterias exoelectrogénicas que se encuentran sobre la biopelícula.

Por último, se evaluó la interacción entre el pH inicial del anolito, concentración del catolito (mM NaCl) y E_{an} aplicado sobre la producción de hidrógeno en CEM utilizando un diseño central compuesto para entender las interacciones y obtener condiciones de operación optimizadas. El potencial anódico fue la variable que tuvo un mayor impacto sobre el desempeño de los reactores CEM para la producción de hidrógeno. Los resultados obtenidos son prometedores ya que permiten aumentar de manera generalizada el desempeño de la CEM y no únicamente la producción de hidrógeno. La interacción entre el pH del anolito y el E_{an} es la que más se observó en las respuestas obtenidas por el diseño de superficie de respuesta a partir de la evaluación de las CEMs. E_{an} superiores a 0.55 V producen incertidumbre sobre el desempeño de la CEM e inestabilidad sobre la actividad de los microorganismos exoelectrogénicos. Las diferencias en el rendimiento del ánodo a distintos E_{an} establecidos sugieren que las comunidades exoelectrogénicas autorregulan sus vías de transferencia de electrones exocelulares para adaptarse a diferentes potenciales del ánodo. Aunque las máximas tasas de producción de H_2 se dan a E_{an} inferiores de 0.2 V y pH de 9.4 el desempeño de la CEM no es el mejor a esas condiciones. Las condiciones optimizadas obtenidas se encontraron en los siguientes rangos: para el $E_{an} = 0.2 - 0.3$ V, el pH del anolito entre 8.4 - 8.8 y la concentración del catolito de 110 a 150 mM de NaCl. Los microorganismos exoelectrogénicos tienen un mejor desempeño a pHs alcalinos y se desenvuelven mejor a potenciales anódicos inferiores a 0.3 V mejorando el desempeño de la CEM para la producción de hidrógeno.

INTRODUCCIÓN

El agotamiento de los combustibles fósiles y el daño que ocasionan al medio ambiente principalmente por los gases de efecto invernadero que producen durante su combustión y el calentamiento global que provocan es motivo para la transición hacia fuentes de energías renovables. Dentro de la misma problemática ambiental los residuos que se generan han ido en aumento por la demanda de productos y servicios de la creciente población humana. Las aguas residuales son parte de los desechos generados por la sociedad moderna; en México se producen 444 m³/s de aguas residuales (CONAGUA 2016). La infraestructura actual de plantas de tratamiento hace imposible tratar el 100 % de las aguas residuales (únicamente 20 % de la DBO₅ es removida). El problema se agudiza cuando el enfoque recae sobre las aguas residuales no municipales donde únicamente se remueve el 14 % de la DBO₅ generada a pesar de reportarse una cobertura de tratamiento del 33 % (CONAGUA, 2016).

Los procesos biológicos es la etapa más importante y necesaria para el tratamiento de agua, poseen una versatilidad tan amplia que se pueden obtener productos de valor agregado a partir de la misma. Estos productos son amigables con el medio ambiente debido a su forma de obtención (microorganismos). Dentro de estos productos los biocombustibles son una de las opciones más estudiadas y el H₂ la opción más alentadora por el alto poder energético que posee (Meher Kotay y Das, 2008).

Hasta ahora, la generación de biohidrógeno a escala se ha realizado a través de la denominada vía de fermentación oscura. La fermentación oscura presenta las siguientes ventajas: tasas de producción de gas rápidas, requisitos de diseño de reactor relativamente fáciles y ofrece la posibilidad de la valorización de una amplia gama de materia orgánica, para ejemplo, los residuos sólidos derivados de la biomasa y las aguas residuales (Bakonyi *et al.*, 2017, 2018; Gómez *et al.*, 2011). Algunos de los problemas que presenta la fermentación oscura son los bajos rendimientos de hidrógeno, que se atribuye a la formación de productos secundarios de fermentación denominados metabolitos solubles tales como ácidos grasos volátiles (AGVs) (Venkata Mohan *et al.*, 2016). Por lo que se buscan aplicaciones secuenciales en sentido descendente. Estas aplicaciones o subprocesos tienen como objetivo tratar y explotar el efluente acidogénico proveniente del fermentador oscuro rico en AGVs y, al mismo tiempo,

garantizar la producción de portadores adicionales de energía gaseosa para la maximización de la eficiencia energética (Ghimire *et al.*, 2015; Guwy *et al.*, 2011).

Las celdas de electrólisis microbianas tienen un alto potencial aplicable para gestionar (degradar y valorizar) los metabolitos residuales provenientes del fermentador oscuro (Boboescu *et al.*, 2016; Kadier *et al.*, 2016; Lu y Ren, 2016). La arquitectura tradicional de una CEM es un diseño de dos cámaras, donde los compartimentos del ánodo y del cátodo están espacialmente separados en una cámara anódica y catódica por una membrana de intercambio iónico y al mismo tiempo, los electrodos están conectados a través de un cableado externo (Logan *et al.*, 2008; Rozendal *et al.*, 2007). Bacterias electroquímicamente activas (denominadas exoelectrogénicas), se encuentran en la biopelícula que se forma en la superficie del ánodo. Tienen la capacidad de oxidar la materia orgánica, por ejemplo: aguas residuales incluyendo el efluente de los biorreactores productores de hidrógeno (Escapa *et al.*, 2016; Oh y Logan, 2005; Yang *et al.*, 2015).

Las CEM requieren cierta energía aplicada para que la formación de hidrógeno tenga lugar en la cámara catódica anaerobia (Logan *et al.*, 2008). En condiciones estándar de temperatura y presión con acetato como sustrato, la demanda de la diferencia de potencial adicional puede estar por encima de 0.25 V, debido a las pérdidas del sistema y resistencias internas (Zhen *et al.*, 2017). Sin embargo, esta demanda de energía es considerablemente menor que en el caso de la electrólisis del agua, donde se requieren al menos 1.2 V (Geelhoed *et al.*, 2010) o incluso de 1.8 a 2.0 V pueden ser necesarios (Logan, 2008). La ventaja de las CEM de dos cámaras separadas radica en que el hidrógeno producido está menos contaminado y, por lo tanto, se obtiene con mayor pureza (Kumar *et al.*, 2017). En consecuencia, en estos casos, el hidrógeno tiene que someterse a una separación menos sofisticada, lo que implica beneficios definitivos desde el punto de vista económico. Adicionalmente, se ha puesto de manifiesto que la introducción de la CEM para pulir el efluente proveniente del fermentador oscuro podría conducir a rendimientos globales de hidrógeno de 9.6 mol H₂/mol de glucosa (Lalaurette *et al.*, 2009), lo que representa 80% del máximo teórico. Por lo tanto, la producción de biohidrógeno por fermentación oscura integrada con CEM tiene muchas expectativas.

CAPÍTULO I

1. ANTECEDENTES

1.1 AGUAS RESIDUALES Y BIORREFINERÍA

Las aguas residuales se pueden considerar como materia prima para la obtención de productos de alto valor agregado; en este sentido la biorrefinería ha surgido como una alternativa potencial de la refinería a base de petróleo. El término “biorrefinería” es un concepto que se ha utilizado para ver a la biomasa como una alternativa al petróleo como materia prima y a través de diversos procesos (químicos, físicos y biológico) se pueda transformar la biomasa en una amplia gama de productos, tales como biocombustibles, productos químicos industriales y biomateriales.

La biorrefinería (Fig. 1.1) surge como una opción para dar tratamiento a aguas residuales especialmente aquellas que poseen una alta concentración de carbohidratos (agroindustriales, industria alimentaria y de confitería) de este modo se obtiene un doble beneficio: el tratamiento y obtención de productos de valor agregado. En una primera etapa las aguas residuales se tratan por fermentación oscura, aquí se produce hidrógeno. Se selecciona este proceso ya que una amplia variedad de bacterias heterótrofas tiene la capacidad de fermentar los carbohidratos en condiciones anaerobias para producir hidrógeno y dióxido de carbono (Vazquez y Varaldo, 2009) y a su vez estas bacterias pueden usar una amplia variedad de sustratos orgánicos como fuentes de carbono (Chen y Chang, 2006).



Figura 1.1 Biorrefinería de aguas residuales.

1.1.1 Hidrógeno

El hidrógeno debido a su alto contenido energético, la nula emisión de contaminantes después de la combustión y la fácil disponibilidad de sustratos para su producción biológica se ha identificado como una alternativa modelo para las fuentes de energía convencionales basadas en el carbono (Das y Veziroglu, 2008; Das y Veziroğlu, 2001). Los métodos más comunes de producción de hidrógeno a escala industrial son principalmente el reformado con vapor a partir de hidrocarburos, la pirólisis, la reformación del plasma, la división electrolítica del agua (Holladay *et al.*, 2009). No obstante, tales métodos de producción de hidrógeno son altamente intensivos en energía y costos.

El biohidrógeno es el hidrógeno producido por medios biológicos por acción de bacterias, algas o arqueas mediante la degradación de biomasa o materiales de desecho. La principal ventaja de los métodos biológicos de producción de hidrógeno es que se llevan a cabo a temperatura y presión ambiente. Además, estos procesos reducen en gran medida los requerimientos energéticos, costos de transporte y de insumos, ya que pueden instalarse en niveles de pequeña escala donde se dispone de abundante biomasa o residuos (Meher Kotay y Das, 2008). Los métodos biológicos de producción de hidrógeno, como las reacciones de fermentación (oscura y luminosa) o la biofotólisis son los métodos más comúnmente estudiados, pero dan como resultado un rendimiento y una tasa bajos.

1.1.2 Fermentación oscura y limitantes termodinámicas

La fermentación oscura es el proceso biológico mediante el cual se puede obtener biohidrógeno a partir de residuos orgánicos en ausencia de luz y por la acción combinada de bacterias anaerobias (Argun y Kargi, 2011). Durante la fermentación oscura las moléculas complejas se transforman en monómeros simples, estos son más fáciles de asimilar por los microorganismos y de esta forma se produce el hidrógeno (Fig. 1.2) Sin embargo, independientemente de los rendimientos finales de hidrógeno alcanzados durante la fermentación oscura no se esperan remociones eficientes de la Demanda Química de Oxígeno (DQO) ya que los hidratos de carbono se transforman en compuestos solubles más oxidados, permaneciendo en la fase líquida en forma de diversos ácidos grasos volátiles (AGVs) con un alto contenido de carbono (ácido acético, propiónico y butírico) y solventes (etanol). Por consiguiente, la acidificación que se presenta durante la fermentación oscura se acompaña de una limitada remoción de DQO. Además del carbono que permanece atrapado en los productos de oxidación generados, una notable cantidad de hidrógeno también permanece

atrapado en estos compuestos, lo que resulta en rendimientos de hidrógeno finales en el intervalo de aproximadamente 1 – 2 moles H_2 /mol de glucosa. Incluso en condiciones óptimas de 4 moles H_2 /mol de glucosa, aproximadamente el 60 – 70 % de la materia orgánica de la alimentación permanece en solución (Ntaikou *et al.*, 2010).

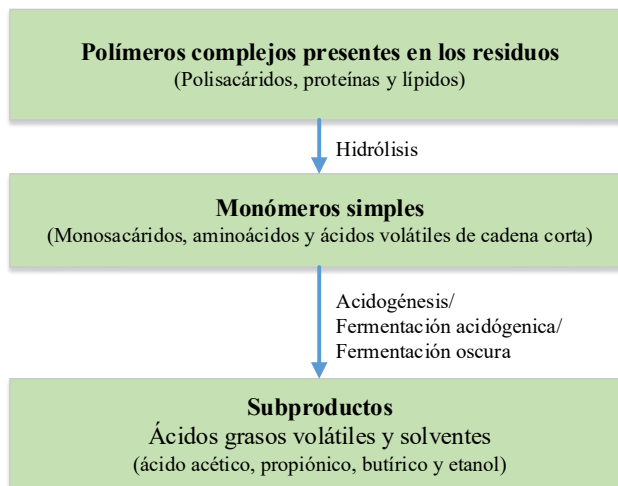


Figura 1.2 Producción de ácidos grasos volátiles por fermentación oscura.

El residuo líquido proveniente de la fermentación oscura presenta una amplia variedad de metabolitos: ácido acético, ácido butírico, ácido propiónico, ácido succínico, ácido láctico, etanol y propanodiol, esta composición del efluente de la fermentación oscura (EFO) depende del tipo de sustrato, microorganismos presentes, la duración y el pH del proceso. En la Tabla 1.1 se presentan algunos ejemplos de composiciones reportados en la literatura para algunos efluentes de fermentadores oscuros. Estos metabolitos han resultado tener un alto valor comercial.

1.2 CELDAS DE ELECTRÓLISIS MICROBIANAS

La electrohidrogenesis es el proceso bioelectroquímico por el cual los microorganismos exoelectrogénicos oxidan la materia orgánica a protones y electrones, que a su vez se reducen para formar hidrógeno gaseoso (Cheng y Logan, 2007; Wrana *et al.*, 2010). Este proceso se ha identificado como una tecnología ideal para la producción de hidrógeno que supera a otros métodos biológicos con respecto al rendimiento de producción, la velocidad y la eficiencia energética. La producción de hidrógeno a partir de la oxidación casi completa de los sustratos orgánicos asegura que sea un proceso económico y energéticamente eficiente. Aunque, es necesario optimizar una serie de parámetros que rigen el proceso para lograr la máxima eficiencia del proceso (Parkhey y Gupta, 2017).

Tabla 1.1. Composición de efluentes acidogénicos provenientes de fermentación oscura.

pH	Tipo de Proceso	Sustrato usado	Composición del efluente (mM)				Referencia
			Acetato	Propionato	Butirato	Etanol	
5-7	Mesófilo	Lodos residuales de PTAR	10.4 – 21.0	0.3 – 6.5	29.5 – 36.0	1.3 – 6.3	(Horiuchi <i>et al.</i> , 2002)
8	Mesófilo	Lodos residuales de PTAR	41.3 – 49	19.2 – 24.1	2.8 – 5.9	2.6 – 11.3	(Horiuchi <i>et al.</i> , 2002)
5.2	Mesófilo	Sacarosa refinada	17 - 27		33 - 39	2.0	(Hussy <i>et al.</i> , 2005)
5	Mesófilo	Residuos sólidos urbanos	16.7	8.1	31.8	21.7	(Lay <i>et al.</i> , 1999)
6.8	Mesófilo	Lodos residuales de PTAR	40.7	23.3	85.7	33.7	(Lin y Lay, 2005)
4.5-6.5	Termófilo	Residuos alimentarios	1.1 – 4.2	0	7.4 – 10.5		(Shin <i>et al.</i> , 2004)
4.5-6.5	Mesófilo	Residuos alimentarios	3.1 – 8.7	1.9 – 6.2	2.0 – 7.1		(Shin <i>et al.</i> , 2004)
5	Mesófilo	Residuos vegetales y de frutas	83.3	37.0	250.0		(Fascetti <i>et al.</i> , 1998)
5-6.5	Mesófilo	Melazas	9 – 21.6	0 – 2.7	1.2 – 2.3	32 – 60	(Ren <i>et al.</i> , 2006)
6.6	Mesófilo	Estiércol y lodos de ganado	12.6	0.5	0.9		(Tao <i>et al.</i> , 2007)
3.7-4.8	Mesófilo	Estiércol y lodos de ganado	14.3 – 20.2	0.8 – 1.3	48.1 – 143.1		(Tao <i>et al.</i> , 2007)
6.0	Mesófilo	Sacarosa	15 -40	45	30 – 35		(Khanal <i>et al.</i> , 2004)
6.0	Mesófilo	Almidón	7	20	14		(Khanal <i>et al.</i> , 2004)
5.2-6.4	Termófilo	Glucosa ^a	7.5 – 10.8	3.9	3.5 – 13.1	0.2 – 0.7	(Gavala <i>et al.</i> , 2006)
4.9-6.0	Mesófilo	Glucosa ^b	3.2 – 10.6		6.5 – 22.2	0.5 – 10.6	(Gavala <i>et al.</i> , 2006)
4.5	Mesófilo	Glucosa ^c	29.2 – 41.0		23 – 30.4	1.3 – 2.4	(Gavala <i>et al.</i> , 2006)

^aCSTR 0-11.4 mM de lactato^bCSTR 2.4-8.4 mM de lactato^cUASB 0-5 mM de lactato

Las celdas de electrólisis microbianas (CEMs) forman parte de los sistemas bioelectroquímicos microbianos, las cuales han sido desarrolladas para la producción biológica de hidrógeno a partir de residuos (Logan *et al.*, 2008; Rozendal, Hamelers, Euverink, *et al.*, 2006). En comparación con las tecnologías biológicas tradicionales, la electrohidrogénesis en CEM puede superar las limitaciones termodinámicas y lograr la producción de hidrógeno de alto rendimiento a partir de la amplia gama de materia orgánica en condiciones relativamente moderadas pueden utilizar cualquier compuesto orgánico biodegradable como carbohidratos, proteínas, efluentes industriales y agro-desechos como sustrato para la producción de hidrógeno (Parkhey y Gupta, 2017). Este enfoque reduce en gran medida el costo de la energía eléctrica para la producción de hidrógeno al compararlo con la electrólisis directa del agua ya que las tasas y rendimientos son mucho más altos y con eficiencias energéticas más altas que otras rutas biológicas de producción de hidrógeno. Además de la producción de hidrógeno, las CEM también pueden llevar a cabo la síntesis de productos químicos, la eliminación de contaminantes recalcitrantes y la recuperación de recursos. Las CEMs se están convirtiendo en una tecnología de plataforma versátil y ofrecen una nueva solución para los nuevos problemas ambientales relacionados con los flujos de residuos de tratamiento, recuperación de energía y recursos (Parkhey y Gupta, 2017).

1.2.1 Características y principios

Las CEMs también son conocidas como celdas de electrólisis biocatalizadas ya que el proceso implica la electrólisis biocatalizada de materia orgánica, o reactor microbiano asistido bioelectroquímicamente ya que se debe aplicar una tensión externa adicional para llevar a cabo el proceso.

Las CEMs sintetizan hidrógeno o metano a partir de material orgánico mediante la aplicación de una corriente eléctrica. El hidrógeno o el metano producido se pueden utilizar para generar electricidad por medio de una celda adicional de combustible PEM o un motor de combustión interna (Liu *et al.*, 2012). La producción bioelectroquímica de hidrógeno es el resultado del acoplamiento de la microbiología y la electroquímica, esto ha traído un especial interés dado que se permite la extracción de hidrógeno a partir de los productos finales de la fermentación oscura (Liu *et al.*, 2005; Logan *et al.*, 2008).

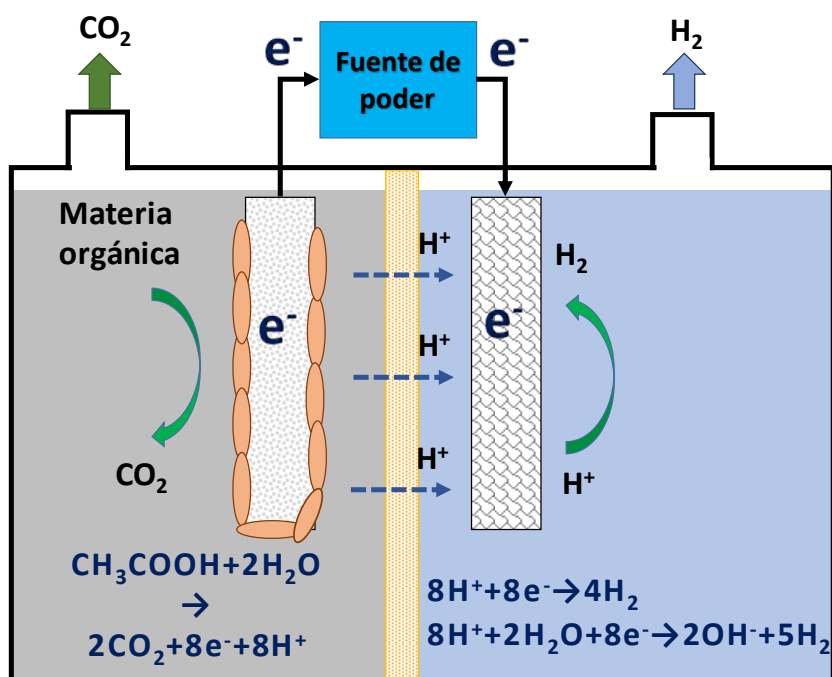


Figura 1.3. Esquema de una celda de electrólisis microbiana de dos cámaras.

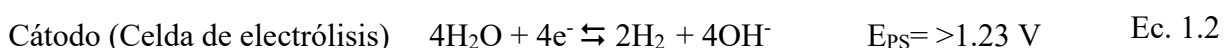
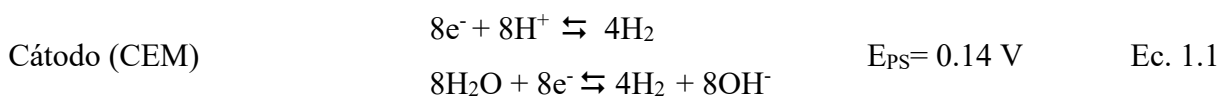
La CEM tiene dos cámaras de reacción, anódica y catódica ambas cámaras suelen estar separadas por una membrana de intercambio iónico (Fig. 1.3). En la cámara anódica de los sistemas bioelectroquímicos se forma una biopelícula sobre la superficie del ánodo, la cual posee mayoritariamente bacterias exoelectrogénicas que son los microorganismos anaerobios que han evolucionado de tal forma que pueden transferir electrones fuera de la célula, lo que les permite ser utilizados en la CEM. Estos exoelectrógenos o bacterias generadoras de electrones exocelulares forman una biopelícula en la superficie del ánodo y se encargan de oxidar la materia orgánica (donador de electrones), liberando los electrones terminales fuera de la célula; durante el proceso también se generan protones y CO_2 . Los electrones liberados son capturados por un electrodo anódico viajando a través de un circuito externo hacia el cátodo. El cátodo de la CEM se mantiene en condiciones anaerobias y dado que no hay aceptor final de electrones en la cámara catódica, los electrones liberados de las bacterias exoelectrogénicas deben forzarse a través del circuito. Esto se hace aplicando una pequeña tensión externa (0.2 V mínimo) a través de la celda. En presencia de una fuente de energía externa, los electrones liberados viajan a la cámara catódica de la celda electrolítica y reducen los protones para producir gas hidrógeno que se puede colectar por separado. El voltaje adicional es necesario ya que la producción de hidrógeno en CEM no es espontánea o termodinámicamente favorable (Logan *et al.*, 2008). Con el fin de producir hidrógeno en el cátodo producto de la combinación de protones y electrones, se necesita un potencial catódico, ya que los potenciales de equilibrio de las reacciones individuales en las condiciones microbianas (pH 7, 1 M

acetato, 1 bar), la fuerza electromotriz (fem) (=potencial del cátodo-potencial del ánodo) de esta reacción es -0.14 V, por lo que se requiere energía eléctrica adicional para apoyar la formación de hidrógeno electrolítico (Lohner, 2014).

Tabla 1.2. Producción de hidrógeno en sistemas electroquímicos

	Celda de combustible microbiano (CCM)	E ⁰ [V]	Celda de electrólisis microbiana (CEM)	E ⁰ [V]	Electrólisis del agua	E ⁰ [V]
Ánodo	$C_2H_4O_2 + 2H_2O \rightleftharpoons 2CO_2 + 8e^- + 8H^+$	-0.28	$C_2H_4O_2 + 2H_2O \rightleftharpoons 2CO_2 + 8e^- + 8H^+$	-0.28	$2H_2O \rightleftharpoons O_2 + 4e^- + 4H^+$	0.81
Cátodo	$2O_2 + 8e^- + 8H^+ \rightleftharpoons 4H_2O$	0.81	$8e^- + 8H^+ \rightleftharpoons 4H_2$	-0.42	$4H_2O + 4e^- \rightleftharpoons 2H_2 + 4OH^-$	-0.42
Total	$C_2H_4O_2 + 2O_2 \rightleftharpoons 2H_2O + 2CO_2$	1.09	$C_2H_4O_2 + 2H_2O \rightleftharpoons 4H_2 + 2CO_2$	-0.14	$2H_2O \rightleftharpoons 2H_2 + O_2$	-1.23

En la tabla anterior se muestran las reacciones en los electrodos de 2 sistemas bioelectroquímicos (CCM y CEM) y para un sistema abiótico (electrólisis del agua). Las E⁰, son los potenciales de equilibrio a condiciones microbianas (pH 7, acetato: 1 M y 1 bar).



Al comparar la Ec. 1.1 y 1.2 se puede observar que el proceso abiótico tiene un requerimiento energético 10 veces mayor al del proceso bioelectroquímico. Sin embargo, los electrolizadores y CEM reales requieren voltajes más altos para que las reacciones de reducción a hidrógeno se lleven a cabo 1.48 y 0.2 V respectivamente, este voltaje extra requerido se conoce como sobrepotencial. Este sobrepotencial representa una pérdida energética ocasionada por resistencias eléctricas internas en los reactores. Teóricamente las CEM requieren un mínimo de 0.2 V, en la práctica la evolución del hidrógeno en el cátodo requiere un potencial de entrada en el rango de 0.6-0.8 V. La eficiencia energética del proceso de evolución del hidrógeno depende en gran medida del voltaje de entrada, que a su vez depende del sustrato que se utiliza. Mientras que algunos informes revelan una eficiencia energética máxima a voltajes de entrada de 0.5 V, muchos otros también reportan una eficiencia máxima de 0.8 o incluso 1.0 V. La eficiencia de la producción de hidrógeno depende de diversos factores: sustrato, electrodos, electrolitos (Cheng y Logan, 2007; Liu *et al.*, 2005; Logan *et al.*, 2008).

1.2.2 Microorganismos y transferencia extracelular de electrones

Los microorganismos asociados con las interfaces (biopelículas y bioagregados) son algo común en la vida microbiana. En muchas biopelículas las células microbianas junto con sustancias poliméricas extracelulares (SPE), son comúnmente asociadas con un sustrato sólido (Flemming y Wingender, 2010). Las biopelículas microbianas electroactivas pueden ser definidas como biopelículas microbianas que intercambian electrones con su sustrato conductor a través de reacciones de oxidación y/o de reducción. Estas se pueden encontrar en cualquier ambiente (Schroeder y Harnisch, 2014).

Como en todo proceso biológico los microorganismos son pieza clave para la degradación de la materia orgánica y para la producción de hidrógeno que se ven afectados por la generación y transmisión de electrones extracelulares. Se sabe que las principales bacterias exoelectrogénicas son: *Geobacter sulfurreducens*, *Desulfuromonas acetoxidans*, *Shewanella putrefaciens*, *Rhodospirillum rubrum*, *Geothrix*, *Desulfuromonas*, *Pseudomonas*, *Enterobacter cloacae* y *Rhodopseudomonas*.

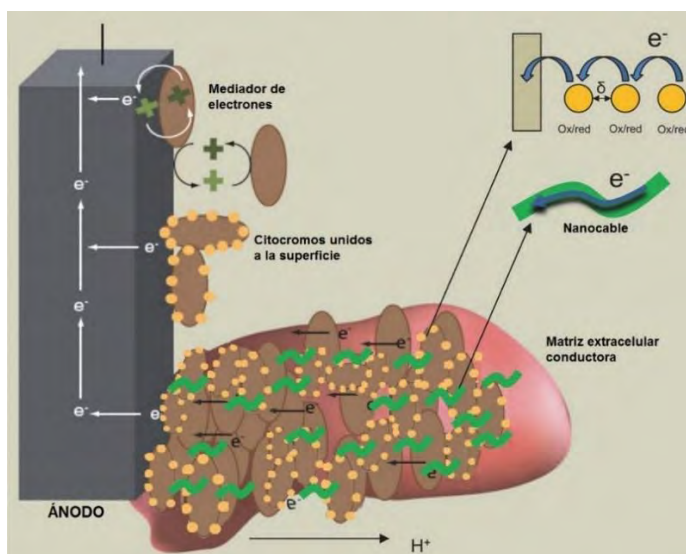


Figura 1.4. Esquema de los posibles mecanismos de transferencia extracelular de electrones en sistemas bioelectroquímicos (Kumar *et al.*, 2012).

Los exoelectrógenos más utilizados que han estado en sistemas bioelectroquímicos pertenecen a la familia de las Gammaproteobacterias o Deltaproteobacterias. *Shewanella onediensis* y *Shewanella putrefaciens* que pertenecen a la familia de Gammaproteobacteria y *Geobacter sulfurreducens* que pertenecen a la familia de Deltaproteobacteria son las bacterias exoelectrogénicas más comúnmente reportadas para la producción de hidrógeno. Las bacterias que pertenecen a otro grupo

genético como Alphaproteobacteria (*Rhodopseudomonas*, *Ochrobactrum*), Betaproteobacteria (*Rhodoferax*), Epsilonproteobacteria (*Arcobacter*), Actinobacteria (*Propionibacterium*), Firmicutes (*Clostridium*), Acidobacteria (*Geothrix*) también han sido reportadas (Kadier *et al.*, 2016). Estas bacterias de respiración anódica involucran cualquiera de los tres mecanismos para la transferencia de electrones extracelular (Fig. 1.3) (Schröder, 2007). El primer mecanismo es el contacto directo, en el que los exoelectrógenos transfieren directamente el electrón a través de su membrana externa a la región donde la biopelícula está en contacto con el ánodo (Torres *et al.*, 2010). Este mecanismo tiene la menor pérdida de potencial extracelular, sin embargo, una alta densidad de corriente se puede lograr sólo con un alto contacto superficial entre el ánodo y la biomasa, como una monocapa (Torres *et al.*, 2010). El segundo mecanismo se da mediante el transporte soluble de electrones, como las quinonas (*Shewanella putrefaciens*), las fenazinas (*Shewanella oneidensis* MR 1) y las flavinas (*Shewanella*) (Parkhey y Gupta, 2017; Rabaey *et al.*, 2005). Este mecanismo da como resultado una pérdida de potencial ya que el transporte difusivo de electrones requiere un gradiente de concentración (Torres *et al.*, 2010). El tercer mecanismo de transferencia de electrones es a través de nanoalambres o apéndices de conexión que se reporta con mayor frecuencia en *Shewanella* y *Geobacter* (El-Naggar *et al.*, 2010; Gorby *et al.*, 2006; Reguera *et al.*, 2005). *Shewanella* y *Geobacter* son los géneros más estudiados para la transferencia de electrones en sistemas bioelectroquímicos. La presencia de estos microorganismos en la producción de hidrógeno en reactores CEM se ha demostrado por Kiely *et al.* (Kiely *et al.*, 2011a; Kiely *et al.*, 2011b). Ellos, en su análisis de comunidades microbianas anódicas reportan que la familia Geobacteraceae tiene mayores densidades de potencia que las CEM con diversas comunidades bacterianas.

Se ha logrado identificar la sintrofia (colaboración de varias especies para realizar una reacción química que, de otra forma, sería desfavorable energéticamente) entre las bacterias exoelectrogénicas con microorganismos fermentadores, estos últimos descomponen la materia orgánica compleja en compuestos más simples como el acetato, el cual es fácilmente consumido por los microorganismos presentes en la biopelícula que respiran en el ánodo (Gao *et al.*, 2014).

La presencia de las bacterias exoelectrogénicas que forman la biopelícula electroactiva sobre el ánodo se ve altamente influenciada por las siguientes condiciones: 1) forma en la que se da la inoculación ya sea que se ocupe una cepa pura o un consorcio mixto que contenga diversidad microbiana. Se ha encontrado que tienden a predominar los siguientes géneros: *Shewanella*,

Pseudomonas, *Geobacter* y *Bradyrhizobium* (Wang *et al.*, 2010). La fuente del inóculo incluye aguas residuales municipales (Lu *et al.*, 2009), suelo (Cheng y Logan, 2007), aguas residuales de origen ganadero (Wagner *et al.*, 2009) o aguas residuales industriales (Lalaurette *et al.*, 2009); 2) el material que se utilice como ánodo (Sun *et al.*, 2011). *Geobacter* predomina en gránulos de carbón activado y materiales de carbono; mientras en partículas de grafito es *Azospira*; y 3) dependiendo del sustrato utilizado (Kiely *et al.*, 2011b). *Geobacter* es predominante en acetato de sodio mientras que en ácido butírico predomina *Firmicutes*.

1.2.2.1 Inóculo

La operación de CEM puede utilizar cultivos puros y mixtos para la inoculación. Utilizar cepas puras es importante para llevar a cabo estudios que requieren cierto control y comprensión de determinados fenómenos especialmente cuando se trata de los mecanismos de transferencia de electrones en las bacterias exoelectrogénicas (Hasany *et al.*, 2016). Otro uso de las cepas puras es el relacionado con la bioaugmentación que consiste en reforzar poblaciones mixtas y obtener un mejor equilibrio microbiano, que deberá conducir a una mayor actividad y estabilidad de la biopelícula exoelectrogénica durante la operación de la CEM (Butti *et al.*, 2016; Kumar *et al.*, 2016).

Sin embargo, los cultivos mixtos se consideran más prácticos ya que la diversidad microbiana en la mayoría de los casos genera corrientes más altas y una mayor estabilidad (Liu *et al.*, 2010). Además, ofrecen una mayor versatilidad y flexibilidad al no requerir condiciones estériles. Los consorcios heterogéneos de bacterias que habitan naturalmente en aguas residuales y lodos se han utilizado de manera eficiente como fuente de inóculo para la producción de hidrógeno en CEM (Cusick *et al.*, 2011, 2010; Ditzig *et al.*, 2007; Tenca *et al.*, 2013; Wagner *et al.*, 2009). Los cultivos mixtos presentes en aguas residuales ofrecen una doble ventaja sobre los monocultivos. En primer lugar, son más resistentes a los cambios ambientales y, por lo tanto, son fáciles de cultivar y operar en una CEM (Liu *et al.*, 2010). En segundo lugar, la interacción entre especies que tiene lugar en los cultivos mixtos da lugar a densidades de corriente más altas, que de otro modo no se dan individualmente con cultivos puros (Liu *et al.*, 2010).

Dependiendo de la fuente de inóculo se pueden encontrar variaciones en: la puesta en marcha de la CEM y el comportamiento durante la operación (Kumar *et al.*, 2017). Ruiz *et al.*, (2014) encontraron que el inóculo juega un papel importante en el desarrollo de consorcios microbianos

ya que determina la estructura de la comunidad microbiana. Encontrando que reactores CEM con mayor diversidad y distribución uniforme de los microorganismos (*Proteobacteria*, *Firmicutes* y *Bacteroidetes*) tuvo una mayor tasa de producción de hidrógeno que reactores CEM en los que la biopelícula se componía principalmente por *Proteobacteria*, demostrando la importancia de las interacciones sintróficas entre las bacterias.

La inoculación se puede dar a partir de dos enfoques: modo directo o indirecto (Tabla 1.3). El modo directo se da cuando la inoculación y adaptación se da en un solo paso directamente en el reactor CEM y el modo indirecto utiliza dos pasos, primeramente el reactor se opera como CCM para aclimatar los biocatalizadores y desarrollar bioánodos estables posteriormente, los bioánodos se transfieren al reactor CEM o se utilizan en el mismo reactor modificando las condiciones de operación (Kumar *et al.*, 2017). El modo CCM es la forma más utilizada para enriquecer la biopelícula en el ánodo. Cuando el máximo voltaje reaparece por lo menos en tres ciclos, el ánodo se transfiere a la CEM (Kiely *et al.*, 2011b). Durante el proceso, se ha comprobado que sobre la biopelícula predomina *Geobacter Sulfurreducens* (Kiely *et al.*, 2011c).

1.2.3 Reactores y configuraciones

La estructura de los reactores CEM también afecta el rendimiento de la densidad de corriente e hidrógeno a través de la resistencia interna. Respecto a la membrana de intercambio iónico, los reactores se pueden dividir en: con membrana y sin membrana; mientras que acorde al número de cámaras que se presentan pueden ser de: una cámara y dos cámaras. En general, destacan tres arquitecturas CEM: i) la tipo H que consiste en dos botes separados por una membrana, poseen una estructura simple y las cámaras están separadas para prevenir el mezclado del oxígeno e hidrógeno; pero el espacio entre los electrodos puede causar una gran resistencia en el sistema, ii) la tipo cubo de una cámara sin membrana incrementa significativamente la densidad de corriente y la tasa de recuperación de hidrógeno, mejora el desempeño de la reacción; pero el hidrógeno puede ser usado en la metanogénesis y iii) la tipo rectangular de dos cámaras separadas por una membrana la cual previene la mezcla del hidrógeno en el ánodo pero incrementa el gradiente de pH (Zhu *et al.*, 2014).

Tabla 1.3. Descripción de configuraciones e inóculos utilizados durante el arranque de operación de CEMs.

Modo de arranque	Diseño de CEM	Membrana	Inóculo	Sustrato	Material de ánodo	Material de cátodo	Anolito	Catolito	Referencia
Directo	Dos cámaras	Nafion®117 PEM	Lodos activados	Acetato de sodio	Gránulos de grafito	Gránulos de grafito	Medio anaerobio (pH: 7–7.5)	Medio anaerobio (pH: 7–7.5)	(Villano <i>et al.</i> , 2012)
Directo	Dos cámaras	Rhinohide®	Aguas residuales	Aguas residuales municipales	Filtro de carbono	Fibra de acero inoxidable	-	Buffer de fosfatos esterilizado (50 mM, pH: 7)	(Heidrich <i>et al.</i> , 2014)
Directo	Dos cámaras	Neosepta® AEM	Efluente CEM	Acetato de sodio	Filtro de grafito	Espuma de Níquel	Medio de nutriente microbiano	0.1 M KCl	(Jeremiasse <i>et al.</i> , 2010)
Directo	Dos cámaras	Nafion®117 PEM	Lodos activados	Acetato de sodio	Tela de carbono	Papel carbono con platino	Solución de nutrientes (pH: 6.9)	Buffer de fosfatos (50 mM, pH: 7)	(Wang <i>et al.</i> , 2010a)
Directo	Dos cámaras	Nafion®117 PEM	Lodo de aguas residuales	Acetato de sodio	Tela de carbono	Papel carbono con platino	Solución de nutrientes (pH: 7)	Buffer de fosfatos esterilizado (10 mM, pH: 7)	(Wang <i>et al.</i> , 2010b)
Directo	Dos cámaras	Fumasep®FAB AEM	Cultivo bioelectroquímico activo	Acetato de sodio	Filtro de grafito	Malla de Ti recubierta con Pt	Solución de nutrientes (pH: 7)	Sin catolito (sólo recolección de gas)	(Rozendal <i>et al.</i> , 2007)
Directo	Una cámara	-	Lodo anaerobio	Acetato de sodio	Filtro de carbono	Catalizador de Ni de difusión de gas	Solución de nutrientes		(Manuel <i>et al.</i> , 2010)
Directo	Una cámara	-	Lodo anaerobio	Acetato de sodio y agua residual sintética	Filtro de carbono	Papel carbono con Ni	Solución de nutrientes		(Tartakovsky <i>et al.</i> , 2011)
Directo	Una cámara	-	Lodo anaerobio enriquecido	Glucosa	Placa de grafito	Placa de grafito	Agua residual sintética		(Venkata Mohan y Lenin Babu, 2011)

Directa/indirecta	Una cámara	-	Agua residual municipal	Acetato de sodio	Tela de carbono	Tela de carbono modificada	Buffer de fosfatos (50 mM) y nutrientes (pH: 7)		(Liu <i>et al.</i> , 2010)
Indirecta	Una cámara	-	Efluente de CCM	Acetato de sodio	Cepillo de fibra de grafito	Tela de carbono con Pt	Buffer de fosfatos (200 mM) y nutrientes (pH: 7)		(Call y Logan, 2008)
Indirecta	Una cámara	-	Agua residual	Acetato de sodio	Cepillo de grafito	Tela de carbono con Pt	Buffer de fosfatos (200 mM) y nutrientes (pH: 7)		(Nam <i>et al.</i> , 2011)
Indirecta	Una cámara	-	Agua residual	Acetato de sodio	Filtro de grafito	Tela de carbono con Pt	Buffer de fosfatos (200 mM) y nutrientes (pH: 7)		(Liang <i>et al.</i> , 2011)
Indirecta	Una cámara	-	Lodo anaerobio tratado térmicamente	Glicerol	Filtro de grafito	Cátodo de difusión de gas con Pt	Solución de nutrientes	Cátodo fase-gas	(Escapa <i>et al.</i> , 2009)
Indirecta	Dos cámaras	CMI-7000 Membrana de intercambio catiónico	Aguas residuales municipales	Efluente de fermentación oscura	Tela de grafito	Papel carbono con Pt	Efluente de la fermentación oscura real y sintético	Buffer de fosfatos (50 mM. pH: 7)	(Rivera <i>et al.</i> , 2015)
Indirecta	Una cámara	-	Lodo anaerobio	Acetato de sodio	Tela de carbono	Tela de carbono con Pt	Agua residual sintética (pH: 9)		(Verea <i>et al.</i> , 2014)
Indirecta	Una cámara	-	Efluentes de la fermentación oscura	Acetato de sodio en el arranque y efluentes de fermentación oscura	Filtro de grafito	Tela de carbono con Pt	Buffer de fosfatos (50 mM) con nutrientes (pH: 7)		(Li <i>et al.</i> , 2014)
Indirecta	Dos cámaras	AMI-7001 Membrana de intercambio aniónico	Aguas residuales	Ácido acético y propiónico	Papel carbón	Papel carbón con Pt	Buffer de fosfato (50 mM)	Buffer de fosfato (50 mM)	(Ruiz <i>et al.</i> , 2014)

El diseño de las CEM de dos cámaras más común es aquel en el que las dos cámaras de líquido, el ánodo y el cátodo están separados por una membrana de intercambio iónico. Dichos rectores pueden ser de tipo botella o de tipo H, de tipo rectangular o tipo cubo (Tabla 1.3). Mientras que un tipo de botella o un reactor de tipo H son simples de diseñar, la gran distancia entre los electrodos en ellos aumenta significativamente la resistencia del sistema, disminuyendo así la eficiencia coulombica y la eficiencia energética del sistema. Se ha observado que una sola membrana de Nafion representa hasta el 86% de resistencia de la resistencia total de una CEM (Callet *et al.*, 2009). De manera similar, aunque una CEM de tipo rectangular ayuda a mantener la pureza del gas de hidrógeno, también conduce a un aumento sustancial en el gradiente de pH. Un cambio de una unidad en el pH da como resultado una pérdida potencial de 0.06 V (Kadier *et al.*, 2016). Esto da como resultado la pérdida de potencial y la transferencia de electrones al cátodo. Sin embargo, el uso de una membrana de intercambio aniónico puede anular el gradiente y restablecer la electroneutralidad en el reactor (Rozendal *et al.*, 2007). Una desventaja del uso de membranas de intercambio iónico es el aumento en los costos generales de la producción de hidrógeno, lo que encarece el proceso (Parkhey y Gupta, 2017). Las CEM de dos cámaras tampoco han encontrado un diseño que permita optimizar su desempeño, añadiendo el ensuciamiento de la membrana, etc. (Hong Liu *et al.*, 2010).

Las CEM de una sola cámara han sido desarrolladas para simplificar la estructura del reactor y mejorar la producción de hidrógeno (Call y Logan, 2008). Se logra la disminución de la resistencia interna, alcanzando alta producción de hidrógeno, disminuyendo el gradiente de pH (Selembro *et al.*, 2009), reduciendo la energía perdida (Lee y Rittmann, 2010), incrementando la tasa de energía recuperada (Hu, *et al.*, 2008) y disminuyendo los costos del sistema (Call y Logan, 2008). También se ha encontrado que manteniendo un espacio apropiado entre los electrodos se mejora la generación de hidrógeno catódico (Lu *et al.*, 2009). El espacio entre los electrodos, controlado a 0.2 cm hace que la densidad de corriente y el rendimiento de hidrógeno se maximicen (Cheng y Logan, 2011). El inconveniente con las CEM de una sola cámara es la producción de metano, causada por microorganismos metanogénicos que consumen el hidrógeno producido (Call, Wagner, *et al.*, 2009; Call y Logan, 2008; Clauwaert y Verstraete, 2008; Hu *et al.*, 2008; Lu *et al.*, 2009; Rozendal *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2009). A pesar de que se han implementado diversos métodos para inhibir la metanogénesis como exposición del ánodo al aire, (Call y Logan, 2008; Hu *et al.*, 2009; Tartakovsky *et al.*, 2009), control de voltaje aplicado (Call y Logan, 2008), utilizando

cepas puras (Call *et al.*, 2009), controlando los tiempos de reacción (A. Wang *et al.*, 2009) y con inhibidores químicos (Chae *et al.*, 2010). Los métodos desarrollados para la inhibición de arqueas metanogénicas en CEM de una cámara aún no resultan viables al pensar en escalamientos.

Por tanto, se puede concluir que la producción de hidrógeno debe enfocarse en reactores de dos cámaras buscando optimizar su arquitectura-configuración y las membranas a utilizar para separar la cámara anódica y catódica con el objetivo de disminuir las resistencias internas y los problemas que pudieran presentarse con la colmatación de la membrana. Mientras que las CEM de una cámara se le ha dado un enfoque que tiene más que ver con la electrosíntesis de metano dado que esta arquitectura favorece altas tasas de producción de metano por las altas purzas que se pueden alcanzar combinando la electrosíntesis de metano y la presencia de organismos metanogénicos hidrogenotróficos (Blasco-Gómez *et al.*, 2017; Guo *et al.*, 2013).

1.2.4 Cámara anódica

1.2.4.1 Ánodo

En las CEM, los microorganismos forman una biopelícula sobre la superficie del ánodo para así poder degradar la materia orgánica y liberar electrones, influyendo en la densidad de corriente del sistema. Por tal motivo, la compatibilidad del material de soporte (ánodo) y los microorganismos, la movilidad de los electrones, área superficial, estabilidad química, la estabilidad y propiedades catalíticas deben ser tomadas en cuenta al momento de seleccionar los materiales para el ánodo. Generalmente se han utilizado materiales a base de carbono (fibras de carbono, grafito, carbón activado) para el ánodo, debido a su buena conductividad, biocompatibilidad, morfologías, bajos sobrepotenciales y los bajos costos (Hong Liu *et al.*, 2010; Logan *et al.*, 2008).

Los materiales conductores convencionales como la tela de carbono y el papel de carbono son los más utilizados esto por su alta conductividad, alta estabilidad de alto rendimiento, fuente conveniente y bajo costo (Logan *et al.*, 2008). Sin embargo, la tela y papel de carbono son fáciles de dispersar a lo largo de la reacción y tienen bajas tasas de conversión de energía (Liu *et al.*, 2012). Mientras que materiales hechos de grafito (gránulos, fieltros y cepillos) obtienen altas densidades de corriente por la gran porosidad y superficie específica que presentan. El grafeno comparado con la tela de carbono aplicado en CCM, ha logrado mayores eficiencias de generación de energía y tasas de conversión (Liu *et al.*, 2012). El carbón activado presenta ventajas como material conductor: resistencia estructural, estructura porosa, gran superficie específica y se ha encontrado

que utilizado como ánodo reduce la resistencia interna y aumenta la eficiencia coulombica y la tasa de conversión de hidrógeno. Estudios demostraron que se obtienen tres veces la potencia de salida que con la tela de carbono (Li et al., 2009; Wang et al., 2010). También es importante destacar que para asegurar la adhesión de los microorganismos sobre los materiales que son usados para el ánodo se utilizan pretratamientos, tales como: amoníaco a alta temperatura y con gas nitrógeno (Lalauette et al., 2009).

El futuro de las investigaciones en este aspecto se debe centrar en el desarrollo de nuevos materiales de bajo costo: poliméricos, metálicos o alguna combinación de ambos que permitan aumentar la potencia de salida y tengan compatibilidad con los microorganismos para mejorar la adhesión de estos al material.

1.2.4.2 Anolito (Sustrato)

El sustrato orgánico que se oxida es otra característica importante de las CEM. La disponibilidad, el costo y la facilidad de utilización del sustrato deciden la eficacia del sustrato y del proceso en general. Una de las ventajas más importantes de la electrohidrogenesis es su flexibilidad en el consumo de sustrato. Se ha informado con éxito que una amplia gama de compuestos, desde sustratos puros como carbohidratos y proteínas, hasta productos finales de fermentación tales como acetato y butirato hasta aguas residuales industriales y domésticas, se utilizan como sustratos en la electrohidrogenesis.

El sustrato influye en la composición de la comunidad bacteriana en la biopelícula del ánodo, en el rendimiento de la CEM. Durante la oxidación y reducción de piruvato, los productos de los AGV en virtud de la tensión aplicada podrían ser oxidados más rápidamente y así superar la barrera de la fermentación. Por tal razón los efluentes acidogénicos son vistos con gran potencial dada la baja tensión adicional al compararse con otros sustratos (Wang et al., 2011).

Una de las características más destacadas de la electrohidrogenesis es su versatilidad en la utilización de sustratos para la producción de hidrógeno por bacterias exoelectrogénicas. Esta adaptabilidad surge del hecho de que las comunidades microbianas anódicas son conocidas por ser flexibles. Esto hace posible alimentar una variedad de sustratos al reactor CEM que van desde aguas residuales industriales hasta efluentes de fermentación y desde carbohidratos puros como glucosa, etc. hasta polímeros complejos como celulosa y hemicelulosa (Hallenbeck y Ghosh, 2009).

Los sustratos orgánicos no fermentables tales como acetato, butirato, lactato y propionato se han usado con bastante frecuencia como sustratos para la electrohidrogenesis. De ellos, el acetato, que es el producto final de fermentación oscura más común, ha sido un sustrato común. El razonamiento detrás del uso de productos finales de fermentación oscura como sustrato para la producción de hidrógeno en CEM es realizar una utilización de sustrato casi completa y lograr el rendimiento máximo teórico de 12 moles de H₂ por mol de equivalente de glucosa consumida (Lee *et al.*, 2008). También se ha informado que los sustratos orgánicos fermentables, tales como la biomasa lignocelulósica, se usan como sustratos potenciales para la electrohidrogenesis. Dado que los agro-desechos lignocelulósicos tales como la cáscara y la paja son abundantes y están disponibles a bajo precio, ofrecen una materia prima prometedora para la producción de biohidrógeno económico. Sin embargo, dado que los sustratos lignocelulósicos son compuestos complejos, no pueden usarse directamente en CEM y primero necesitan ser hidrolizados en azúcares más simples por microorganismos (Kadier *et al.*, 2014). Lalaurette *et al.* (2009) informaron una producción de biohidrógeno en dos etapas, en la que en la primera etapa *Clostridium thermocellum* produjo 1.67 mol de H₂/mol glucosa por fermentación oscura a una tasa de 0.25 L de H₂/lechada de maíz y en la segunda etapa, los inóculos de aguas residuales produjeron 750 ± 180 ml de H₂/g DQO a una tasa de 1.00 ± 0.19 L/L/d en CEM del efluente de fermentación oscuro. En otro informe interesante, Zeng *et al.* (2015) estudiaron la biotransformación de compuestos fenólicos y furanos puros como sustratos de CEM que son los subproductos comunes de la producción de biocombustibles a partir de biomasa lignocelulósica. Reportaron un rendimiento de hidrógeno en el rango de 0.26-0.42 H₂ COD/g COD con una tasa de producción de H₂ normalizada por volumen de bioánodo de 0.07-0.1 L /L/d. Sin embargo, la eficiencia de los CEM que operan en sustratos lignocelulósicos es menor que los ácidos grasos volátiles y también, dado que la hidrólisis biológica de la biomasa lignocelulósica es un proceso lento, el rendimiento de dichos sistemas es menor que las CEM que se alimentan con sustratos no fermentables como acetato, lactato o butirato (Kadier *et al.*, 2014). Por ejemplo, Yang *et al.* (2015) utilizaron sales sódicas de acetato, butirato y propionato como sustrato en una CEM por lotes e informaron una alta eficacia coulombica de 87 ± 5.7% con acetato sugiriendo que los AGVs más simples como el acetato pueden utilizarse fácilmente por las bacterias que respiran el ánodo para la producción de hidrógeno en CEM.

Las aguas residuales son otra clase comúnmente reportada de sustratos que se han usado para la producción de biohidrógeno en CEM por electrohidrogenesis. El uso de aguas residuales o

efluentes industriales como sustrato cumple el doble propósito de tratamiento de aguas residuales y producción de hidrógeno simultáneamente. Las aguas residuales como sustrato desempeñan un papel importante en la regulación de la economía del proceso de producción de hidrógeno, ya que hacen que el proceso sea económicamente más barato; al ser principalmente efluentes industriales no poseen ningún valor económico. Sin embargo, ciertos problemas deben abordarse y resolverse antes de que se pueda realizar el tratamiento simultáneo de aguas residuales y la producción de hidrógeno a nivel comercial. Por ejemplo: En algunos casos, la comunidad microbiana mixta presenta una menor actividad exoelectrogénica cuando se utilizan aguas residuales como sustrato en comparación con compuestos fácilmente biodegradables: como el acetato. Esto es probablemente porque no pueden degradar sustratos complejos como las aguas residuales tan fácilmente como los sustratos más simples. Sin embargo, las CEM brindan una excelente vía para la conversión de residuos biodegradables en productos de valor agregado, lo que hace que todo el sistema sea positivo en energía y carbono negativo. Una mejor comprensión de las interacciones sintróficas entre los grupos microbianos y los métodos para reducir las pérdidas de energía y de productos puede ayudar al desarrollo del sistema de escala comercial (Lu and Ren, 2016).

Sleutels *et al.*, (2011) encontró que concentraciones bajas de sustrato combinado con potenciales anódicos aumentados se aumenta la electroactividad de la biopelícula anódica aumentando la competitividad de las bacterias exoelectrogénicas frente a microorganismos metanogénicos. Respecto a la concentración de sustrato alimentado se propone aumentar la carga de sustrato gradualmente durante la puesta en marcha evitando una inhibición por exceso de sustrato (Escapa *et al.*, 2009).

1.2.4.2 pH

Cuando el pH evaluado se controló a 6.5-7.0, el ánodo funciona con normalidad; pero cuando el valor de pH se encuentra debajo de 6.0, la producción de hidrógeno disminuye (Wang *et al.*, 2010b). Se ha encontrado que el efecto del pH sobre la producción de hidrógeno está limitado al potencial aplicado. Cuando el voltaje aplicado se mantiene a 0.6 V con un pH de 5.0, la CEM puede lograr producciones de hidrógeno más altas que a pH de 7.0 y 9.0 (Kyazze *et al.*, 2010).

Sin embargo, recientemente se ha encontrado que la exoelectrogénesis alcalina es muy estimulante ya que: i) las densidades de corriente más altas alcanzadas por cultivos puros se encontraron en condiciones alcalinas con el género *Geoalkalibacter* (Badalamenti *et al.*, 2013); ii) *Geoalkalibacter* son, a su vez, muy atractivos ya que también son halófilos y dan resultados satisfactorios a altas

concentraciones de salinidad (Badalamenti *et al.*, 2013; Carmona-Martínez, Pierra, *et al.*, 2013; Miceli *et al.*, 2012; Pierra *et al.*, 2015); iii) los ambientes alcalófilos también pueden ser favorables para prevenir la acumulación de acidez (Torres *et al.*, 2008); iv) un entorno alcalino podría crear un entorno más selectivo y favorable para los organismos exoelectrogénicos cuando compiten con metanógenos para el donador de electrones y v) los sistemas bioelectroquímicos alcalinos pueden ser una tecnología adecuada para el tratamiento directo de desechos alcalinos (Rago *et al.*, 2016). Rago *et al.*, (2016) obtuvo una tasa de producción de hidrógeno de 2.6 L H₂/L/d a un pH de 9.3, la biopelícula electroactiva obtenida estuvo dominada por *Geoalkalibacter sp.*

1.2.5 Cámara catódica

1.2.5.1 Cátodo

Para mejorar la cantidad de hidrógeno recuperado en el cátodo, los sobrepotenciales deben ser reducidos. La catálisis puede hacer esto posible y por lo tanto aumentar la tasa de recuperación de hidrógeno (Lee *et al.*, 2009). Los materiales utilizados para el cátodo incluyen tela de carbón, papel carbón, acero inoxidable y biocátodos. Pero al usar electrodos de carbono la producción de hidrógeno es muy lenta, ya que requiere un alto sobrepotencial. Para reducir este sobrepotencial, el platino se utiliza generalmente como catalizador dado que provee rendimientos estables y altas tasas de recuperación de hidrógeno (Logan *et al.*, 2008). La presencia de catalizadores de platino reduce los sobrepotenciales catódicos al disminuir la energía de activación y, por lo tanto, hace que la tasa de reacción general sea favorable (Call, Merrill, *et al.*, 2009a). Sin embargo, este tiene un alto costo aumentando el costo de la configuración de la CEM, lo que afecta la economía del proceso completo y a lo anterior hay que añadir que tiene un impacto ambiental negativo al momento de su extracción (Freguia *et al.*, 2007). Por lo tanto, es necesario identificar los sustitutos de platino que son más baratos, pero su eficiencia de evolución de hidrógeno sigue siendo comparable al catalizador de platino. Se ha encontrado que el níquel y aleaciones de acero inoxidable son una alternativa al platino por su bajo costo, fácil disponibilidad, sobrepotenciales bajos y la estabilidad en soluciones altamente alcalinas (Selembo *et al.*, 2009). Sus ventajas más evidentes son su bajo costo, fácil disponibilidad, bajo sobrepotencial y su estabilidad en soluciones alcalinas (Kundu *et al.*, 2013). Usando acero inoxidable como cátodo se reduce el sobrepotencial y se producen altas densidades de corriente (Zhang *et al.*, 2010) y eficiencias de poder (Ambler y Logan, 2011), con lo cual se pueden obtener rendimientos más estables que con la catálisis de Pt (Munoz *et al.*, 2010).

Tabla 1.4. Características y operación de diferentes CEM en función de sustratos utilizados.

Tipo de sustrato	Alimentación (g/L)	Vol. CEM (mL)	T (°C)	Electrodos usados en CEM		Tasa de producción de hidrógeno		Densidad de corriente (A/m ³)	Y _{H₂} (mol H ₂ / mol de sustrato)	Voltaje aplicado (V)	Referencia
				Ánodo	Cátodo	$\frac{m^3 H_2}{m^3 d}$	$\frac{L H_2}{m^2 d}$				
Ácido acético Ácido butírico Ácido propiónico	1 (DQO)	C:28 ¹ A:14	30	Gránulos de grafito	Tela de carbono/Pt	1.10 0.45 0.72	310* 130* 200*	99 - -	3.65 8.01 6.25	0.6	Cheng y Logan, 2007
Acetato de Na Butirato de Na Propionato de Na	2 0.55 0.68	C:225 A: 550		Fibras de carbono ³	Malla de acero inoxidable	0.53 0.18 0.07		22.2 9.3 5.3	3.6 5.9 2.6	1.0	Yang <i>et al.</i> , 2015
Acetato de Na	2.72	40 ¹	30	Filtro de grafito	Espuma de Níquel	50	100*	5704	-	1.0	Jeremiasse <i>et al.</i> , 2010
Acetato de Na	1	28	30	Cepillo de grafito ²	Tela de carbono/Pt	1.02 1.99 3.12	40* 80* 120*	103 186 292	- - -	0.4 0.6 0.8	Call y Logan, 2008
Agua residual doméstica	0.204 - 0.481 (DQO)	292 ¹	30	Papel carbón	Papel carbón/Pt	-	-	0.471 A/m ²	0.154 L H ₂ /g DQO	0.5	Ditzig <i>et al.</i> , 2007
Agua residual porcina	2 (DQO)	28	30	Cepillo de fibras de grafito	Tela de carbono/Pt	1.0	-	112	0.20 ^c	0.5	Wagner <i>et al.</i> , 2009
EF (Melazas)	1 (DQO)	26	25	Cepillo de grafito	Tela de carbono/Pt	1.41 1.52	50* 60*	135 158	1.65 ^c	0.6 0.8	Lu <i>et al.</i> , 2009
Acetato de Na	1	3300 ¹	30	Filtro de grafito	Malla de Titanio/Pt	0.02	2*	2.8	2.1*	0.5	Rozendal <i>et al.</i> , 2006b
Acetato de Na	0.8	3300 ¹	30	Filtro de grafito	Malla de titanio/Pt	0.33	40*	29	-	1.0	Rozendal <i>et al.</i> , 2007

Acetato de Na	0.8	250 ¹	30	Filtro de grafito	Biocátodo (Filtro de grafito)	0.63	-	1.2 A/m ²	-	0.7	Rozendal <i>et al.</i> , 2008
Acetato de Na	0.12	180 ¹	26-28	Filtro de grafito	Placa de Titanio/Pt	0.05	40*	40	2.1	0.8	Chae <i>et al.</i> , 2008
Acetato de Na	2	300	30	Tela de carbono	Tela de carbono/Pt	0.20 0.53	40 110	23 52	1.0 2.5	0.4 0.6	Hu <i>et al.</i> , 2008
Acetato de Na	2.2	18	30	Tela de carbono	Platino Tela de carbono/NiMo Tela de carbono/NiW	2.3 2.0 1.5	100* 90* 60*	300 270 200	1.9 2.6 2.2	0.6	Hu <i>et al.</i> , 2009
Acetato de Na	2.2	18	30	Tela de carbono	Platino Tela de carbono/NiMo Tela de carbono/NiW	1.6 1.6 1.1	70* 70* 50*	235 210 170	1.5 2.2 1.4	0.4	Hu <i>et al.</i> , 2009
Acetato de Na	1	28	30	Cepillo con fibras de grafito ²	Cepillo de acero inoxidable 304	1.7	-	188	-	0.6	Call <i>et al.</i> , 2009
Acetato de Na	0.7	140	25	Gránulos de grafito	Filtro de carbono	0.57	40*	51	-	1.06	Lee <i>et al.</i> , 2009
Acetato	1	28	30	Cepillo de fibras de grafito ²	Acero inoxidable: 304 316 420 A286 Níquel: Ni 201 Ni 400 Ni 625 Platino	0.59 0.35 0.58 1.50 0.38 0.41 0.79 0.68	- - - - - - - -	100 116 122 222 127 116 160 129	- - - - - - - -	0.9	Selembo <i>et al.</i> , 2009

Aguas residuales vitivinícolas	8 (DQO)	1000 L	31	Cepillo de fibra de grafito ³	Malla de acero inoxidable 304	0.19 biogas	30*	7.4	-	0.9	Cusick <i>et al.</i> , 2011
Efluente sintético (ácido acético, etanol, ácido succínico, láctico y fórmico)	(1.6, 0.6, 0.7, 0.2 y 0.03)	28	30	Cepillo de fibra de grafito ²	Tela de carbono/Pt	1.11	-	1.2	0.9 L H ₂ /gdqo	0.5	Lalaurette <i>et al.</i> , 2009
Acetato de Na	1	28	30	Cepillo de grafito ²	Malla #60 – Acero inoxidable 304	2.1	-	188	-	0.9	Zhang <i>et al.</i> , 2010
Acetato de Na	0.1	480 ¹	30	Papel carbón	Papel carbón/Platino Papel carbón/Paladio	-	2.1 2.6	-	-	0.6	Huang <i>et al.</i> , 2011
Acetato de Na	4 g/L/d	50	25	Filtro de carbón	Electrodo con difusión de gas/Pt	6.3	-	470	1.4	1.0	Tartakovsky <i>et al.</i> , 2009
EF(glucosa)	0.6 (DQO)	163 ¹	25	Tela de grafito	Papel carbón/Pt	0.08	3*	-	-	0.55	Rivera <i>et al.</i> , 2015
EF (Celulosa)		28	30	Cepillo de fibra de grafito ²	Tela de carbono/Pt	0.48	-	52	-	0.44	Lalaurette <i>et al.</i> , 2009
EF (tallo de Maíz)	4 (DQO)	64	36	Filtro de grafito	Tela de carbono/Pt	3.43		340		0.8	Li <i>et al.</i> , 2014

¹CEM con membrana, ²Pretratamiento con amoníaco, ³Pretratamiento térmico, ° mol H₂/mol DQO, *Datos calculados

Los biocátodos son otra alternativa, se enriquecen de bacterias que oxidan el hidrógeno sobre el ánodo y posteriormente se invierte la polaridad del electrodo para alcanzar el ánodo y el cátodo catalíticos al mismo tiempo (Jeremiasse *et al.*, 2010). Los cátodos compuestos de Platino-cobalto-molibdeno tienen un rendimiento electroquímico superior al acero, tienen un comportamiento similar a cátodos de platino (Tokash y Logan, 2011).

Materiales de cobalto y hierro (Cheng y Logan, 2008), carburo de tungsteno (Harnisch *et al.*, 2009), disulfuro de molibdeno (Tokash y Logan, 2011), y nanopartículas de paladio han sido utilizados como sustitutos efectivos del platino para funcionar como catalizadores catódicos obteniendo resultados favorables comparables con el platino. Los catalizadores modificados que son usados en el cátodo se colocan o se recubren sobre un soporte físico que proporciona una superficie para que las partículas metálicas se dispersen, aumentando así el área superficial. El carbono se ha utilizado como el material de soporte más común debido a su mayor conductividad y menor interferencia con el catalizador. Los catalizadores de metales no preciosos tales como el acero inoxidable y las aleaciones de níquel se pueden utilizar de manera efectiva con una optimización adecuada para la producción de hidrógeno siendo económicamente eficientes, aunque su desempeño continúa siendo ligeramente menor al del platino. Sin embargo, lo anterior ayudaría a reducir los costos de producción de hidrógeno a gran escala en CEMs (Parkhey y Gupta, 2017).

1.2.5.2 Catolito

Para producir hidrógeno de alta pureza en una CEM, se separa el ánodo y el cátodo mediante una membrana de intercambio iónico. La producción de hidrógeno en una CEM está afectada por la capacidad de tamponamiento del pH y la conductividad electrolítica del catolito. Por esta razón la selección de catolito apropiado es necesaria.

El catolito más común es el buffer con fosfato (SBF), que puede minimizar la elevación del pH y proporcionar una cierta conductividad del electrolito; sin embargo, el uso de una SBF puede no ser económica y amigable con el medio ambiente. Lo que se debe evitar en cualquier catolito es el contenido de microorganismos, ya que se puede presentar producción de metano.

Se han comparado la SBF (100 mM: $0.237 \text{ m}^3 \text{ H}_2/\text{m}^3/\text{d}$) con soluciones de NaCl (134 mM: $0.171 \text{ m}^3 \text{ H}_2/\text{m}^3/\text{d}$) a pesar de que se presenta un mejor resultado con la SBF, la solución de NaCl conserva una alta conductividad electrolítica. De igual forma se ha encontrado que el reúso de

catolitos como SBF y NaCl por un periodo prolongado disminuye las tasas de producción de hidrógeno, causado por un alto pH. El costo de acidificar una solución de NaCl resultó menor que el de acidificar la SBF. Por tanto, el NaCl podría ser una mejor opción como catolito en CEM por la reducción de costos y reutilización/eliminación química (Yossan *et al.*, 2013). Otros estudios corroboran que altas tasas de producción de hidrógeno han sido alcanzadas en CEM de dos cámaras ($1.6 \text{ m}^3 \text{ H}_2/\text{m}^3/\text{d}$) con solución salina (68 mM NaCl) el pH se vio incrementado de 7.0 a 10.8 (Nam y Logan, 2011). Estos mismos autores lograron optimizar la concentración de la solución salina (NaCl) a través del control de pH inicial en el ánodo, logrando $2.2 \text{ m}^3 \text{ H}_2/\text{m}^3/\text{d}$ cuando el pH inicial en el ánodo fue 9 y la concentración del catolito 98 mM NaCl (Nam y Logan, 2012).

El catolito en combinación con el cátodo, debe ser capaz de generar un bajo sobrepotencial, poseer una buena conductividad sin aumentar la resistencia del catolito. Se ha reportado que la reutilización del catolito por períodos prolongados provoca un decrecimiento en la producción de hidrógeno por el pH elevado que se genera. Es posible alcanzar altas densidades de corriente utilizando buffer de fosfato dada su capacidad de amortiguamiento; de igual manera la alta conductividad de las soluciones de NaCl permite alcanzar buenas densidades de corriente. El agua acidificada o soluciones de NaCl son las opciones de catolito más viables (Yossan *et al.*, 2013).

El catolito más usado han sido soluciones buffer de fosfato de 50 a 100 mM para el ánodo y cátodo con el objetivo de controlar el pH (Jeremiase *et al.*, 2010; Kyazze *et al.*, 2010), sin embargo, estas fallan y no evitan la alcalinización del catolito (Nam y Logan, 2011). Al no utilizar una solución buffer el pH se incrementa por encima del pH neutro. Pero existen otros factores que afectan el sobrepotencial en el cátodo. Usar un catolito de alta conductividad puede reducir significativamente la resistencia de la solución del catolito (Nam y Logan, 2011). El pH del catolito puede no ser crítico como otras condiciones operativas para alcanzar altas producciones de hidrógeno (Jeremiase *et al.*, 2010).

El NaCl usado como catolito a pH neutro en concentraciones altas $> 98 \text{ mM}$, reduce el transporte de iones OH^- fuera del cátodo debido al transporte más favorable de Cl^- esto aumenta las resistencias disminuyendo la densidad de corriente a pesar de que existe una mayor conductividad del catolito (Nam y Logan, 2012). Pero, independientemente de la concentración de catolito se encontró que a pH 9 los sobrepotenciales son menores. Mejorar la conductividad del catolito resulta más importante que el pH del catolito.

1.2.5.3 pH

Los potenciales de los electrodos son dependientes del pH y lo que se esperaría de acuerdo con la ecuación de Nernst (Ec. 1.3) es que disminuyendo el pH se genere un potencial catódico que favorezca a la producción de hidrógeno y disminuya la energía añadida al sistema. (Kyazze *et al.*, 2010) encontró menores sobrepotenciales a pH 9 a 0.6 y 0.85 V, por lo que se concluye que es mejor trabajar a un pH básico.

$$E' = E^{0'} - 0.0296 \log P_{H_2} - 0.059pH \quad \text{Ec. 1.3}$$

Se ha encontrado que el efecto del pH en el catolito sobre la densidad de corriente es más significativo a 0.6 V que a 0.85 V. Un pH bajo debe utilizarse en el catolito si se pretende aplicar potenciales mínimos. Podría entonces suponerse que a mayor voltaje aplicado menor será el efecto que se presente como resultado del gradiente de pH que se genere en ambas cámaras, sin embargo, representa un problema ya que el objetivo es utilizar la menor cantidad de energía para disminuir las pérdidas energéticas (Kyazze *et al.*, 2010).

El pH del catolito y voltaje aplicado influyen sobre la producción de hidrógeno. Se ha encontrado que un voltaje aplicado de 0.85 V y un pH de 5 en el catolito se alcanzan producciones de H₂ de 200 mL H₂/l_{an}/d. No obstante, los rendimientos de hidrógeno obtenidos a pH 5 y 9 en el catolito son similares (1.1 y 1.0 mol H₂/mol de acetato consumido, respectivamente). Respecto a las eficiencias coulombicas a pH 9 y 5 no presentan diferencia significativa (46 %) a un voltaje aplicado de 0.85 V; pero al aplicar un voltaje de 0.6 V si se observa una diferencia entre la eficiencia coulombica a pH 5 (40 %) y a pH 9 (54 %) (Kyazze *et al.*, 2010).

1.2.6 Membranas

La razón de ser de una membrana de intercambio iónico es doble. En primer lugar, evita la difusión de gas de hidrógeno desde el cátodo al ánodo, donde pueden ser re-consumidos por bacterias y, en segundo lugar, mantiene la pureza del gas de hidrógeno evitando su mezcla con otros productos metabólicos gaseosos en el ánodo como CO₂, CH₄, etc. Las membranas se utilizan en CEM de dos cámaras para separar la cámara anódica y catódica y aumentar la pureza del hidrógeno producido. Las membranas de intercambio catiónico (MIC) facilitan el transporte de protones del ánodo al cátodo en CEM (Liu *et al.*, 2005; Rozendal *et al.*, 2006b) pero presentan una caída de pH en la cámara anódica y un aumento de pH en la cámara catódica probablemente como resultado de

rápidas tasas de transferencia de carga de otros cationes (Na^+ , K^+ , NH_4^+ , y Ca^{2+}) distintos a los protones (H^+) a través de la membrana (Gil *et al.*, 2003; Kim *et al.*, 2007; Rozendal *et al.*, 2007; Rozendal *et al.*, 2006a). Por otro lado, las membranas de intercambio aniónico (MIA) han demostrado mejores desempeños en CEM (Cheng y Logan, 2007; Rozendal *et al.*, 2007) debido al transporte de cargas negativas de los buffers de pH, como los fosfatos y bicarbonato, que pueden facilitar la transferencia de protones (Fan *et al.*, 2007). Sin embargo, la membrana incrementa la resistencia interna del reactor y conduce al desequilibrio del proceso de oxidación en el ánodo (Call y Logan, 2008; Logan *et al.*, 2008).

Las CEM de una cámara han resultado inadecuadas al utilizar consorcios mixtos en pequeña y gran escala, se reportan bajas producciones netas de hidrógeno resultado de la metanogénesis por microorganismos hidrogenotróficos (Cusick *et al.*, 2011; Nam *et al.*, 2011; Parameswaran *et al.*, 2011; Rader y Logan, 2010). Estos microorganismos pueden colonizar las paredes del ánodo, cátodo y reactores (Nam y Logan, 2012).

Por tanto, para producir y recuperar hidrógeno de alta pureza en CEM de mayor escala será necesario utilizar configuraciones de dos cámaras. Mayores tasas de recuperación de hidrógeno en el cátodo se obtienen en CEM de dos cámaras en comparación con las bajas recuperaciones obtenidas en CEM de una cámara (Hu *et al.*, 2008; Nam *et al.*, 2011; Rozendal *et al.*, 2007) como resultado de la presencia de organismos metanogénicos hidrogenotróficos.

1.2.7 Parámetros operacionales

1.2.7.1 Voltaje aplicado y potencial anódico

A escala laboratorio en CEM, el voltaje se aplica generalmente por una fuente de alimentación, pero para poder tener un registro del desarrollo de la CEM, se debe supervisar y controlar el voltaje en tiempo real (Tartakovsky *et al.*, 2011). El voltaje aplicado por lo general se mantiene en un rango de 0.2 a 0.8 V (Cheng y Logan, 2007). Se debe tener en cuenta que en la CEM se busca aumentar la densidad de corriente a partir del voltaje aplicado. Las densidades de corriente suelen desviarse de una respuesta lineal a voltaje aplicados <0.2 V (Rozendal *et al.*, 2006b), producir poco hidrógeno medible o tener un rendimiento errático por debajo de 0.3 V (Call y Logan, 2008; Liu *et al.*, 2005). Voltajes aplicados mayores a 1 V tienen poco sentido ya que la entrada de energía se vuelve tan grande que el proceso de electrólisis microbiana se acerca más a un proceso de electrólisis del agua (Kinoshita, 1992).

Así, el control del potencial en el electrodo permite no sólo el uso de condiciones reproducibles de cultivos microbianos, sino también su adaptación en términos termodinámicos de la transferencia extracelular de electrones.

El control de los potenciales de los electrodos individuales en un sistema bioelectroquímico representan una ventaja, no sólo para la investigación fundamental, sino también para la ingeniería. Este control se consigue normalmente mediante el uso de fuentes de energía externas o potencióstatos. De este modo el uso de potencióstatos permite (en contraste con otros tipos de configuraciones) un exacto potencial en el electrodo individual. Esto es de gran importancia ya que el electrodo representa el aceptor final de los electrones (para ánodos) o donante de electrones (para cátodos) resultado de la transferencia extracelular de electrones (TEE).

El control del potencial en el electrodo permite no sólo el uso de condiciones reproducibles de cultivos microbianos, sino también su adaptación en términos termodinámicos de la TEE.

1.2.7.2 Relación Anolito-Cátodo-Voltaje

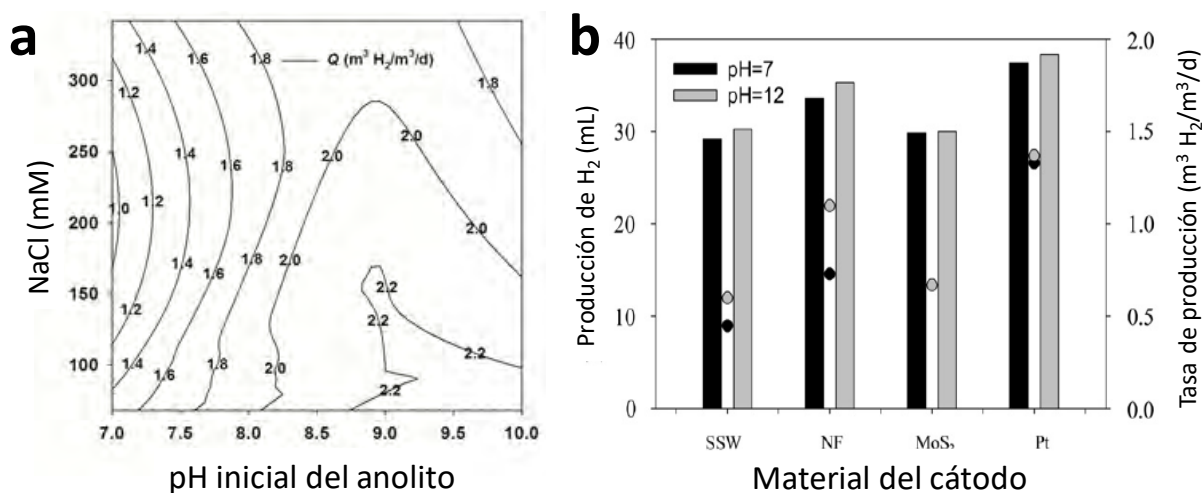


Figura 1.5. a) Efecto del pH inicial del anolito vs concentración de NaCl sobre la tasa de producción de hidrógeno (Nam y Logan, 2012), b) Tasas de producción de hidrógeno en 4 diferentes materiales a 2 pH iniciales (Ribot-Llobet *et al.*, 2013).

Nam y Logan, (2012) encontraron que altos volúmenes y tasas de producción de hidrógeno se pueden alcanzar a concentraciones bajas de NaCl (< 98 mM) y pH alcalino en el anolito (pH > 8.5) (Fig 1.5a), esto dada la buena actividad exoelectrogénica después de que el pico de corriente se presenta. En el mismo sentido, los tiempos de reacción son menores (22-26 h) a concentraciones menores de 98 mM de solución salina (NaCl).

Aunque todos los materiales alternativos generan sobrepotenciales ligeramente más altos al platino, la espuma de níquel y el acero inoxidable presentan los sobrepotenciales más altos respecto a otros materiales de cátodo, Los tiempos de retención hidráulica y los perfiles de corriente se ven afectados por la combinación del material del cátodo, catolito y pH inicial. De los materiales alternativos la espuma de níquel es la que ofrece resultados similares a los obtenidos con el platino a un pH inicial de 12 en el catolito (Fig 3b) (Ribot-Llobet et al., 2013).

A pesar de que ya se han empezado a estudiar las relaciones entre estos parámetros aún no existe un estudio que haya tomado en cuenta todas estas variables en conjunto (catolito-anolito-pH iniciales, cátodo y voltaje aplicado) y también es importante mencionar que únicamente se han llevado estudios con acetato como sustrato modelo. Por lo anterior, se deben diseñar pruebas que permitan evaluar la interacción de estas variables con el objetivo de optimizarlas y mejorar los rendimientos de CEM en dos cámaras. El uso de sustratos complejos y efluentes reales debe ser evaluado en futuros estudios para obtener los perfiles de desempeño de producción de hidrógeno en CEM.

1.2.7.3 Temperatura

La temperatura óptima se puede encontrar alrededor de los 30 °C, se puede producir el doble de densidad de corriente que a 20°C; una temperatura superior a los 40 °C puede inhibir el crecimiento de los microorganismos electrogénicos (Kyazze *et al.*, 2010) (Tabla 1.5).

1.3 TÉCNICAS ELECTROANALÍTICAS

1.3.1 Cronoamperometría (CA)

La cronoamperometría (CA) es una técnica electroquímica, donde se controla el potencial del ánodo o cátodo y después se mantiene constante con las corrientes resultantes siendo monitoreados como una función del tiempo. A partir de mediciones CA dos características operativas pueden ser calculados: la densidad de corriente máxima (j_{\max}), es decir, el flujo máximo de electrones por segundo, y la eficiencia coulombica (EC), es decir, el flujo de corriente total en relación con el sustrato consumido. La Figura 1.6 muestra una curva de crecimiento de biopelícula por CA durante varios ciclos de crecimiento utilizando un reactor de alimentación discontinua. Después de la fase de latencia inicial se presenta un máximo en la densidad de corriente. A continuación, la corriente disminuye de nuevo debido al agotamiento del sustrato. Cuando la densidad de corriente (j) se encuentra en (casi) cero se intercambia el medio. Después de reemplazar el sustrato la densidad de

corriente vuelve a aumentar y el siguiente máximo de densidad de corriente es mayor que la primera. Luego de varios ciclos de crecimiento j_{max} es constante, esto indica un estado estacionario y la formación de una biopelícula. Como el valor j_{max} en estado estacionario depende de varios parámetros, por ejemplo: material del electrodo, la temperatura del reactor y la composición de la biopelícula, a menudo se considera como una característica de un determinado sistema (biopelícula/electrodo) electroactivo microbiano. En la Figura 1.6 se puede observar regiones turnover (j_{max}) cuando se observan las máximas densidades de corriente, mientras que las regiones no turnover son aquellas donde la densidad de corriente es cercana a cero al final de un ciclo de operación. Si se realizan voltametrías cíclicas en la región turnover los picos de oxidación-reducción se aprecian de manera clara debido a que hay sustrato en el medio. Sin embargo, al realizar las voltametrías cíclicas en la región del non-turnover se requiere de la obtención de la segunda derivada debido a la falta de sustrato que impide apreciar los potenciales de oxidación-reducción de manera clara.

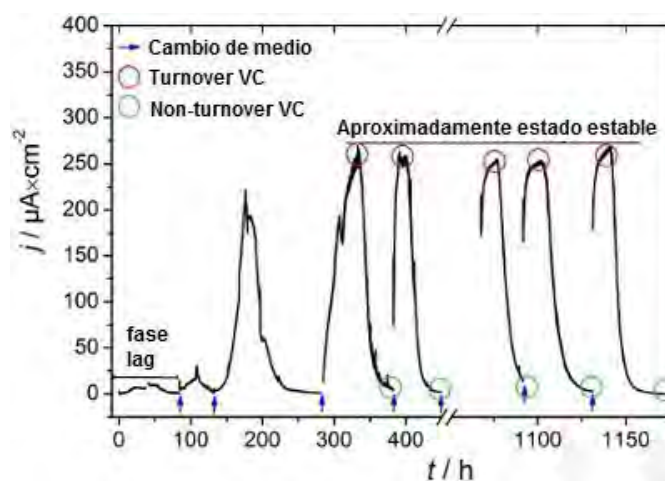


Figura 1.6. Gráfica de una cronoamperometría en lote, inoculada con aguas residuales basada en el crecimiento de una biopelícula.

La densidad de corriente (j) permite evaluar el desempeño del electrodo y determina la cantidad de electrones que llegan al ánodo (terminal de aceptor de electrones en condiciones anaerobias) los cuales influyen en la j la cual es utilizada como medida para expresar la actividad bioelectroquímica de la biopelícula (Carmona-Martínez, Harnisch, *et al.*, 2013). La densidad de corriente volumétrica se usa para medir el desempeño de todo el reactor ya que normaliza la corriente con el volumen de la CEM (Call y Logan, 2008; Logan *et al.*, 2008). Las tasas de producción de hidrógeno están directamente relacionadas a la densidad de corriente obtenida en la CEM (Logan *et al.*, 2008). Las densidades de corriente reportadas en CEM se encuentran en el rango de 0.5 a 16 A/m² (3-355 A/m³) (Liu y Hu, 2012).

1.3.2 Voltamperometría cíclica (VC)

La voltamperometría cíclica es una técnica utilizada para el estudio de la transferencia de electrones extracelular de biopelículas microbianas electroactivos. Se requiere una configuración de tres electrodos para obtener resultados precisos. Se puede obtener a partir de experimentos por VC información termodinámica útil, así como información cualitativa sobre la naturaleza del proceso de transferencia de electrones como: 1) los potenciales formales de especies redox, 2) la reversibilidad de las especies redox y su dependencia de la velocidad de barrido, 3) la influencia de la transferencia de masa, 4) la identificación de los sitios activos bio-electrocatalíticos, y 5) la identificación entre adsorción y difusión natural de los mediadores.

Los voltamperogramas cíclicos se registran para las condiciones nonturnover y para las condiciones turnover (como se indica en la Figura 1.6). En ambos casos se pueden obtener diferentes tipos de información.

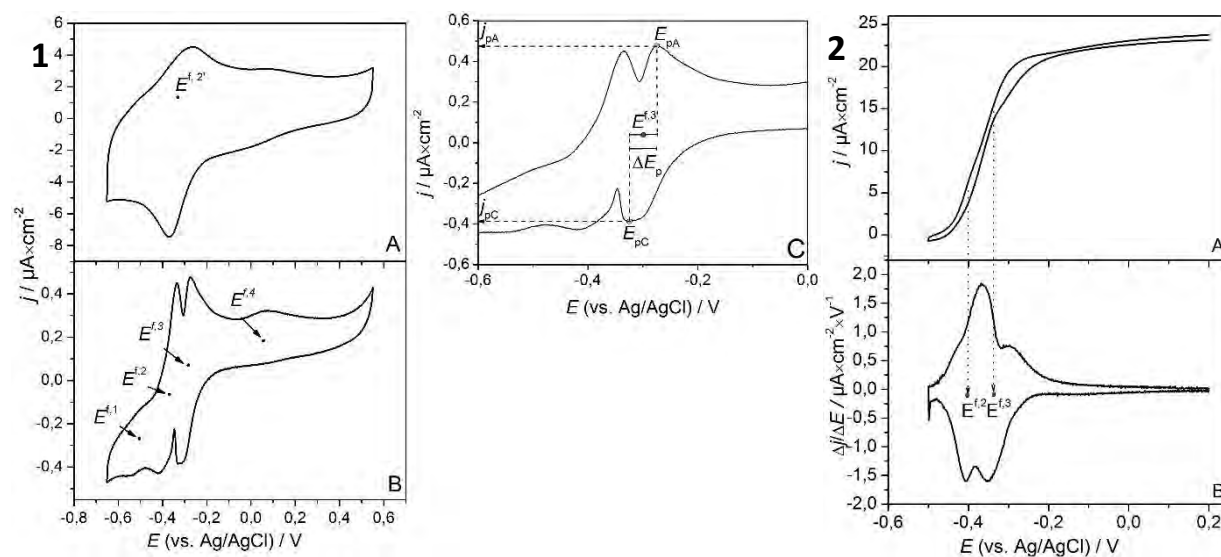


Figura 1.7. 1) Voltamogramas cíclicos Nonturnover de una biopelícula con *G. sulfurreducens*. Velocidad de lectura: (A) 50 mV/s, (B) 1 mV/s; (C) recorte de B, lo que demuestra la densidad de corriente máxima (J_{pA}) y el potencial de pico respectivo (E_{pA}) del ánodo en los máximos. En correspondencia a los mínimos se muestran la densidad de corriente máxima (J_{pC}) y el potencial de pico respectivo (E_{pC}) del cátodo. El potencial E_f formal y la separación de pico ΔE_p . 2) Voltamogramas cíclicos Turnover (A) velocidad de barrido fue de 5 mV/s. (B) Primera derivada de la curva voltamétrica. Indicando cuales son los potenciales formales de los sitios reales TEE: $E^{f,2}$ y $E^{f,3}$

1.3 PERSPECTIVAS

Existen algunos factores que pueden deteriorar el rendimiento de la CEM como: el bioensuciamiento y bloqueo de la membrana, el crecimiento excesivo de la biopelícula sobre la

superficie del ánodo (causando capas no conductoras y una disminución en la tasa de difusión de sustrato) y la inactivación del cátodo debido a la deposición de agregados de sal (ocupando sitios reactivos y bloqueando el transporte de protones a la superficie) (Kumar *et al.*, 2017).

Como se discutió anteriormente la producción de hidrógeno por fermentación únicamente presenta un máximo teórico de 4 moles de H_2 /mol de glucosa; aunque los rendimientos prácticos que se han alcanzado son inferiores (2-3 mol H_2 /mol de glucosa). La producción bioelectroquímica de hidrógeno posee tasas de entre 2 y 3.5 mol H_2 / mol de acetato, ya que no se generan metabolitos de salida. La combinación de una CEM con el proceso de fermentación oscura tiene el potencial de aumentar los rendimientos a 8-9 mol H_2 /mol de glucosa (Liu *et al.*, 2005). El hidrógeno se produce a muy alta pureza por una amplia gama de sustratos orgánicos sin productos secundarios tales como el sulfuro de hidrógeno, dióxido de carbono o monóxido de carbono. Aunque la electrólisis del agua también proporciona hidrógeno de alta pureza, la energía invertida (teóricamente 1.23 V) es más alta que en una CEM (teóricamente 0.14 V). Por lo tanto, no se requieren procesos de tratamiento adicionales para la purificación del hidrógeno, lo que da como resultado un ahorro en costos y energía (Rozendal *et al.*, 2006b).

El mayor problema que se presenta con la CEM actuales son las pérdidas energéticas que se producen (gradiente de pH, resistencia interna, electrodos), que conlleva a entradas de energía más altas de las necesarias teóricamente. Al mismo tiempo, se deben disminuir las pérdidas de hidrógeno (electrodos y metanogénesis) para poder aumentar los rendimientos de hidrógeno. También los microorganismos que forman la biopelícula tienen que ser capaces de metabolizar compuestos complejos para que el uso de CEM como tecnología de tratamiento de residuos y de producción de H_2 pueda ser económicamente competitivo a mayor escala (Geelhoed *et al.*, 2010).

Las investigaciones encaminadas a las CEM siguen siendo limitadas ya que no se han dado los avances e innovaciones suficientes para hacer aplicable esta tecnología a un tamaño real. Sin embargo, tiene un gran potencial. Los aspectos que necesitan ser estudiados son los siguientes:

- 1) Disminuir la resistencia interna del reactor mediante la generación de diseños optimizados, reduciendo las zonas muertas y una tasa de transferencia de masa efectiva y alta (sin perder la ventaja de la pureza del hidrógeno). Con el objetivo de aumentar la densidad de corriente y con ello la cantidad de hidrógeno recuperado.
- 2) Electrodos eficientes con materiales de bajo costo. Para la optimización del rendimiento del cátodo, es necesario concentrarse en el efecto de la catálisis sobre el material a utilizarse.

Usando biocátodos o catalizadores de metales no preciosos especialmente el níquel y molibdeno, se podría disminuir el sobrepotencial y aumentar la producción de hidrógeno.

- 3) La actividad metanogénica que presentan las CEMs debe disminuirse o eliminarse.
- 4) Generar condiciones de operación a partir de la manipulación del pH en el anolito, catolito y el diferencial de potencial que permitan aumentar la formación de hidrógeno en el cátodo de la celda de electrólisis microbiana.
- 5) Estudiar los mecanismos de transferencia extracelular de electrones que se presentan entre los microorganismos y electrodos para mejorar la cinética de extracción de electrones del sustrato y la producción de hidrógeno.
- 6) Escalar las celdas de electrólisis microbiana, así como ganar experiencia con sustratos orgánicas reales.
- 7) El desempeño de la CEM respecto a la electroactividad de la biopelícula puede mejorarse regulando los potenciales del ánodo lo que podría disminuir la actividad metanogénica (Selembo, Perez, *et al.*, 2009).

El desempeño de la cámara anódica y catódica determinará la magnitud de la producción de hidrógeno en celdas de electrólisis microbiana de dos cámaras, así como la remoción de la materia orgánica. Por tanto, la interacción de la cámara anódica y catódica es importante en el proceso de producción de hidrógeno por tal motivo el estudio de los parámetros operacionales debe hacerse en conjunto.

CAPÍTULO II

2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

2.1 HIPÓTESIS

Es posible mejorar el desempeño de una celda de electrólisis microbiana al fomentar el desarrollo de una biopelícula robusta en el ánodo por medio del establecimiento de condiciones alcalinas y un potencial anódico positivo.

2.2 OBJETIVOS

2.2.1 Objetivo general

Llevar a cabo la evaluación de los factores que afectan la cámara anódica y catódica en celdas de electrólisis microbianas utilizadas para la producción de hidrógeno variando parámetros operacionales.

2.2.2 Objetivos particulares

- Implementar una estrategia de arranque en celdas de electrólisis microbiana de dos cámaras permitiendo la disminución de los tiempos de formación de la biopelícula electroactiva usando como presión de selección el potencial anódico (E_{an}) y como sustrato efluentes acidogénicos.
- Determinar la robustez de la biopelícula electroactiva en celdas de electrólisis microbianas para la producción de hidrógeno variando la concentración inicial de sustrato y potencial anódico utilizando como sustrato ácidos grasos volátiles.
- Analizar la interacción entre el pH del anolito, concentración del catolito (mM NaCl) y potencial anódico sobre la producción de hidrógeno y remoción de materia orgánica en celdas de electrólisis microbianas utilizando una metodología de superficie de respuesta.

2.2.3 Alcances y limitaciones

- Se utilizaron celdas de electrólisis microbianas de dos cámaras a escala laboratorio.
- Inicialmente se utilizó como sustrato un efluente de la fermentación oscura y posteriormente se suministraron ácidos grasos volátiles.
- Los reactores se operaron de manera discontinua.
- El inóculo empleado fue lodo granular anaerobio.

CAPÍTULO III

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

La estrategia experimental utilizada durante el presente trabajo de investigación se muestra en la Figura 3.1, en la cual podemos apreciar las diferentes etapas que se llevaron a cabo para alcanzar los objetivos planteados. El desempeño de los reactores se evaluó para cada una de las etapas experimentales midiendo la producción de hidrógeno, densidad de corriente y remoción de materia orgánica principalmente y calculando a partir de estas la eficiencia coulombica, recuperación de hidrógeno y eficiencias energéticas.

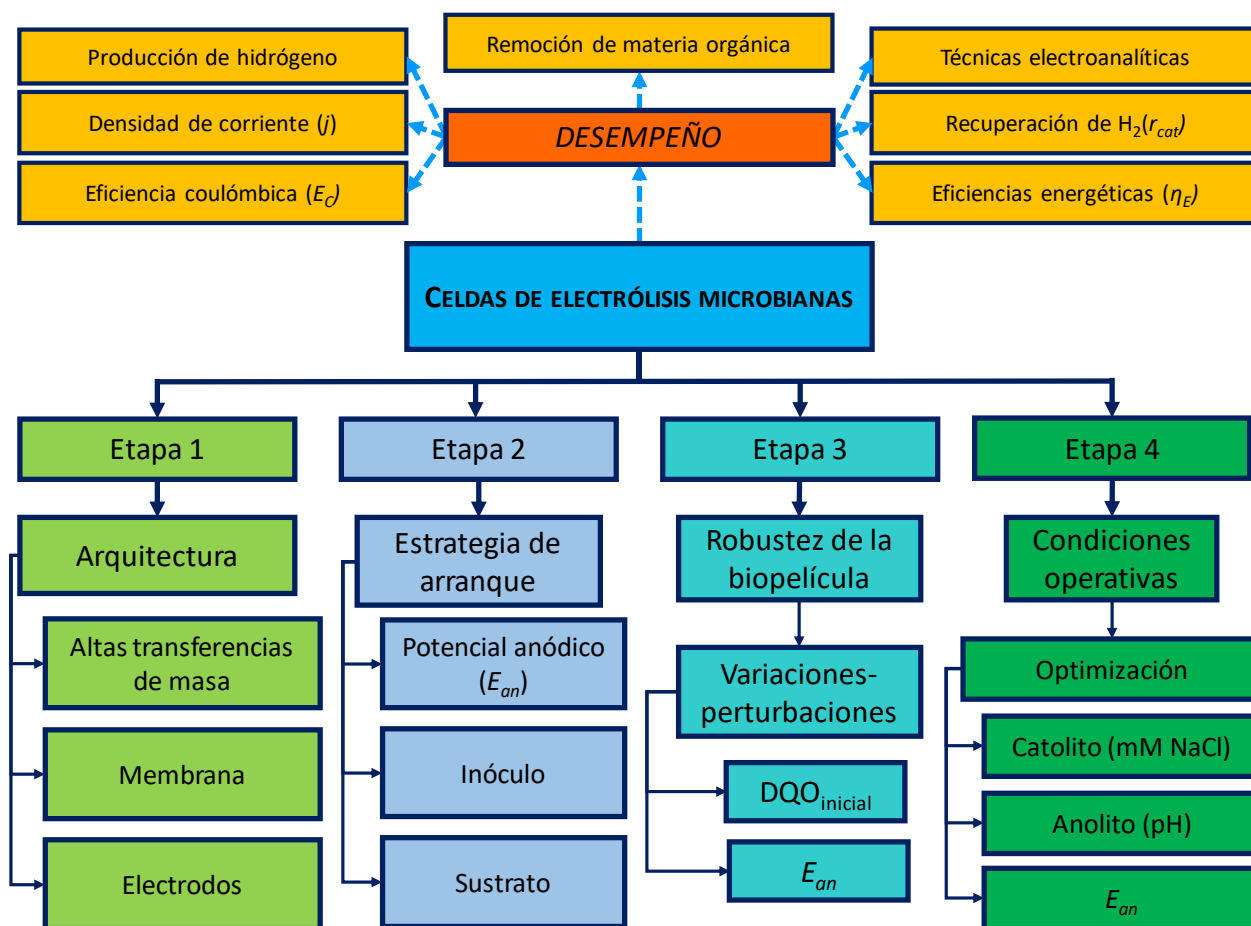


Figura 3.1. Estrategia experimental empleada para la evaluación de los factores que afectan la cámara anódica y catódica para la producción de hidrógeno.

La experimentación estuvo dividida en 4 etapas de las cuales el principal objetivo consistió en evaluar los factores que afectan la cámara anódica y catódica para la producción de hidrógeno, es decir, en cada una de las etapas se cuidó que el funcionamiento de los reactores CEM se hiciera en sinergia para ambas cámaras buscando la maximización en la producción de hidrógeno. En la Etapa 1 (Fig 3.1) se diseñaron y desarrollaron reactores CEM de dos cámaras en los que se favoreciera la transferencia de masa a partir de la arquitectura del diseño e integración de agitación mecánica, a partir de la revisión del estado del arte, se seleccionaron los materiales de fácil adquisición y manipulación que brindarían resultados comparables con la literatura (membrana y electrodos). La Etapa 2 consistió en desarrollar una estrategia de arranque que permitiera la obtención de una biopelícula electroactiva robusta empleando un sustrato real (efluente acidogénico) para el desarrollo de esta estrategia se manipuló el potencial anódico ya que según reportes previos se puede ejercer una presión de selección a partir de estos y variando de un potencial de 0.5 V a 0.3 V cuando se tiene una biopelícula estable se disminuye el requerimiento energético de la CEM. Al finalizar la etapa 2 surgió la duda sobre la robustez de la biopelícula electroactiva formada sobre el ánodo. La Etapa 3 se enfocó en evaluar la robustez de la biopelícula variando la cantidad de sustrato alimentado ($DQO_{inicial}$) y por otro lado variando el potencial anódico de esta manera se determinó la sensibilidad a estas perturbaciones que pueden presentarse al momento de llevar la CEM a una escala más grande. Al evaluar la robustez quedó claro que la variación del potencial anódico tiene un efecto significativo sobre el rendimiento de la CEM lo que sirvió de antecedente para llevar a cabo la siguiente etapa experimental.

En la Etapa 4 se evaluaron los factores más importantes que afectan la cámara anódica y catódica de manera conjunta. El pH del anolito, la concentración de NaCl y el potencial anódico que maximizaron la producción de hidrógeno se determinaron a partir de un diseño de superficie de respuesta del tipo central compuesto. Las 21 pruebas arrojadas por el diseño experimental se desarrollaron de manera independiente debido a que se pueden fijar diferentes microorganismos en la biopelícula dado el pH y potencial anódico. Al finalizar se encontró que la interacción entre estas tres variables resultaba significativa para la producción de hidrógeno y desempeño de la CEM.

La metodología general, así como los materiales y técnicas utilizadas durante la actividad experimental del trabajo de investigación se describen a continuación para dar claridad al trabajo desarrollado.

3.2 ARQUITECTURA DE REACTORES Y CONFIGURACIÓN

Durante la experimentación se diseñaron y fabricaron dos arquitecturas de reactores CEM de dos cámaras (Fig. 3.2 y 3.4). La Fig. 3.2 muestra el primer diseño que se trabajó en el capítulo IV. La CEM es un reactor de dos cámaras fabricado en acrílico con un volumen útil de 450 mL y un volumen de trabajo de 400 mL por cámara (anódica y catódica). Este diseño con forma cuadrada en los extremos cuenta con muestreadores de líquido y gas en la parte superior (mangueras de 6 mm de diámetro unidas a válvulas de dos vías), los cuales se describen en la Fig 3.2. En la cámara anódica fieltro de grafito grado WDF (Brunssen de Guadalajara, México) se usó como electrodo, este material posee una alta área superficial ($6.45 \text{ cm}^2/\text{g}$), una densidad de 0.08 g/cm^3 (Fig. 3.3A) con un contenido de carbono del 99.9 %. El área superficial del fieltro de grafito fue de aproximadamente 70 cm^2 (superficie proyectada) y 1.4 m^2 (superficie real) y una resistencia eléctrica de $1\text{-}3 \ \Omega$ de acuerdo con el fabricante. Se reporta alta resistencia a la oxidación por parte de elementos oxidantes, así como un encogimiento y absorción de agua despreciables.

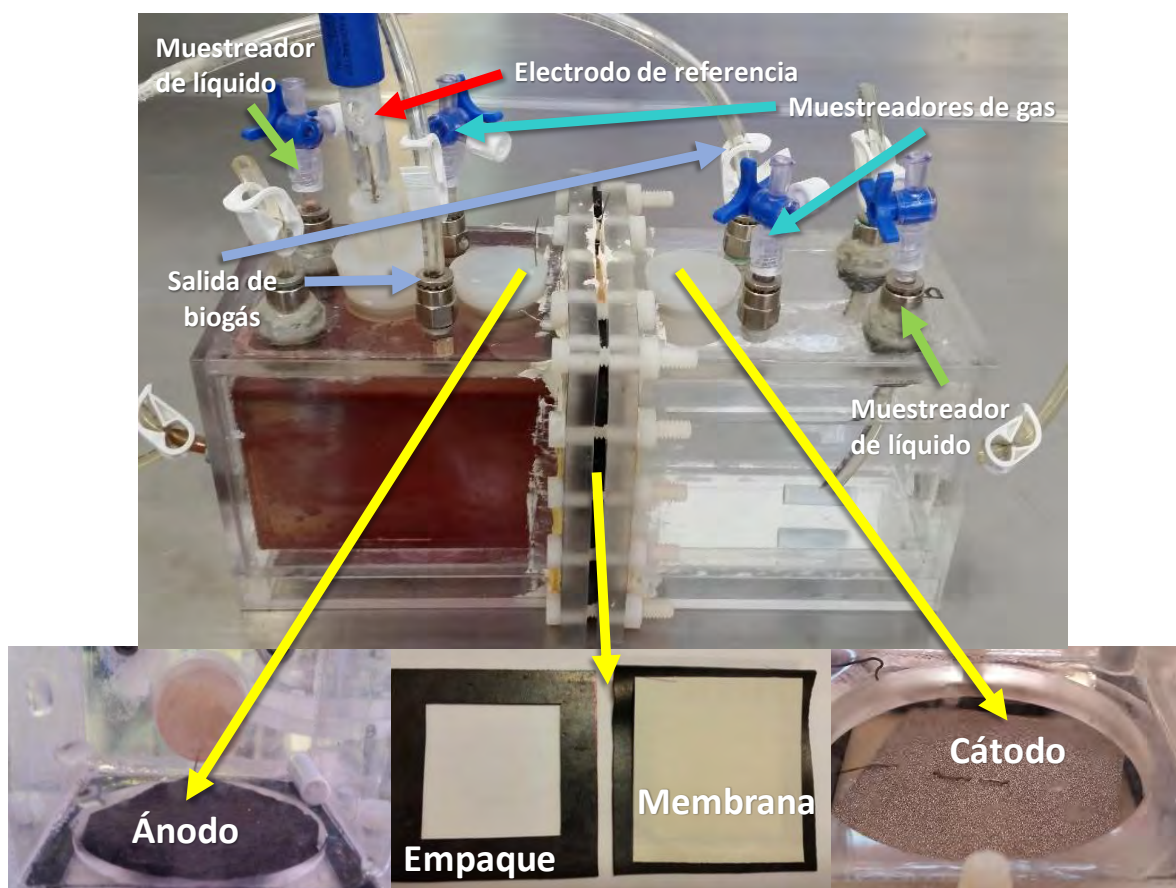


Figura 3.2. CEM de dos cámaras con bordes cuadrados.

En la cámara catódica se utilizó espuma de níquel (Sigma Aldrich, St. Louis, MO) como material de cátodo con una pureza del 95 % de níquel (Fig. 3.3B). La espuma de Ni cuenta con una

resistencia de $6.97 \mu\Omega$ y una densidad de 8.9 g/mL según lo reportado por el proveedor. Este material se seleccionó como material para el cátodo debido a su alta área superficial y las altas densidades de corriente que se han alcanzado utilizando la espuma de níquel (Jeremiasse *et al.*, 2010; Manuel *et al.*, 2010). La espuma de níquel poseía una dimensión de $5 \times 5 \text{ cm}$ y un grosor de 1.6 mm . El área superficial calculada fue de aproximadamente 53.2 cm^2 (área proyectada) y 1369 cm^2 (área real). La espuma de níquel se reutilizó durante las actividades experimentales y para eliminar cloruros, óxidos u otros compuestos en su superficie al finalizar las pruebas los cátodos eran sumergidos en solución de $\text{HCl } 8.0 \text{ M}$ y llevados a ultrasonido por 60 min , posteriormente enjuagados con agua desionizada para finalmente almacenarse en etanol al 98% .

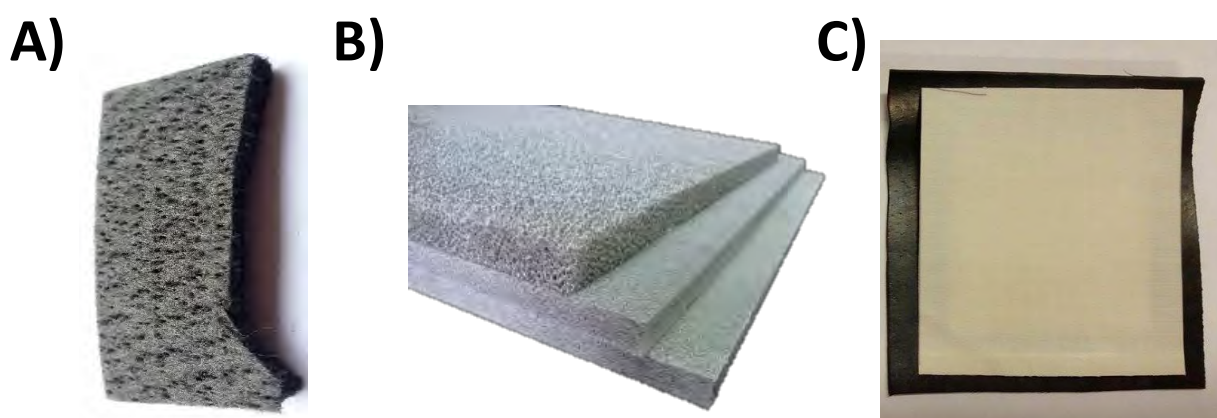


Figura 3.3. A) Ánodo: Filtro de grafito; B) Cátodo: Espuma de níquel; C) Membrana: MIA- 7001

Para separar las cámaras anódica y catódica se utilizó una membrana de intercambio aniónico (MIA; AMI-7001, Membranes International, Glen Rock, NJ) que se localizó en la parte central del reactor con una superficie de 60 cm^2 (Fig. 3C). La MIA posee un grosor de 0.5 mm , una resistencia eléctrica $<40 \Omega \cdot \text{cm}^2$ (a 0.5 M de NaCl). La estructura polimérica de la MIA, AMI-7001 es de gel de poliestireno reticulado con divinilbenceno. Antes de colocarse en los reactores la MIA se pretrató; sumergiéndola en solución de NaCl al 5% durante 24 h como lo establece el fabricante para permitir la hidratación y expansión de la membrana. Las conexiones se realizaron con alambre de titanio (99.99% , Sigma Aldrich, St. Louis, MO) de 0.5 mm de diámetro y con una resistencia de $42 \mu\Omega \cdot \text{cm}$. La CEM contó con orificios en los que se colocaron tapones de silicón; estos se usaron para colocar los electrodos. Los reactores CEM contaron con agitadores magnéticos de 2 cm de longitud y un diámetro de 0.8 cm en la cámara anódica y catódica.

La experiencia de trabajo durante el capítulo IV permitió mejorar el diseño de la CEM obteniendo como resultado el reactor que se observa en la Fig. 3.4. Con el objetivo de mejorar la transferencia de masa dentro de cada una de las cámaras los bordes en los extremos son redondeados, también

se agregaron tres deflectores al interior de cada una de las cámaras. Poseen muestreadores de líquido y gas en la parte superior de las cámaras como se describe en la Fig. 3.4. Cada una posee un volumen útil de 475 mL y con un volumen de trabajo de 425 mL. Los materiales utilizados para la membrana y electrodos son los mismos que se describieron para la Fig. 3.2. Estos reactores CEM mejorados se usaron en las pruebas experimentales del capítulo V y VI.

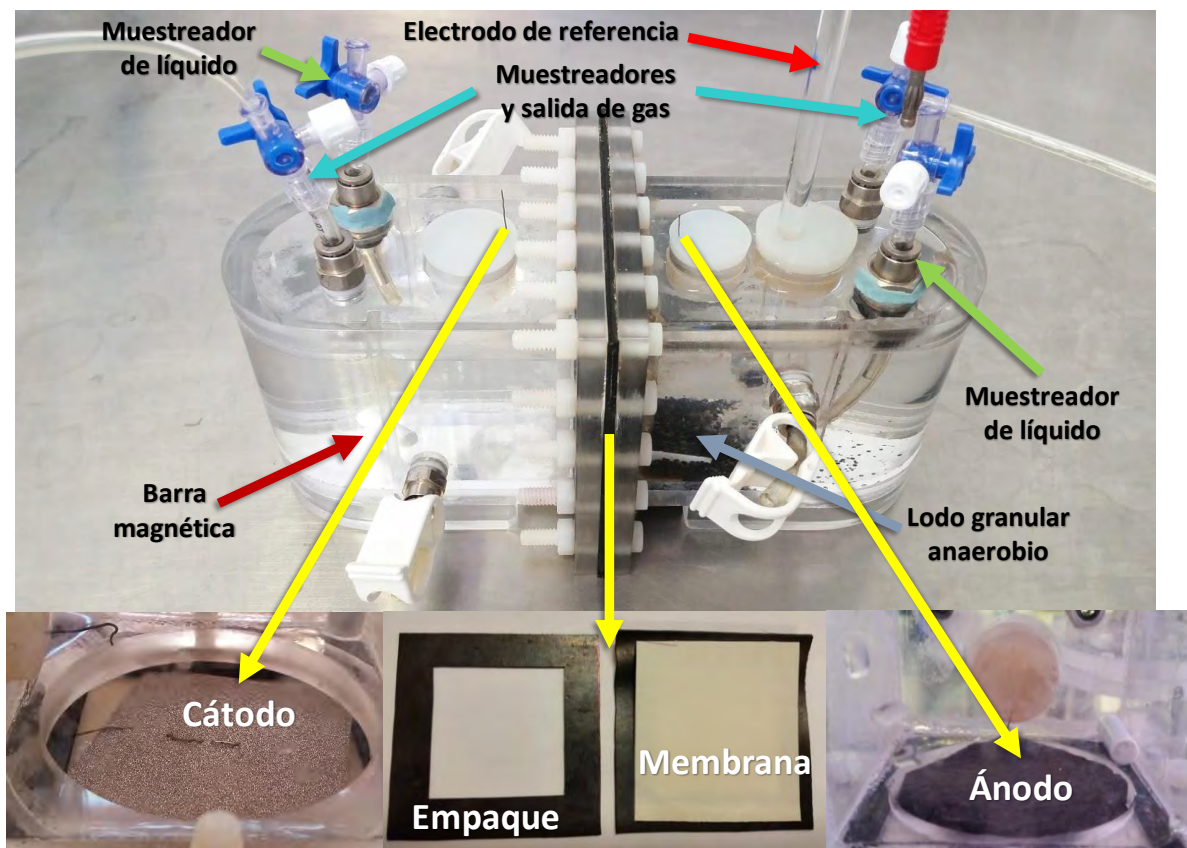


Figura 3.4. Diseño optimizado de CEM de dos cámaras con bordes redondeados.

3.3 MICROORGANISMOS Y ELECTROLITOS

Como inóculo para la colonización y formación de la biopelícula electroactiva sobre la superficie del ánodo se usó lodo granular anaerobio proveniente de un reactor UASB utilizado para el tratamiento de aguas residuales de una industria cervecera.

Como catolito durante el capítulo IV se manejó una solución amortiguadora de fosfatos 100 mM (KH_2PO_4 5.3 g/L; K_2HPO_4 , 10.7 g/L) cuyo pH fue de 7, para el capítulo V se utilizó solución amortiguadora de fosfatos 50 mM ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 2.45 g/L; Na_2HPO_4 , 4.58 g/L) ajustando el pH a 7 con solución de NaOH 8 M y HCl 8 M según fuera el caso. Finalmente, para la experimentación del capítulo VI el catolito consistió en una solución de NaCl con un rango de concentración de los 25 a los 294 mM sin ajuste de pH. La cámara anódica utilizó como anolito durante toda la estrategia

experimental una solución que contenía solución amortiguadora de fosfatos 50 mM ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 2.45 g/L; Na_2HPO_4 , 4.58 g/L), 0.31 g/L NH_4Cl , 0.13 g/L KCl , 12.5 mL de solución de oligoelementos y 5 mL de solución de vitaminas (Cheng *et al.*, 2009). Para el capítulo IV el sustrato empleado fue un efluente acidogénico y el cual se ajustó a una DQO inicial de 1.5 g/L. Para los capítulos V y VI se utilizó una mezcla de acetato, propionato y butirato en una composición de 30, 13 y 57 % respectivamente a concentraciones de DQO y pHs descritos en el capítulo V y VI. La proporción de AGVs se obtuvo en base a una revisión bibliográfica (Tabla 1.1).

La solución de oligoelementos estuvo compuesta de (g/L): MgSO_4 3.0; $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0.5; NaCl 1.0; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.1; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.1; $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.1; ZnCl_2 0.13; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0.01; $\text{AlK}(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 0.01; H_3BO_3 0.01; Na_2MoO_4 0.025; $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.024; $\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.025.

La solución de vitaminas estuvo compuesta por (mg/L): biotina 2.0; ácido fólico 2.0; clorhidrato de piridoxina 10.0; riboflavina 5.0; tiamina 5.0; ácido nicotínico 5.0; ácido pantoténico 5.0; B12 0.1; ácido p-aminobenzóico 5.0 y ácido tióctico 5.0.

3.4 FORMACIÓN DE BIOPELÍCULA ELECTROACTIVA Y OPERACIÓN DE CEM

Las actividades experimentales se llevaron a cabo a 30 ± 1 °C en baños de agua con calentadores de pecera. Se usaron parrillas de agitación a una velocidad de entre 150 y 200 rpm para ambas cámaras (anódica y catódica). Al inicio de cada ciclo ambas cámaras eran purgadas por 1.5 min con gas nitrógeno para desplazar el oxígeno y favorecer un ambiente anaerobio.

Las pruebas bioelectroquímicas se realizaron bajo el control de un potencióstato/galvanostato VSP Z-01 con 4 canales (BioLogic Science Instruments, Francia) (Fig. 3.6). Los potenciales aplicados están ajustados al electrodo de referencia Ag/AgCl (3.0 M KCl , +210 mV vs SHE, Radiometer Analytical) colocado en el centro de la cámara anódica (Fig. 3.5 y 3.6). Se colocó un puente salino para evitar la obstrucción del electrodo de referencia. Para la interacción del usuario con el potencióstato se manejó el programa Ec Lab v11.18. La colonización del ánodo para la formación de la biopelícula se realizó aplicando las condiciones iniciales de concentración y E_{an} para cada prueba (variando entre el capítulo IV-VI) agregando el inóculo (lodo granular anaerobio, 20 g/L - peso húmedo) y manteniéndolo dentro de la cámara anódica durante la fase de colonización. El funcionamiento de las CEM se llevó a cabo en lotes, y al final de cada ciclo se sustituyeron el anolito y el catolito. La fase de colonización se da por concluida cuando se observaron curvas de densidad de corriente similares (3 ciclos mínimo) (Carmona-Martínez *et al.*, 2015). Al tener

densidades de corriente reproducibles se intuye que se ha formado una biopelícula electroactiva estable y se finaliza con la fase de colonización retirando el inóculo de la cámara anódica. Después de la fase de colonización se inicia con la evaluación de las condiciones operativas fijadas para cada una de las etapas experimentales (capítulos IV-VI). Para considerar una condición estable se debe contar con al menos 3 ciclos en que las densidades de corriente y producciones de hidrógeno sean reproducibles.

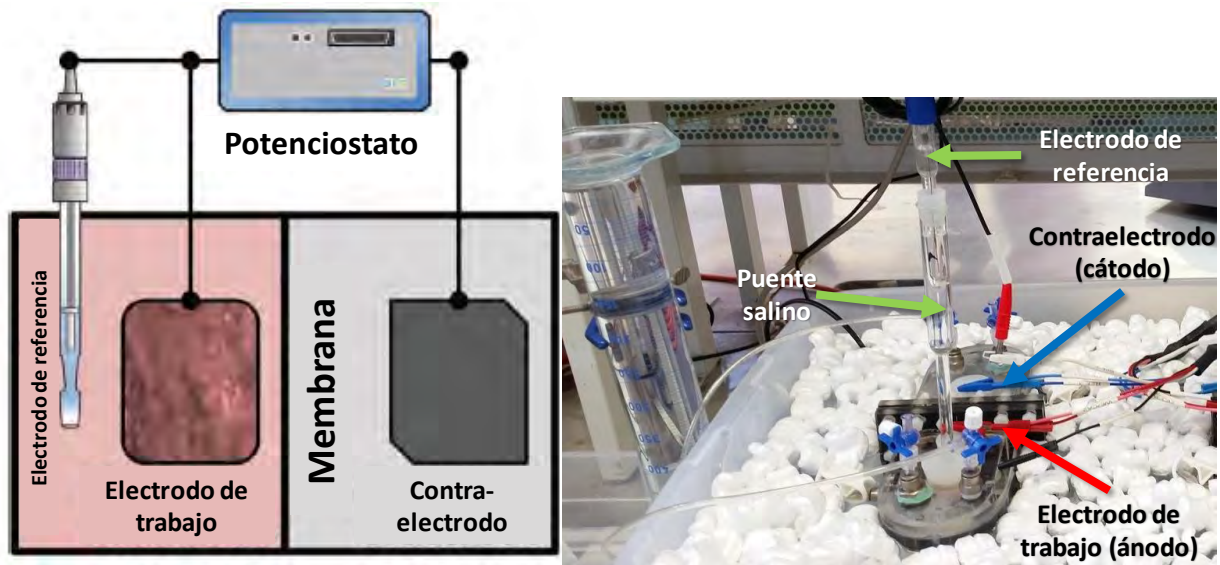


Figura 3.5. Conexiones de la CEM al potenciostato (Yu et al., 2017): El electrodo de trabajo corresponde al ánodo en el cual se mantuvo fijo el potencial (filtro de grafito), el contraelectrodo es el cátodo (espuma de Ni) y el electrodo de referencia (Ag/AgCl) que se coloca junto al electrodo de trabajo (cámara anódica).

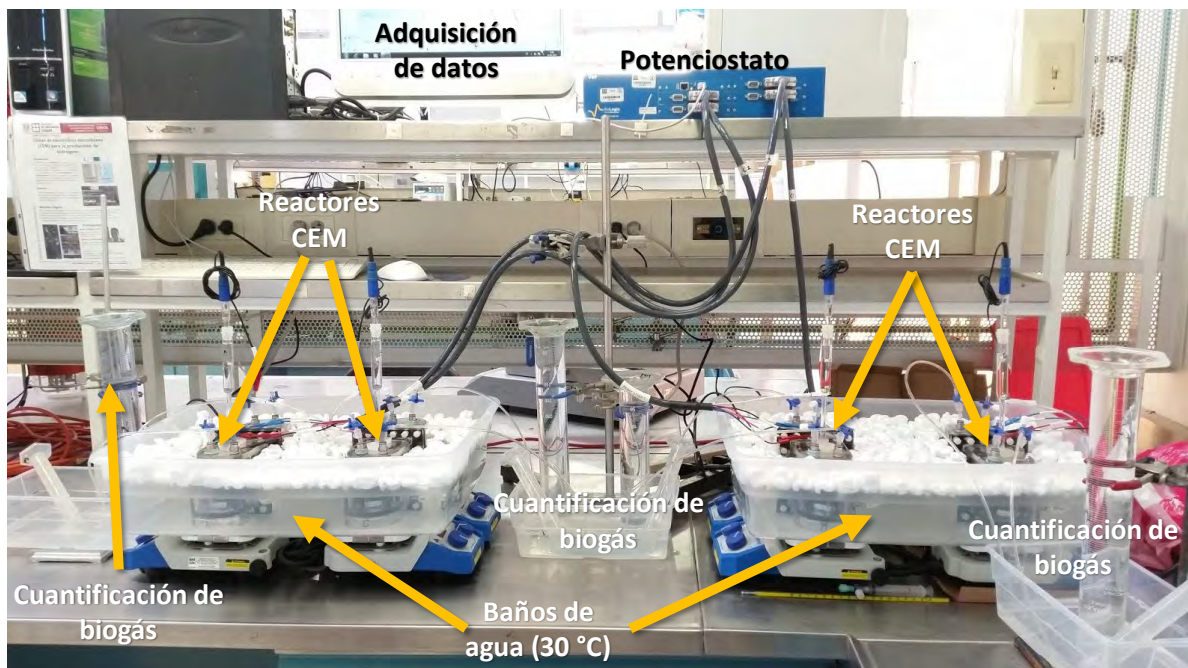


Figura 3.6. Arreglo experimental en laboratorio.

3.5 TÉCNICAS ANALÍTICAS

3.5.1 Determinación de biogás

El hidrógeno y biogás producidos se midieron por el método de desplazamiento en una probeta graduada que contenía agua acidificada (solución saturada de NaCl a pH = 2). Los volúmenes de hidrógeno cuantificados se normalizaron a condiciones estándar (273.15 °K y 1 bar). La producción volumétrica de hidrógeno (Q , mL H₂/L_{cat}/d) se evaluó ajustando los datos experimentales al modelo de Gompertz (Cardeña *et al.*, 2015).

$$H = H_{max} \exp \left\{ -\exp \left[\frac{R_{max} \times e}{H_{max}} (\lambda - t) + 1 \right] \right\} \quad \text{Ec. 3.1}$$

donde H corresponde a la producción acumulada de H₂ (mL), H_{max} a la producción acumulada máxima de H₂ en (mL), R_{max} la tasa de producción máxima de H₂ en (mL/h), t el tiempo del cultivo en (h), λ el tiempo de latencia en (h) y e es el número exponencial.

Las muestras de biogás se tomaron con una jeringa, succionando y desplazando el gas por lo menos dos veces para homogenizar la atmósfera. Una vez homogenizado el biogás se tomaron 5 mL de muestra e inmediatamente se inyectaron al cromatógrafo de gases.

Se utilizó un cromatógrafo de gases (SRI 8610C) provisto con un detector de conductividad térmica (TCD) y una columna de sílice-gel de 1.82 m en serie con una columna de tamiz molecular 13x de 1.82 m y un diámetro de 3.175 mm que trabajó a 40 °C durante 4 minutos y después se calentó a 110°C con un incremento de 20 °C/min. El gas portador utilizado fue nitrógeno con un flujo de 20 mL/min. La temperatura del inyector fue de 90 °C y del detector de 150 °C. Los datos de área obtenidos se cotejaron con la curva patrón realizada para cada gas y así poder determinar la composición del biogás.

3.5.2 Determinación de DQO y metabolitos

Para la determinación de DQO se utilizaron tubos HACH con dicromato de potasio y ácido sulfúrico en un rango de 0 – 1500 y 0 – 150 mg DQO/L. A cada vial se le adicionaron 2 mL de la muestra utilizando diluciones 1:4 para la alimentación (tubos de 1500 mg DQO/L) y para los efluentes diluciones 1:10 (150 mg DQO/L).

Se colocaron los tubos dentro del reactor HACH precalentado a una temperatura de 150°C y se efectuó la digestión por 2 horas. Después de las 2 horas se apagó el reactor y los tubos se dejaron

enfriar por 20 minutos. De nuevo se mezcló la solución, invirtiendo los tubos cuidadosamente y se leyeron en el espectrofotómetro HACH por el método 435 (DQO mayor a 150 mg/L) y 430 (DQO menor a 150 mg/L).

Para la determinación de solventes y AGVs en la fase líquida se utilizó un cromatógrafo de gases (Agilent 7890B) equipado con un detector de ionización de flama FID y utilizando una columna DB-FFAP (15 m x 530 μm x 1 μm , Agilent). Las condiciones de operación fueron las siguientes: la temperatura inicial del horno fue de 60 °C y se incrementó a 90 °C a una tasa de 15°C/min, posteriormente la temperatura aumentó a 170 °C a una razón de 25 °C/min; la temperatura del inyector fue de 190 °C y la del detector 275 °C; el gas portador fue nitrógeno. El lactato se cuantificó por cromatografía de iones usando un sistema Dionex ICS-1500 que utilizó una columna REIC IonPac AS23 (250 x 4 mm) (Ramos *et al.*, 2012). Adicionalmente el pH se midió con un potenciómetro OAKTON.

3.5.3 Determinación de proteína celular

Para la determinación de biomasa adherida al fieltro de grafito se utilizó la cuantificación de proteínas por el método de Lowry modificado (Lowry *et al.*, 1951). Se tomaron muestras de aproximadamente 0.5 x 0.5 cm del fieltro de grafito y se colocaron en tubos de ensayo con solución amortiguadora de fosfatos (volumen necesario para cubrir los soportes, 5 mL) por 45 min en un baño sonicador (Branson 2510R-DTH). Con la muestra sonicada se determinó la concentración de proteínas, por cada mL de muestra se agregó 1 mL de reactivo de formación de complejo (solución de $\text{Na}_2\text{CO}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, tartrato de sodio y potasio y SDS) recién preparada, se agitó y se dejó reposar por 10 min a temperatura ambiente. Posteriormente se adicionaron 0.5 mL de reactivo de Folin 0.2 N por cada mL de muestra y se agitó en vórtex para después dejarse reposar por 40 min a temperatura ambiente en oscuridad. El sobrenadante en los tubos se leyó en un espectrofotómetro HACH a 750 nm (DO_{750}). Se realizó una curva de calibración correlacionando los SSV vs DO_{750} . Las muestras de fieltro de grafito se secaron en la estufa a 110 °C hasta peso constante para determinar la concentración de biomasa por gramo de soporte (mg SV/g fieltro de grafito) (Guevara-López and Buitrón, 2015).

3.5.4 Análisis de la biopelícula microbiana

La caracterización de la comunidad microbiana de la biopelícula electroactiva se realizó extrayendo el ADN genómico de una muestra de biopelícula (0.5 g) usando un Power Soil DNA Extraction

Kit® (Mo Bio Laboratories, Inc., Carlsbad, CA, EE. UU.). La concentración de ADN extraída se ajustó a 20 ng/μL y se envió al *Research y Testing Laboratory* (RTL, Lubbock, TX, EE. UU.) para la amplificación y la pirosecuenciación del ADN. Para la secuenciación de los amplicones se usaron dos plataformas distintas (según se especificó): 454-Genome Sequencer FLX Titanium (Roche, Suiza) y MiSeq (Illumina, Inc., USA). Se utilizaron los pares cebadores (primers) 28F y 519R o 388R (según se especifique) para bacterias y 517F y 909R para arqueas para amplificar las regiones variables V1-V3 del gen bacteriano 16S rRNA y secuenciado mediante pirosecuenciación 454 (Dowd *et al.*, 2008). El algoritmo USEARCH y el software UCHIME se usaron para eliminar las secuencias quiméricas, cortas e individuales y el ruido (Edgar, 2010; Edgar *et al.*, 2011). Posteriormente, se seleccionaron secuencias que tenían al menos una longitud mínima de 250 pares de bases y una puntuación de calidad superior a 30. Las unidades taxonómicas operacionales (OTU) se seleccionaron mediante el algoritmo UPARSE (Edgar, 2013). El algoritmo de alineación USEARCH se usó para asignar una identidad taxonómica para cada OTU contra la base de datos RTL derivada de la base de datos NCBI.

La biopelícula también se analizó por microscopía electrónica de barrido (SEM). Para lo anterior el ánodo se retiró de la CEM y se tomaron muestras para SEM al final de la operación. Las muestras de fieltro de grafito con biopelícula se fijaron cuidadosamente en una solución de glutaraldehído al 3% en buffer de fosfato 10x (por litro: 8.06 g de NaCl, 0.22 g de KCl, 1.15 Na₂HPO₄ y 0.2 g de KH₂PO₄, pH=7.4) a 4 °C por 12 h. Después de enjuagar con solución 10x PBS, las muestras se deshidrataron progresivamente con etanol (15, 30, 45, 65 y 97%) durante 30 minutos cada una, posteriormente se desecaron en un secador de punto crítico y luego se cubrieron con oro (Au) en un equipo Denton Vacuum II. Finalmente, se observaron con un microscopio electrónico de barrido Evo 50 (Carl Zeiss).

3.6 TÉCNICAS ELECTROANALÍTICAS

3.6.1 Cronoamperometría

La cronoamperometría y voltamperometría cíclica se ejecutaron con el potenciostato/galvanostato VSP Z-01 (BioLogic Science Instruments, Francia). Las velocidades de barrido (1 y 10 mV/s) y potenciales anódicos estuvieron referenciados al electrodo de referencia Ag/AgCl (3.0 M KCl, +210 mV frente a SHE, Radiometer Analytical). Utilizando como electrodo de trabajo el fieltro de

grafito (ánodo) y la espuma de níquel como contraelectrodo (cátodo). La cronoamperometría se midió durante todo el tiempo que se operaron las CEM de dos cámaras.

3.7 CÁLCULOS PARA LA EVALUACIÓN DEL DESEMPEÑO DE LA CEM

3.7.1 Densidad de corriente

La medición de la densidad de corriente (j) determina la recuperación catódica de hidrógeno. La j se calculó a partir de los datos adquiridos por el potenciostato y puede reportarse como se indica a continuación:

$$j_A = I/A \quad \text{y} \quad j_V = I/v \quad \text{Ec. 3.2}$$

Donde I es la densidad de corriente, A es el área superficial del electrodo y v es el volumen de trabajo del reactor. La cantidad de amperes producido en las CEM se registró por el programa Ec Lab v11.18.

3.6.2 Eficiencia coulombica

La eficiencia coulombica (E_C) es el porcentaje de sustrato usado en la producción de corriente. A partir de este parámetro se determinó la cantidad de electrones capturados por el ánodo y usados en las reacciones bioelectroquímicas a partir de la oxidación de la materia orgánica (Sleutels *et al.*, 2011). La E_C se puede describir como la proporción del total de coulombs recuperados-obtenidos integrando la corriente a través del tiempo para los coulombs teóricos que pueden ser producidos a partir del sustrato, como se muestra a continuación:

$$E_C = \frac{M \int_0^t I dt}{Fbv\Delta C} \quad \text{Ec. 3.3}$$

Donde M : peso molecular del sustrato (g/mol), $\int_0^t I dt$: número de Coulomb por segundo (C/s), F : constante de Faraday (96485 C/mol), b : número de electrones transferido por mol de sustrato oxidado, v : volumen de la solución del sustrato (ánodo), ΔC : Sustrato consumido durante un periodo de tiempo determinado (mol/L)

Otra definición más sencilla de entender es que la eficiencia coulombica representa el número de electrones recuperados como flujo de corriente eléctrica respecto al número máximo teórico de electrones calculados del consumo de sustrato durante un ciclo. Esto se puede representar de la siguiente forma:

$$E_c = \frac{n_{EC}}{n_{th}} \quad \text{donde} \quad n_{th} = 2\Delta DQO/M_{O_2} \quad \text{y} \quad n_{CE} = \left(\int_{t-0}^t Idt \right) / 2F \quad \text{Ec. 3.4}$$

n_{th} equivale al número de moles de sustrato convertidos n_s multiplicados por la producción estequiométrica de hidrógeno de 1 mol de sustrato. El rendimiento en base a la DQO es fácilmente calculable porque cada mol de DQO removida produce 2 mol de hidrógeno. En la ecuación n_{th} , M_{O_2} (32 g/mol) es el peso molecular del oxígeno. Para celulosa, el rendimiento máximo molar es 12 mol H_2 /mol hexosa o 2 mol H_2 /mol DQO. Mientras que los moles de hidrógeno que pueden ser recuperados basándose en la medición de corriente se da por n_{CE} . En este trabajo el potencióstato a través del Ec Lab v11.18 almacena la cantidad de coulombs que han sido cosechados en el ánodo y que han sido transferidos al cátodo de esta manera se determinó automáticamente el término $\int_{t-0}^t Idt$.

3.6.3 Recuperación y rendimiento de hidrógeno en el cátodo

La recuperación de hidrógeno en el cátodo r_{cat} está definida como el porcentaje de corriente utilizada en la producción de hidrógeno sobre el cátodo. Ésta se puede utilizar para evaluar el potencial de hidrógeno perdido en la CEM debido a la fuga de gas y/o electrones y al hidrógeno consumido en el cátodo. Se puede calcular con la siguiente ecuación:

$$r_{cat} = \frac{n_{H_2}}{n_{CE}} \quad \text{Ec. 3.5}$$

donde n_{H_2} corresponde a los moles de hidrógeno recuperadas realmente en el electrodo (22.4 L/mol a 0 °C) y n_{CE} es la cantidad de moles de hidrógeno teórico que se puede producir a partir de la densidad de corriente generada.

La recuperación total de hidrógeno (r_{H_2}) se calculó de la siguiente manera:

$$r_{H_2} = C_E * r_{cat} \quad \text{Ec. 3.6}$$

La cantidad de hidrógeno producido de un sustrato es el rendimiento de hidrógeno. Por lo general se calcula para compuestos específicos sobre una base molar $Y_{H_2} = n_{H_2}/n_s$, donde n_{H_2} es el número

de moles producidos de hidrógeno y n_{H_2} es el número consumido de moles de sustrato. El rendimiento de hidrógeno está dado por la siguiente ecuación:

$$Y_{H_2} = \frac{v_{H_2} P M_S}{RT \Delta c_S} \quad \text{Ec. 3.6}$$

donde v_{H_2} es el volumen de hidrógeno producido (L), P : presión atmosférica (bar), M_S : peso molecular del sustrato (g/mol), R : constante de los gases ideales 0.08314 (L bar/K mol), T : temperatura (K) y Δc_S es el sustrato consumido (g).

Si se usa una fuente compleja de materia orgánica, como aguas residuales, es mejor utilizar el rendimiento basado en masa o $Y_{H_2} = m_{H_2}/m_S$, donde m_{H_2} es el total de masa de hidrógeno producido y m_S es la masa consumida de sustrato. Para un cambio medido en la DQO durante un ciclo de proceso por lotes o un período de tiempo en un experimento de flujo continuo, el rendimiento de hidrógeno sobre una base de DQO-masa es:

$$Y_{H_2} = \frac{V_{H_2} P M_{H_2}}{RT \Delta DQO}$$

donde ΔDQO (g) es el consumo de DQO acumulado durante un periodo de tiempo determinado, M_{H_2} (2 g/mol) es el peso molecular del hidrógeno, P es la presión atmosférica (bar), R representa la constante de los gases ideales 0.08314 (L bar/K mol) y T es la temperatura (K) (Logan *et al.*, 2008).

3.6.3 Eficiencia energética

En un sistema CEM, la energía de entrada son la electricidad y sustrato consumido y la energía de salida es el hidrógeno producido. La eficiencia energética se puede calcular basándose solamente en la electricidad de entrada (eficiencias de energía eléctrica) o basada en ambos entrada de electricidad y sustrato (eficiencia energética general). La eficiencia energética eléctrica (η_E) se puede calcular de la siguiente forma:

$$\eta_E = \frac{W_{H_2}}{W_E} = \frac{n \Delta G_{H_2}}{V \int_0^t I dt}$$

donde W_{H_2} es la cantidad de energía recuperada como hidrógeno, W_E es la cantidad de energía eléctrica aplicada al sistema, n es el número de moles de hidrógeno producidos en el tiempo t ; ΔG_{H_2} (-237.1 kJ/mol) es el contenido de energía de hidrógeno basado en la oxidación por el oxígeno a

agua; V es el voltaje aplicado e I es la corriente generada al voltaje aplicado V (Hong Liu *et al.*, 2010).

La eficiencia energética general (η_{E+S}) se calcula a partir de la siguiente ecuación:

$$\eta_{E+S} = \frac{W_{H_2}}{W_E + W_S} = \frac{n_{H_2} \Delta G_{H_2}}{V \int_0^t I dt + \Delta \text{COD} \Delta H_s}$$

donde W_S es la cantidad de energía química consumida y ΔH_s es la entalpía determinada para aguas residuales municipales ($\Delta H_s = -14.7 \text{ kJ/g DQO}$) (Logan *et al.*, 2008).

CAPÍTULO IV

4. MEJORA DE LA PRODUCCIÓN DE HIDRÓGENO AL IMPLEMENTAR UNA ESTRATEGIA DE PUESTA EN MARCHA DISMINUYENDO EL POTENCIAL ANÓDICO EN CEMS

4.1 INTRODUCCIÓN

Los residuos de alimentos de los restaurantes se componen principalmente de carbohidratos (celulosa y almidón), lípidos y proteínas. Mediante la fermentación oscura, los residuos alimenticios pueden transformarse en H_2 (Moreno-Andrade *et al.*, 2015). El proceso de fermentación oscura o fermentación anaerobia para la producción de hidrógeno consiste en la transformación de sustratos orgánicos (principalmente carbohidratos) a hidrógeno y dióxido de carbono a través de bacterias anaerobias fermentativas estrictas o facultativas que incluyen géneros como *Clostridium*, *Enterobacter*, *Bacillus* y *Escherichia coli* (Kumar *et al.*, 2018). Sin embargo, en condiciones óptimas, aproximadamente el 60-70% de la materia orgánica que se alimenta a estos procesos se transforma en ácidos grasos volátiles (AGV) y solventes, por ejemplo, ácido acético, ácido propiónico, ácido butírico y etanol (Ntaikou *et al.*, 2010). Por lo tanto, es necesario tratar los metabolitos que se generan durante la fermentación oscura para aumentar el rendimiento total de hidrógeno y dar tratamiento al efluente generado. Cuando la fermentación oscura se combina con las CEM, se obtiene un proceso en cascada que resulta en el uso idóneo de los residuos biodegradables y maximiza la recuperación de hidrógeno como un producto de valor agregado (Lu y Ren, 2016).

En las CEM, el potencial anódico aplicado (E_{an}) se puede establecer utilizando un potencióstato. Es importante señalar que el E_{an} junto con el potencial de las terminales de las proteínas respiratorias en los microorganismos exoelectrogénicos influyen en las condiciones de crecimiento bacteriano y la cantidad de energía disponible para el metabolismo celular (Kumar *et al.*, 2017; Torres *et al.*, 2009; Wagner *et al.*, 2010). Sin embargo, a pesar de que el potencial anódico se puede utilizar para controlar el crecimiento microbiano y la actividad en los diferentes sistemas bioelectroquímicos no existe un método aceptado para definir un potencial óptimo (Aelterman *et al.*, 2008; Wagner *et al.*, 2010). Se ha observado que cuando se controla el E_{an} se incrementa la

producción de hidrógeno catódico y se disminuye el tiempo de reacción (Nam *et al.*, 2011). Los potenciales de electrodo pueden ser positivos o negativos dependiendo de la reacción que se quiera llevar a cabo. Potenciales negativos (-0.15 y -0.09 V vs Ag/AgCl) generaron densidades de corriente más altas y formaron biopelículas visualmente más gruesas que los ánodos con E_{an} positivos (+0.02 y +0.37 V vs Ag/AgCl). Cercado *et al.*, (2013b). observaron que potenciales más positivos (0.1 V vs SCE, 8.9 A/m²) resultaron más favorecedores que potenciales negativos (-0.4 V vs SCE, 6.3 A/m²) para obtener biopelículas con mayor electroactividad utilizando 3 diferentes materiales para el ánodo. En el caso de la producción de hidrógeno en CEM se ha visto que independientemente del mecanismo de transferencia, los electrones liberados por los microorganismos exoelectrogénicos elevan el E_{an} en el transcurso de la colonización (Kumar *et al.*, 2017). Por tanto, un E_{an} alto (positivo) debería permitir que los microorganismos exoelectrogénicos ganen más energía por electrón transferido que las reacciones llevadas a cabo con un potencial negativo, pero este aumento solo ocurre si los microorganismos tienen vías metabólicas que son capaces de capturar la energía disponible (Wagner *et al.*, 2010). Se ha informado que las cepas relacionadas con *Geobacter* tienen ventajas competitivas a diferentes E_{an} cuando están presentes en un consorcio mixto como inóculo (Commault *et al.*, 2013). Por lo tanto, la selección adecuada del E_{an} podría seleccionar mejor las bacterias exoelectrogénicas en el momento de la colonización y mejorar la formación de la biopelícula electroactiva en el ánodo. En general se observa que los rendimientos de los sistemas bioelectroquímicos mejoran al utilizar E_{an} positivos (Wagner *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2009).

Cho y Ellington, (2007) observaron en CCM que había una disminución inversamente proporcional entre el periodo de latencia y el potencial anódico. Se demostró que el periodo de latencia se acortaba de 90 a 5 h, al aumentar el E_{an} de 0 a 0.5 V vs Ag/AgCl. De manera similar, un E_{an} de 0.2 V (vs Ag/AgCl) incrementó la electroactividad de la biopelícula respecto a una CCM sin mantener fijo el E_{an} (X. Wang *et al.*, 2009). Asimismo, se observó que el tiempo de arranque disminuyó de 59 a 35 días cuando se empleó un E_{an} positivo (0.2 V) (Wang *et al.*, 2009). Hay que agregar que los E_{an} pueden estimular metabólicamente a las bacterias exoelectrogénicas para cambiar el mecanismo de transferencia de electrones de la reacción entre las células y el ánodo (Busalmen *et al.*, 2008; Huan Liu *et al.*, 2010; Liu *et al.*, 2011). Cho y Ellington (2007) concluyeron que es posible seleccionar bacterias electroactivas con la aplicación de diferentes potenciales y obtener una biopelícula robusta mediante la variación del E_{an} a lo largo del tiempo. Wagner *et al.* (2010)

sugirieron que un E_{an} relativamente alto (0.2 V vs Ag/AgCl) puede promover la mejor actividad bacteriana, lo que estimula las vías electroquímicas que permiten un crecimiento rápido y una gran ganancia de energía por parte de las células. Al mismo tiempo, un E_{an} bajo puede ser útil para producir una alta densidad de corriente, lo que resulta en una buena producción de hidrógeno. A potenciales superiores de 0.37 V vs Ag/AgCl la biopelícula sobre el ánodo presenta una comunidad más diversa reduciendo las densidades de potencia obtenidas ya que es más difícil a *Geobacter* hacer contacto directo con el ánodo debido a la presencia de microorganismos no exoelectrógenos (Wagner *et al.*, 2010). Estos datos indican que una posible estrategia para la puesta en marcha de las CEM podría ser una colonización rápida del ánodo mediante el uso de un E_{an} relativamente alto (0.5 V vs Ag/AgCl), seguido de la disminución de E_{an} (0.3 V vs Ag/AgCl) para aumentar la actividad de la biopelícula electroactiva mejorando la producción de hidrógeno. El objetivo de esta sección consistió en evaluar una estrategia de puesta en marcha de una CEM productora de hidrógeno en la cual el E_{an} se disminuye (de 0.5 a 0.3 V) una vez que la biopelícula electroactiva se haya formado. La estrategia se aplicó a dos efluentes acidogénicos generados en la fermentación oscura de la fracción orgánica de residuos alimentarios utilizando una CEM de dos cámaras.

4.2 MATERIALES Y MÉTODOS

Los residuos alimenticios se obtuvieron de una cafetería del Campus Juriquilla de la UNAM, en Querétaro, México. La caracterización de los residuos de alimentos, la operación y el rendimiento del proceso de fermentación oscura se describen por Moreno-Andrade *et al.*, (2015). El reactor SBR contaba con 1 L de volumen de trabajo y 0.3 L de espacio de cabeza con un volumen de intercambio del 50 %. El SBR se alimentó con 5 g de sólidos volátiles iniciales como sustrato en cada ciclo de degradación usando cuatros TRH (72, 24, 12 y 6 h) y el pH se ajustó a un valor inicial de 5.5 y debido a la baja alcalinidad del sustrato se usó una solución tampón de citrato (1 M) para evitar la acidificación del medio debido a la presencia de AGVs. Lodo granular anaerobio se utilizó como inóculo (16 g/L peso seco) y se pretrató térmicamente a 103-105 °C durante 24 h. El fermentador oscuro SBR funcionó durante al menos 10 ciclos de degradación antes de aplicar el siguiente TRH, la temperatura de operación fue de 35 °C y se agitó a 100 rpm durante las fases de llenado y reacción. La estrategia de operación para el SBR fue la siguiente: tiempo de llenado (5 min), tiempo de reacción (variable dependiente del TRH) y tiempo de sedimentación (60 min). El efluente acidogénico (EA) se obtuvo del efluente del reactor SBR para los diferentes TRH. El efluente se sedimentó (30 min) y filtró a través de un tamiz de 20 μ m dos. Para evaluar la influencia

de la composición inicial del efluente acidogénico, se obtuvieron dos lotes de los efluentes acidogénicos (EA 1 y EA 2) producidos para el fermentador oscuro tipo SBR y se almacenaron a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. La diferencia en la composición del efluente se debió a los diferentes tiempos de retención hidráulica en el fermentador (Moreno-Andrade *et al.*, 2015). Las características de cada lote se presentan en la Tabla 4.1. La diferencia más significativa entre estos dos lotes se encuentra en la composición de acetato, la cual es 3 veces más en el EA 2. De igual forma la cantidad de propionato, butirato, valerato y caproato se encuentran al doble en el EA 2 en comparación con el EA 1.

Tabla 4.1. Características del efluente de la fermentación oscura del tratamiento de residuos alimenticios.

EA	Concentración (mg/L)							
	Acetato	Propionato	Butirato	Valerato	Caproato	Lactato	N-NH ₃	DQO
1*	865 ± 150	763 ± 96	644 ± 77	573 ± 68	156 ± 28	3367 ± 690	193 ± 32	8742 ± 215
2	2627 ± 241	1239 ± 98	1245 ± 88	1109 ± 79	302 ± 17	2979 ± 802	213 ± 24	13050 ± 671

*Etanol: 183 ± 63 mg/L

Se ha informado que altas concentraciones de sustrato tienen un efecto inhibitorio y no favorecen la producción de hidrógeno y disminuyen la eficiencia energética en las CEM (Li *et al.*, 2014; Rivera *et al.*, 2015; Yossan *et al.*, 2013; Cercado-Quezada *et al.*, 2010). Por lo tanto, los EA (1 y 2) se diluyeron con solución buffer de fosfatos (100 mM SBF) para tener una concentración de aproximadamente 1.5 g DQO/L. Durante la fase de formación de la biopelícula se agregaron solución mineral y de vitaminas a la alimentación. A partir del sexto ciclo, no se agregaron minerales y vitaminas.

El reactor utilizado fue el de bordes cuadrados descrito en el capítulo III (Fig. 3.2). El funcionamiento de la CEM se llevó a cabo por lotes, y al final de cada ciclo, se sustituyeron el anolito y el catolito. La colonización del ánodo se monitoreó a partir de los perfiles de densidad de corriente tal como se describe en el capítulo III. La estrategia de puesta en marcha consistió en aplicar un E_{an} de 0.5 V durante 7 ciclos (formación de biopelícula electroactiva estable) y posteriormente se ajustó el E_{an} a 0.3 V.

4.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.3.1 Colonización

Después de 7 días de operación, la actividad de los microorganismos electroactivos aumentó, como lo indica la densidad de corriente (Fig. 4.1). La CEM funcionó durante 27 días (4 ciclos),

manteniendo el lodo granular anaerobio en la cámara anódica. A continuación, las CEM se mantuvieron durante tres ciclos más a un E_{an} de 0.5 V y con el sustrato EA 1. Para todos los resultados, se consideraron sólo los ciclos que presentaron estabilidad, es decir, no se tuvieron en cuenta los ciclos de adaptación a las nuevas condiciones operacionales. La densidad de corriente máxima obtenida ($26.2 \pm 0.9 \text{ A/m}^3$ ó $12.2 \pm 0.4 \text{ A/m}^2$) fue similar durante los últimos tres ciclos de colonización, lo que indicó la adhesión de la comunidad electroactiva al ánodo posteriormente se removió la fuente de inóculo (lodo granular anaerobio) sin efecto en el desempeño de la CEM. Por lo tanto, se determinó que las bacterias exoelectrogénicas formaban una biopelícula madura en el ánodo (Carmona-Martínez *et al.*, 2015; Liu y Hu, 2012). El tiempo de puesta en marcha fue inferior al período que informaron Wang *et al.* (2009) (35 días). La cantidad de hidrógeno que se generó (Q) fue $337 \pm 7 \text{ mL H}_2/\text{L}_{cat}/\text{d}$ (Fig. 4.2), mientras que la r_{cat} , r_{H_2} y Y_{H_2} fueron $94 \pm 2\%$, $57 \pm 3 \%$ y $806 \pm 45 \text{ mL H}_2/\text{g DQO}$, respectivamente. En tales condiciones, la eliminación de materia orgánica, medida como DQO, fue de $56 \pm 9 \%$ y la E_C de $61 \pm 4\%$. El bajo rendimiento de la E_C se puede relacionar con el uso del sustrato para la formación de la biopelícula en lugar de la generación de electrones cosechables (Carmona-Martínez *et al.*, 2015; Marone *et al.*, 2017). Las estrategias de colonización anódica y el enriquecimiento de colonias con bacterias exoelectrogénicas se ha demostrado utilizando acetato como sustrato (Li *et al.*, 2014; Marone *et al.*, 2017); sin embargo, el uso de un sustrato real en la puesta en marcha representó una presión de selección adicional para obtener una biopelícula electroactiva robusta, lo que conduce a un mejor rendimiento en la oxidación y transformación de materia orgánica a electrones, como lo indica el tiempo para que la actividad electrogénica (7 días) en la biopelícula sobre el ánodo hiciera su aparición.

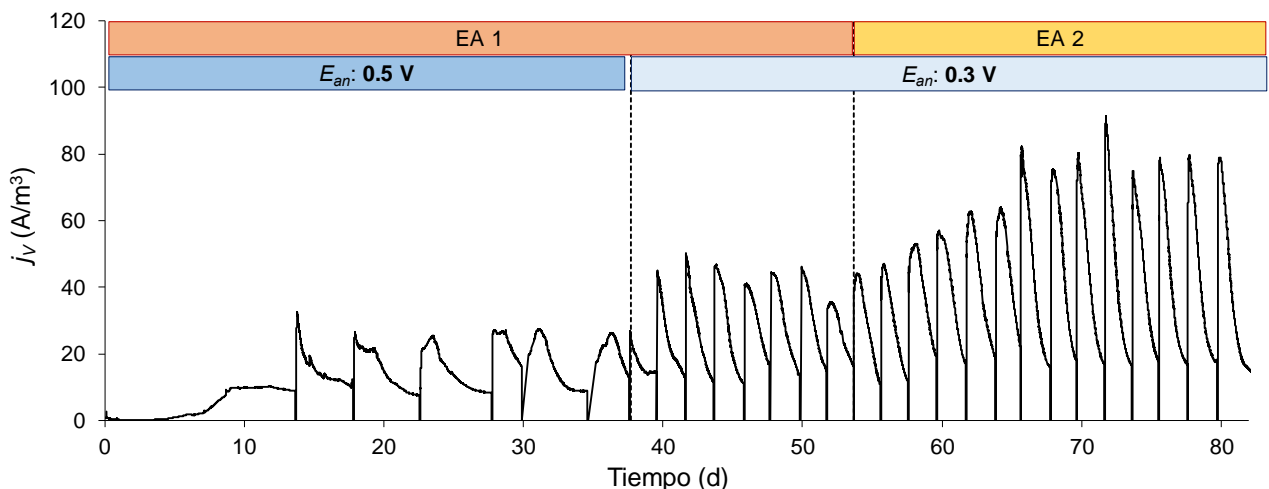


Figura 4.1. Cronoamperometría general obtenida durante la actividad experimental.

4.3.2 Efecto del E_{an} sobre la producción de H_2 en CEM

Durante la fase de colonización a $E_{an}:0.5$ V, los tiempos de reacción duraron aproximadamente de 72 h. Sin embargo, cuando el E_{an} disminuyó a 0.3 V (día 38), el tiempo de reacción se redujó a 48 h (Fig. 4.1). En general, el rendimiento de las CEM de dos cámaras fue satisfactorio a lo largo de los experimentos. Sin embargo, es importante señalar que la tasa de producción de hidrógeno aumentó en un 72 % y el rendimiento energético en relación con la entrada eléctrica mejoró en un 66 % (Fig. 4.2 y Tabla 4.2). Al realizar el análisis de varianza (ANOVA), se encontró que la variación E_{an} tuvo un efecto significativo positivo en el volumen y la tasa de producción de hidrógeno, así como en la densidad de corriente y η_E . A pesar del cambio en E_{an} , el gradiente de pH ($\Delta pH = 4.2 \pm 0.4$) no varió significativamente ya que el pH en el anolito disminuyó a 6.4 ± 0.1 y el pH en el catolito aumentó a 10.6 ± 0.5 para ambos potenciales (pH inicial de electrolitos: 7). El gradiente de pH entre las cámaras afecta directamente la producción de hidrógeno. La reacción electroquímica para la producción de hidrógeno requiere mayor energía cuando se presenta el gradiente de pH que usualmente es de 0.06 V por unidad de diferencia de pH entre las dos cámaras (Logan *et al.*, 2008). Por lo tanto, en cada cambio de ciclo se reemplazó el catolito para evitar una mayor resistencia por un pH alto en el cátodo.

La presencia de metano e hidrógeno en la cámara anódica puede explicar la pérdida de electrones en la oxidación del sustrato, disminuyendo la E_C (<70 %). En la cámara catódica, solo se detectó H_2 durante el análisis cromatográfico. El valor de r_{cat} fue superior al 90 %, lo que indica que se produjo una conversión satisfactoria de electrones a hidrógeno en el cátodo. Sin embargo, faltan algunos electrones que se usan en reacciones electroquímicas simultáneas (reducción de iones metálicos) en el cátodo (Carmona-Martínez *et al.*, 2015). Obviamente, η_E aumentó casi 66 % cuando el E_{an} disminuyó. La tasa de producción de hidrógeno por cantidad de DQO removida no difirió significativamente y alcanzó un aproximado del 63 % del valor óptimo (1419 ml de H_2/g DQO) reportado por Logan *et al.*, (2008). Es importante mencionar que el funcionamiento de las CEM depende del rendimiento del ánodo y potencial del cátodo, que varía de acuerdo con las condiciones operacionales (Logan *et al.*, 2008).

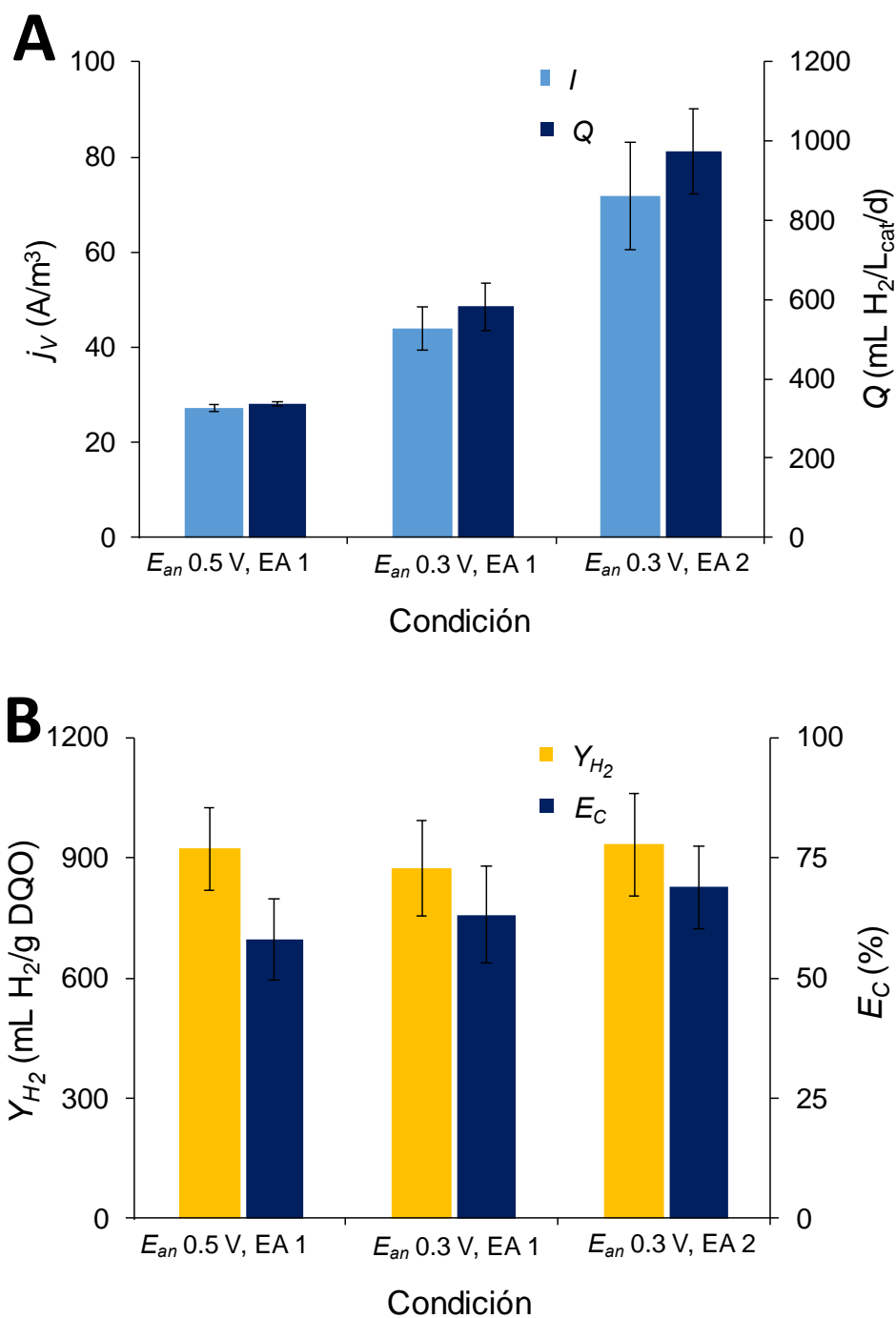


Figura 4.2. Rendimiento: A) densidad de corriente y tasa de producción de hidrógeno; B) rendimiento y eficiencia coulombica de la CEM bajo diferentes condiciones de operación. Todos los resultados son duplicados. Las variables de respuesta se determinaron a partir de la media de $n = 6$ para la condición 1, $n = 12$ para la condición 2 y $n = 16$ para la condición 3. ($n =$ número de ciclos).

Tabla 4.2. Resumen de los resultados de la CEM a las diferentes condiciones operacionales.

E_{an} (V)	EA	H ₂ (mL)	DQO_{rem} (%)	r_{cat} (%)	r_{H_2} (%)	η_E (%)	η_{E+S} (%)	j_A (A/m ²)
0.5	1	261 ± 60 ^a	47 ± 3	93 ± 13	66 ± 7	244 ± 27	52 ± 6	12.7 ± 0.1
0.3	1	237 ± 15 ^b	45 ± 6	99 ± 6	62 ± 9	406 ± 24	53 ± 6	20.5 ± 2.2
0.3	2	337 ± 16 ^b	55 ± 8	97 ± 5	67 ± 9	396 ± 21	56 ± 7	34.0 ± 4.9

Los tiempos de reacción fueron: ^a72 h y ^b48 h.

Nota: Todos los resultados consideran el duplicado. Las variables de respuesta se midieron a partir de la media de n = 6 para la condición 1, n = 12 para la condición 2 y n = 16 para la condición 3.

Se observó una disminución en la eficiencia de remoción de DQO de 56 ± 5 a 47 ± 3 % cuando el inóculo se removió de la cámara anódica (colonización), lo que indica que la biomasa suspendida contribuyó a la remoción de DQO. Además, durante la disminución en el E_{an} de 0.5 a 0.3 V se observó una reducción adicional en la remoción de materia orgánica en forma de DQO del 8%. Sin embargo, después de 2 ciclos en esas condiciones, la remoción de DQO aumentó al 46% (respecto al 34 % al cambiar el E_{an}), lo que indica que se requería un tiempo de adaptación para los microorganismos. Sin embargo, es importante tener en cuenta que el efecto para el cambio de E_{an} no fue significativo para la DQO removida. A pesar de la ligera variación en el consumo de DQO, las otras variables de respuesta se mantuvieron estables después de la reducción del potencial anódico (Tabla 4.2). Por lo tanto, es importante tener en cuenta que el E_{an} (Aelterman *et al.*, 2008) y la madurez de la biopelícula (Carmona-Martínez *et al.*, 2015) influyen en el rendimiento de un sistema bioelectroquímico.

Durante la colonización, se logró una mayor eliminación de AGVs porque la fuente del inóculo estaba presente y, por lo tanto, había una mayor cantidad de microorganismos que podían degradar la materia orgánica (Fig. 4.3). El acetato es el sustrato más fácilmente oxidable por las bacterias exoelectrogénicas (Yang *et al.*, 2015). No obstante, el resultado de las vías metabólicas de consumo y descomposición de los compuestos más complejos (lactato, caproato, valerato y butirato) es producir acetato, y por lo anterior no es posible lograr una eliminación del 100 % (Gao *et al.*, 2014). El etanol también estuvo presente a 64 mg/L y se consumió el 100 %.

4.3.2 Efecto de la composición de sustrato sobre la producción de H₂ en CEM

Se observó que el cambio en la composición del sustrato influyó en el rendimiento del sistema bioelectroquímico productor de H₂ (Fig. 4.2, 4.3 y Tabla 4.2). En particular, el análisis ANOVA

reveló que la composición del EA tenía un efecto significativo sobre el volumen generado de H₂, Q, DQO removida y densidad de corriente. El volumen de H₂ y Q aumentaron un 42%, aunque durante el experimento se obtuvo una Q máxima de 1 L H₂/L_{cat}/d con un buen rendimiento de la CEM (E_C : 78%, r_{cat} : 98%, r_{H_2} : 77% y Y_{H_2} : 1073 ml de H₂/g DQO).

Es interesante que la E_C , r_{cat} , r_{H_2} , η_E e Y_{H_2} se mantuvieron estables a pesar de los cambios en la composición de EA, lo que indica una alta estabilidad en el sistema bioelectroquímico como resultado de la conversión del 67 ± 9 % del sustrato a electrones y su uso para la producción de H₂ (Tabla 4.2). La eficiencia energética general también se mantuvo estable y se mantuvo en 56 ± 7 % para ambas alimentaciones. No se consigue una conversión adicional del sustrato en electrones debido a la presencia de otros microorganismos que no son exoelectrogénicos, pero se ha informado su presencia en CEM (por ejemplo, Clostridiales y Bacteroidales). Sin embargo, la pérdida de electrones del sustrato no es significativa ya que la E_C que se obtuvo estuvo en el rango (70%) de los reportados para los efluentes acidogénicos (Lalaurette *et al.*, 2009; Li *et al.*, 2014; Marone *et al.*, 2017). Una posible explicación para el mejor rendimiento en el cambio de sustrato es que las bacterias exoelectrogénicas asimilan mejor los metabolitos del EA 2, especialmente al recordar que este lote tenía una mayor cantidad de acetato. La eliminación de materia orgánica del EA 2 fue un 19 % mayor que la del EA 1.

La eliminación de AGVs del EA 1 y 2 se muestra en la Fig. 4.3. El consumo de acetato (93-96 %) en términos de porcentaje se encontró de manera similar en todos los experimentos, pero los gramos de acetato que se consumieron aumentaron más del doble cuando el EA 1 fue sustituido dado que la cantidad de acetato era mayor en el EA 2. El propionato se oxidó más fácilmente que el butirato (Li *et al.* 2014). El consumo de lactato disminuyó en el EA 2, muy probablemente debido a la prioridad que los microorganismos dieron al consumo de acetato. *Geobacter sulfurreducens* puede usar lactato como un aceptor de electrones, pero con una eficiencia reducida en comparación con el acetato. La asimilación del lactato disminuye el crecimiento de la biopelícula y causa la oxidación parcial del acetato (Speers y Reguera, 2012). Otros metabolitos requieren establecer relaciones simbióticas con otros microorganismos que pueden actuar como intermediarios que permitan transformar los metabolitos en compuestos más simples (Müller *et al.*, 2010). Este proceso se describirá con más detalle en la siguiente sección.

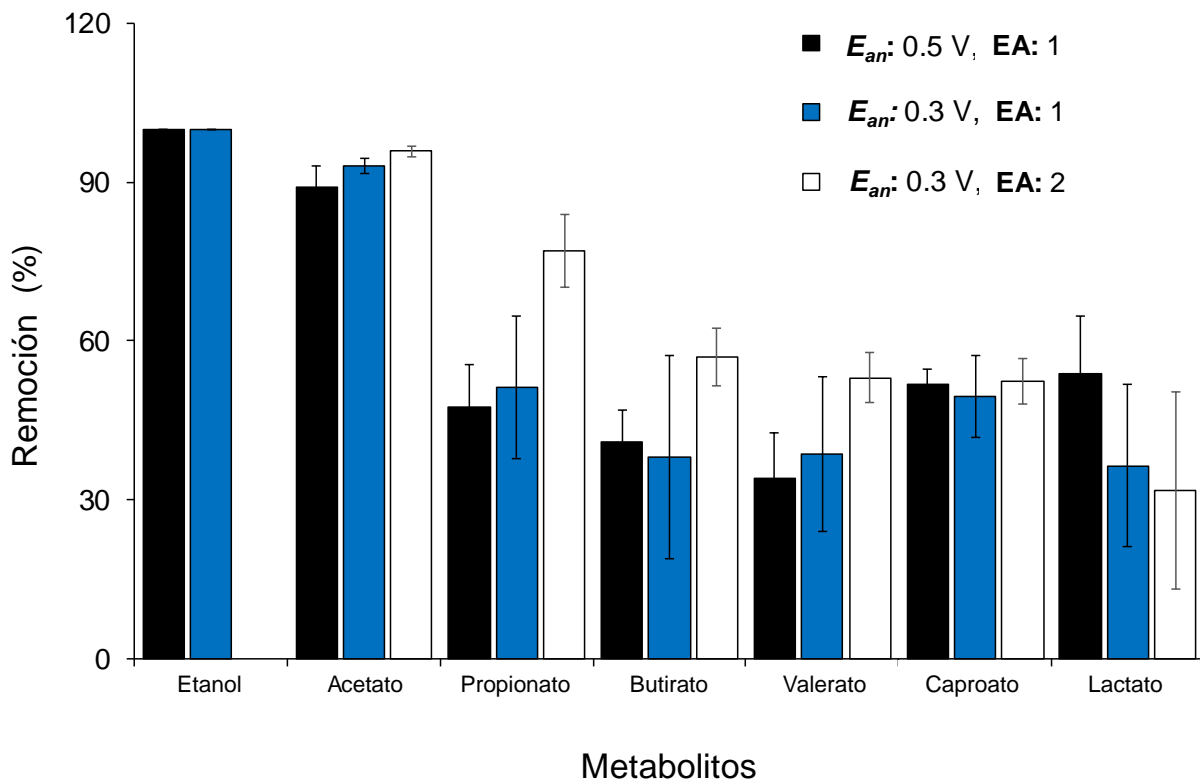


Figura 4.3. Comparación de la remoción de metabolitos en las tres condiciones de operación. Todos los resultados son duplicados. Las variables de respuesta se determinaron a partir de la media de $n = 6$ para la condición 1, $n = 12$ para la condición 2 y $n = 16$ para la condición 3. ($n =$ número de ciclos).

El gradiente de pH generado por el EA 2 en la CEM alcanzó 5.5 ± 0.2 unidades y resultó de un aumento significativo del pH en el catolito (11.6 ± 0.1) y una disminución en el pH del anolito a 6.2 ± 0.1 . Este desequilibrio del pH se debió probablemente el resultado de la incapacidad de un número considerable de iones cargados negativamente como OH^- para cruzar la membrana y migrar a la cámara anódica debido a un mayor requerimiento energético para que lo anterior pudiera suceder (Carmona-Martínez *et al.*, 2015). La bioincrustación podría ser responsable de la disminución en la transferencia de masa de especies iónicas, este fenómeno se produce por el uso de materia orgánica (incluso a baja concentración) que obstruye los poros disponibles de la membrana (Erbale *et al.*, 2012). Este efecto puede verificarse observando que el gradiente de pH aumenta en 1.5 unidades desde el principio hasta el final del funcionamiento del sistema. Aunque es curioso observar, que en los casos de mayores tasas de producción de H_2 y mejor rendimiento de la CEM, los gradientes de pH a menudo también son altos. Cuando se utiliza una MIA en las CEM, la reacción de electrólisis biocatalizada que se produce en el cátodo para obtener hidrógeno es la siguiente: $2\text{H}_2\text{O} + 2e^- \rightarrow 2\text{OH}^- + \text{H}_2$, en la que el agua se reduce a hidrógeno y los iones

hidroxilo se producen equimolarmente con los electrones consumidos (Rozendal *et al.*, 2007). Por lo tanto, cuando se combinan bioincrustaciones con una alta producción de H₂ se tiene un exceso de iones de hidroxilo en el catolito, lo que produce un aumento en la alcalinidad, esto explica el hecho de que el EA 2 presente un gradiente de pH más alto que EA 1. La diferencia entre el pH final en el catolito para EA 1 y EA 2 es 1 mientras que para el anolito sólo representa 0.2 unidades de pH. La Tabla 4.3 compara los estudios previos sobre la producción de hidrógeno en CEMs que utilizan efluentes acidogénicos.

4.3.2 Análisis de la biopelícula

La Fig. 4.4 muestra imágenes SEM del ánodo (fieltro de grafito) de la CEM. La Fig. 4.4A muestra los hilos que forman el fieltro de grafito (control) antes de la inoculación de la CEM con lodo granular anaerobio. Los hilos tienen un diámetro aproximado de 20 µm y una estructura cilíndrica. Posteriormente, la Fig. 4.4 (B, C y D) muestran una adhesión microbiana densa sobre los hilos de fieltro de grafito. La Fig. 4.4B revela una biopelícula densa alrededor del soporte. Las micrografías SEM que se muestran en las Figs. 4.4 (A y B) están en la misma escala (1.5 kX), y se puede ver el contraste entre el ánodo sin y con una biopelícula electroactiva. La Fig. 4.4 (C y D) muestra una biopelícula homogénea de células que tienen aproximadamente 1 µm de tamaño y tienen una morfología en forma de varilla. No se observaron nanoalambres, pili u otros apéndices evidentes en las imágenes. Las bacterias exoelectrogénicas se conectan y se agregan a la superficie del ánodo, formando una matriz viviente de proteínas y azúcares (Khater *et al.*, 2017). La biopelícula electroactiva anódica estaba dominada por microorganismos flagelados y de varillas que están relacionados con la morfología de *Geobacter* spp. Esta morfología ha sido reportada para los miembros de Geobacteraceae, que son varillas gram negativas con extremos redondeados que no forman esporas (Röling, 2014).

Tabla 4.3. Resultados obtenidos en estudios que han utilizados efluentes acidogénicos como sustrato para la producción de hidrógeno en CEM (FO=Fermentación oscura).

Sustrato	Voltaje aplicado (V)	Ánodo	Cátodo	Q (mL H ₂ /L _{cat} /d)	DQO _{rem} (%)	C_E (%)	r_{cat} (%)	η_E (%)	Y_{H_2} (g H ₂ /g DQO)	Referencia
Efluente de FO – Melazas	0.8	Cepillo de grafito	Tela de carbono c/Pt	1410	-	87	95	246	1170	(Lu <i>et al.</i> , 2009)
Efluente sintético	0.5	Cepillo de fibras de carbono	Tela de carbono c/Pt	1020	93	90	89	270	1204	(Lalaurette <i>et al.</i> , 2009)
Efluente de FO – tallo de maíz	0.8	Fieltro de grafito	Tela de carbono c/Pt	3430	44	71	90	166	1170	(Li <i>et al.</i> , 2014)
Efluente de FO – Glicerol crudo	1.0	Cepillo de grafito	Tela de carbono con malla de acero inoxidable	50	41	24	35	-	102	(Chookaew <i>et al.</i> , 2014)
Efluente de FO - Glucosa	0.55	Tela de grafito	Papel carbono c/Pt	72	85	-	64	88	-	(Rivera <i>et al.</i> , 2015)
Efluente de FO – Vinazas	0.2	Fieltro de carbono	90 % Pt-10 % malla de iridio	27	40	70	101	400	1476	(Marone <i>et al.</i> , 2017)
Efluente de FO – Aguas residuales de la producción de jugo de fruta	0.2	Fieltro de carbono	90 % Pt-10 % malla de iridio	25	50	70	60	725	1397	(Marone <i>et al.</i> , 2017)
Efluente de FO – Residuos de comida (fermentación húmeda)	0.3	Fieltro de grafito	Espuma de níquel	973	59	70	95	387	933	Este estudio

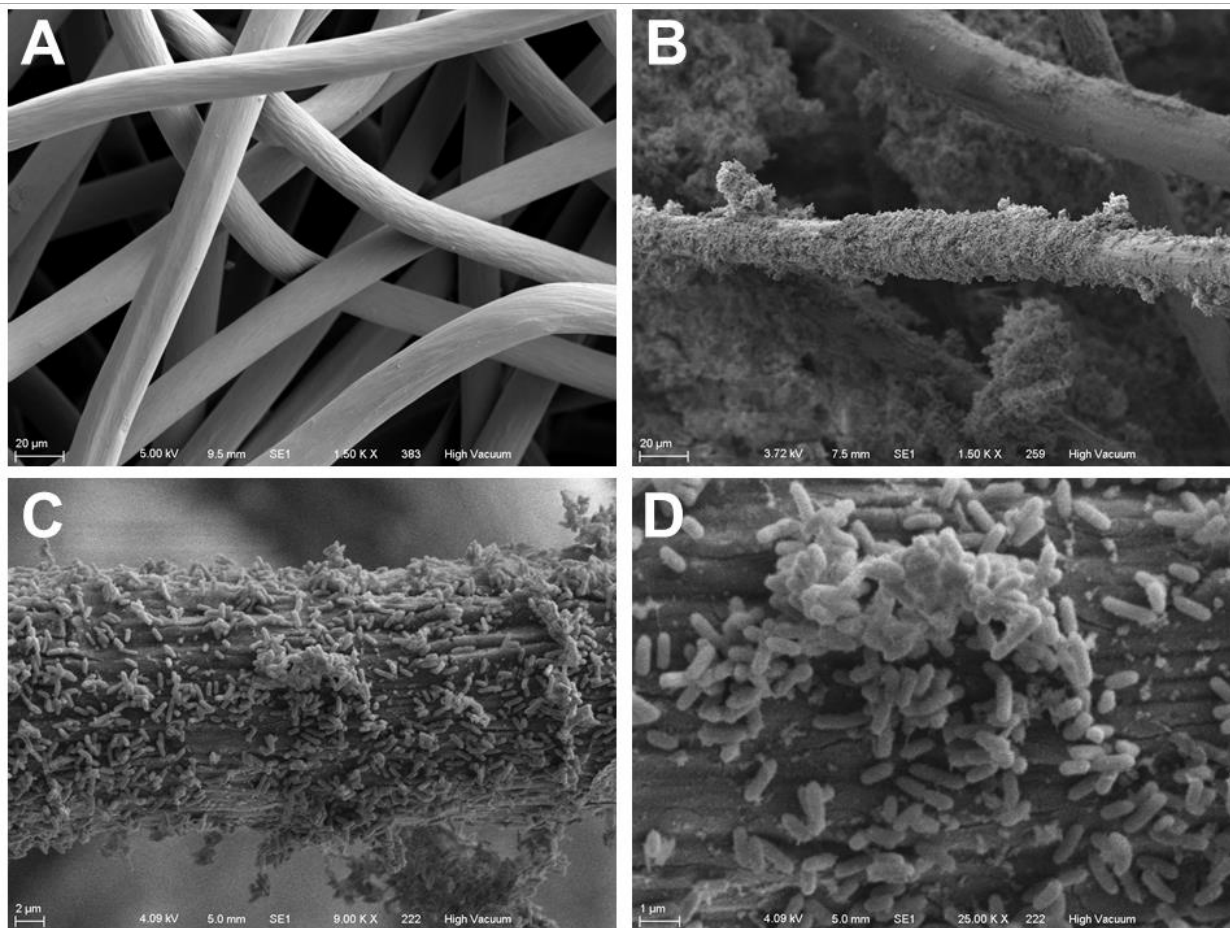


Figura 4.4. Micrografías SEM del crecimiento de la biopelícula sobre el fieltro de grafito. A) control, B-D) biopelícula electroactiva sobre el ánodo observado después de más de 80 días de operación de la CEM. Las barras de escala se indican en la parte inferior izquierda para todas las imágenes (A-B: 20 μm , C: 2 μm , D: 1 μm).

Al final de los experimentos, se realizó la pirosecuenciación en muestras que se tomaron de diferentes secciones de los ánodos de las dos CEM. El análisis revela una baja diversidad microbiana, con un claro predominio de *Geobacter* spp. (92%) (Fig. 6). Es importante tener en cuenta que, para este estudio, sólo se encuentra reportada *Geobacter* spp. como responsables de la conversión del sustrato en electricidad, como ya se informó en la literatura (Call, Wagner, *et al.*, 2009; Commault *et al.*, 2013; Katuri *et al.*, 2012; Lovley *et al.*, 2011). *Geobacter* spp. se especializa en el desarrollo de contactos eléctricos con aceptores de electrones extracelulares y otros organismos y se sabe que son los microorganismos que producen las mayores densidades de corriente en las celdas de combustible microbianas. Dado que el ánodo del sistema bioelectroquímico no es un aceptor de electrones natural, se supuso que es difícil aplicar una presión selectiva significativa sobre las especies de *Geobacter* (Lovley, 2006). Sin embargo, en este estudio, la presión de selección se aplicó por condiciones no estériles y a partir de una fuente

de inóculo que no experimentó preselección. Además, se encontró que es factible cosechar electrones utilizando *Geobacter* sin eliminar el oxígeno del medio (Nevin *et al.*, 2011).

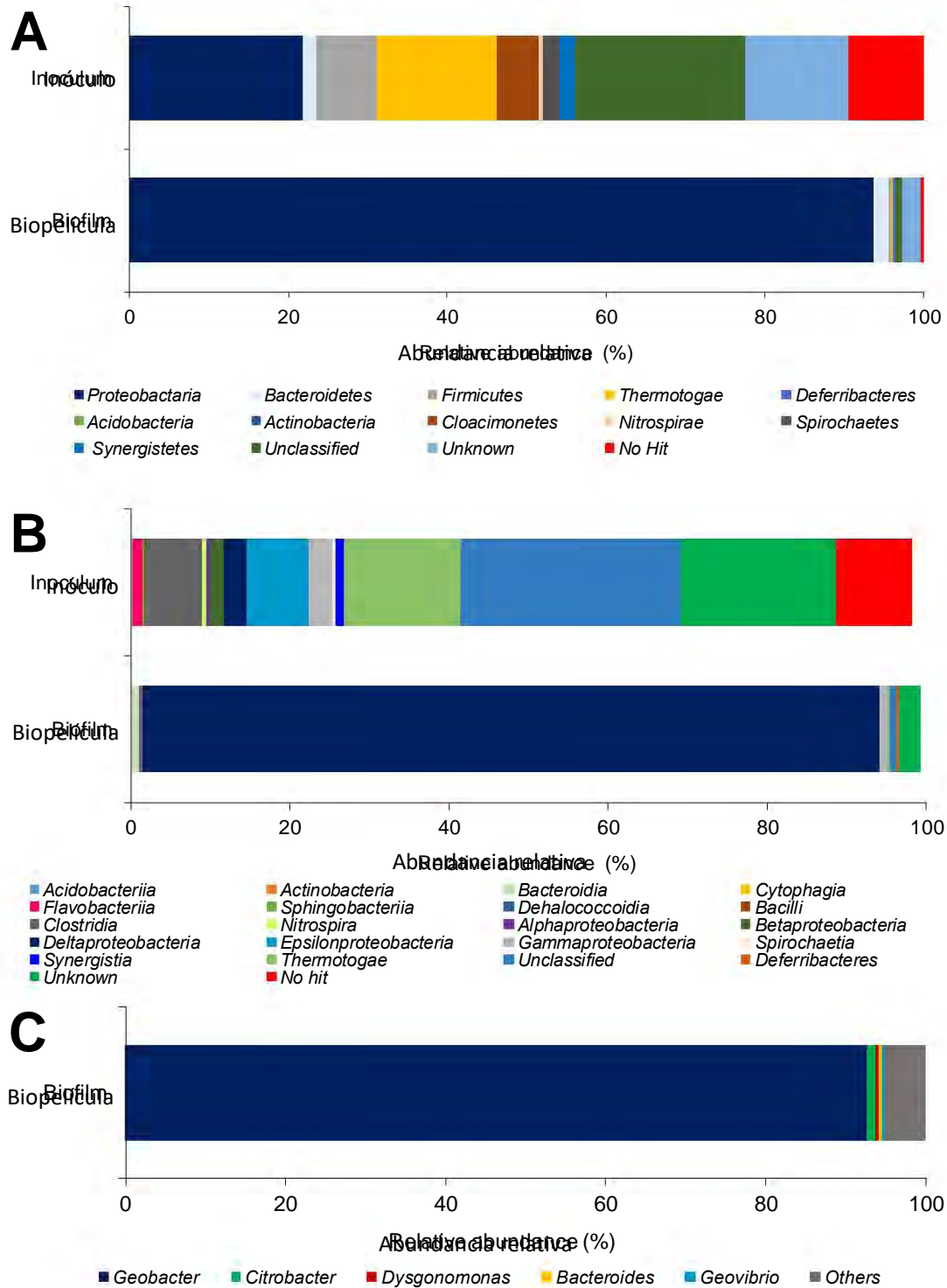


Figura 4.5. Abundancia relativa en las comunidades microbianas: inóculo vs biopelícula electroactiva en los niveles de clase (A) phylum (B) y en el nivel de género (C) solo para la biopelícula.

El 8% restante de las bacterias era demasiado diverso para resaltar la presencia de alguno de ellos (Enterobacteriales, Bacteroidales, Clostridiales y Thermotogales) (Fig. 4.5). Al analizar la familia Geobacteracea, se encontró que todas las especies de *Geobacter* pueden usar acetato como donador de electrones. Si bien la mayoría de estas especies asimilan el etanol directamente, algunas especies no (*G. lovleyi*, *G. sulfurreducens* y *G. thiogenes*). Aproximadamente la mitad de las especies de *Geobacter* que se han estudiado pueden usar butirato, valerato y lactato como donantes de electrones. El propionato, por otro lado, solo es asimilado por *G. bremensis*, *G. grbiciae*, *G. pelophilus* y *G. toluenoxydans* (Röling, 2014). *Citrobacter* spp. también puede contribuir a la producción y transferencia de electrones a partir de la oxidación del acetato, aunque de una manera ligeramente significativa ya que solo representa el 1% de la diversidad microbiana en la biopelícula (Xu y Liu, 2011). Este resultado resalta la importancia de las comunidades que representan el 7% restante de la biodiversidad en la biopelícula. Por ejemplo, *Dysgonomonas alginatilytica* puede consumir lactato para su crecimiento, y este microorganismo ha sido aislado de un sistema bioelectroquímico (Kita *et al.*, 2015). Además, *Bacteroides* spp. juegan un papel importante en la simplificación del lactato; se ha encontrado que *Bacteroides* JW20 produce acetato y propionato a partir de lactato (Schultz y Breznak, 1979), y *Bacteroides* sp. W7 se aisló de la fase suspendida en el ánodo de una CEM, lo que indica que puede utilizar lactato como fuente de carbono y la presencia de esta bacteria que reduce Fe (III) sugiere una posible contribución de organismos suspendidos a la eficiencia de las CEM (Wang, L. Liu, *et al.*, 2010).

Al comparar los resultados que se obtuvieron con el análisis de comunidad microbiana con los de otros estudios que han trabajado con efluentes acidogénicos como sustratos, se encontró que no hubo presiones de selección que permitieran una abundancia superior al 75% de algunas especies electroactivas. Usando efluentes del tratamiento de fermentación oscura de las aguas residuales de la producción de jugo de fruta, se encontró que *Geovibrio ferrireducens* representaba el 50% de la biopelícula electroactiva (Marone *et al.*, 2017). La diversidad microbiana es alta incluso cuando se usa un sustrato modelo (acetato), como en el caso de Carmona-Martínez *et al.* (Carmona-Martínez *et al.*, 2015). En ese caso, los investigadores alimentaron continuamente una CEM de dos cámaras durante 100 días y obtuvieron una biopelícula compuesta por cinco grupos bacterianos: 44 % de Proteobacteria, 32 % de Bacteroidetes, 18 % de Firmicutes, 5 % de espiroquetas y 1 % Actinobacteria. La diferencia en las comunidades microbianas podría ser la fuente del inóculo que

se utilizó (Ruiz *et al.*, 2014). Por lo tanto, el papel de E_{an} como factor de selección para obtener una alta abundancia de *Geobacter* spp. necesita ser estudiado.

4.4 CONCLUSIONES

Se evaluó el efecto de la disminución del potencial del ánodo en una CEM de dos cámaras que trata un efluente de fermentación oscuro. La estrategia de puesta en marcha en la que E_{an} disminuye después de la formación de la biopelícula electroactiva dio como resultado un aumento de la producción de hidrógeno. Se obtuvo una biopelícula electroactiva en 7 días mientras se usaba un E_{an} de 0.5 V. La tasa de producción de hidrógeno aumentó al 68% cuando se disminuyó el E_{an} . El efluente fermentado que contenía más acetato en su composición produjo más hidrógeno. *Geobacter* spp. fue el género bacteriano más abundantes en la biopelícula. La manipulación del E_{an} resultó ser una buena estrategia de arranque para la formación de una biopelícula electroactiva con una alta abundancia de microorganismos exoelectrogénicos mejorando el desempeño de la CEM para la producción de hidrógeno.

CAPÍTULO V

5. ROBUSTEZ DE BIOPELÍCULA ELECTROACTIVA PARA LA PRODUCCIÓN DE HIDRÓGENO EN CEMs: PERTURBACIONES DE CARGA ORGÁNICA INICIAL Y POTENCIAL ANÓDICO

5.1 INTRODUCCIÓN

La producción de hidrógeno a partir de CEM despierta especial interés por la posibilidad de obtener hidrógeno a partir de los productos finales de la fermentación oscura (Liu *et al.*, 2005; Logan *et al.*, 2008). Dos factores que resultan relevantes al momento de operar una CEM para la producción de hidrógeno son el potencial anódico (E_{an}) y el sustrato debido a la influencia que tienen sobre el desempeño del sistema especialmente en lo que refiere a la biopelícula electroactiva. Se ha confirmado que el cambio en los potenciales aplicados y E_{an} ha conducido a una diversificación de la población microbiana, debido a que la energía requerida por los microorganismos (obtenida por transferencia de electrones del donador de electrones al receptor) se ve afectada por la energía termodinámica del donador y receptor de electrones y la eficiencia de la cadena de transporte de electrones (Aelterman *et al.*, 2008; Holladay *et al.*, 2009; Kumar *et al.*, 2013; Torres *et al.*, 2009). También, se ha visto que potenciales más positivos (0.1 V vs SCE) resultan más favorecedores que potenciales negativos (-0.2 y -0.4 V vs SCE) para obtener biopelículas con mayor electroactividad (Cercado *et al.*, 2013b). Por lo anterior, el E_{an} tiene un efecto significativo sobre el crecimiento y distribución de las bacterias que respiran en el ánodo (Hasany *et al.*, 2016). Se ha demostrado que con una estrategia de puesta en marcha basada en la variación del E_{an} es posible acortar los tiempos de colonización (formación de biopelícula) permitiendo alcanzar un adecuado desempeño en 30 días y con la cual se ejerció una presión de selección sobre comunidad microbiana de la biopelícula de tal forma que *Geobacter* se encontró como el género predominante con una abundancia relativa mayor al 90 %. (Cardeña *et al.*, 2018). En el mismo sentido se ha observado que es posible maximizar la tasa de producción de hidrógeno controlando el voltaje aplicado, sin un consumo excesivo de energía al minimizar la resistencia externa de la CEM (Tartakovsky *et al.*, 2011). Sin embargo, no existe un consenso sobre potenciales optimizados, es decir, cada estudio reporta sus propios potenciales optimizados que puede ser debido al origen y naturaleza del inóculo tal y como lo ha reportado Ruiz *et al.*, (2014). Por lo anterior, resulta importante conocer la robustez de la

biopelícula a las variaciones del E_{an} durante la operación de un sistema bioelectroquímico, de lo cual no hay reportes hasta el momento.

El sustrato es una variable muy importante que impacta en el desempeño de la CEM y puede tener un rol determinante en la forma en la que se desenvuelve el sistema (Kumar *et al.*, 2017). Los sustratos según sus características (fuente y complejidad) que se han reportado en CEM han influido significativamente en el crecimiento de la biopelícula sobre la superficie del ánodo, la composición de la comunidad microbiana y el desempeño de los reactores (Kadier *et al.*, 2014). Se ha observado que los ácidos grasos volátiles de cadena corta son fácilmente asimilables por los microorganismos exoelectrogénicos, especialmente el acetato es un excelente donador de electrones (Yang *et al.*, 2015). Respecto a las concentraciones de sustrato en CEM se ha visto que concentraciones más bajas de sustrato (<1.2 g acetato/L) junto con potenciales anódicos superiores (-250 mV vs Ag/AgCl) pueden potenciar la actividad de la biopelícula anódica, haciéndolos más competitivos respecto a microorganismos metanogénicos (Sleutels *et al.*, 2011). También se ha sugerido que la carga de sustrato (glicerol) se puede aumentar gradualmente (de 0.3 a 5.3 g/L_{ánodo}/d) durante la puesta en marcha para evitar una inhibición por exceso de sustrato logrando un bioánodo eficiente después de 18-20 días (Escapa *et al.*, 2009). Aunque, al analizar los resultados se encontró que el mejor rendimiento de hidrógeno se obtuvo con una carga de 0.7 g/L_{ánodo}/d (5.39 ± 0.90 mol_{H₂}/mol_g) y la mejor tasa de producción de hidrógeno se alcanzó a 2.7 g/L_{ánodo}/d (0.62 ± 0.04 L_{H₂}/L_{ánodo}/d). Lo anterior concuerda con otros estudios que han informado que las altas concentraciones de sustrato tienen un efecto inhibitorio y no favorecen la producción de hidrógeno y disminuyen la eficiencia energética en las CEM (Li *et al.*, 2014; Rivera *et al.*, 2015; Yossan *et al.*, 2013). El efluente acidogénico proveniente de la fermentación oscura tiene un alto potencial para ser utilizado en CEM dado que el proceso de fermentación oscura forma como subproductos metabolitos solubles principalmente ácidos grasos volátiles (Kadier *et al.*, 2016; Lu and Ren, 2016; Venkata Mohan *et al.*, 2016, 2014). Sin embargo, la composición y concentración del efluente acidogénico dependerá del sustrato alimentado, condiciones de operación y configuración de reactor utilizada entre otros (Diaz *et al.*, 2018; Marone *et al.*, 2017; Turon *et al.*, 2016). Por lo tanto, al pensar en acoplar ambos procesos se tiene el inconveniente que el efluente proveniente de la fermentación oscura no tendrá una concentración de salida regular y éste deberá ser alimentado a la CEM. A excepción de Ruiz *et al.*, (2014), no se han realizado investigaciones sobre el efecto de la concentración del sustrato, su composición y el uso de sustratos más complejos sobre la diversidad de la comunidad microbiana que forma la biopelícula anódica. Resulta importante

obtener información de la estabilidad y robustez de la biopelícula electroactiva al someterse a variaciones de sustrato durante la operación de la CEM para la producción de hidrógeno.

La presente investigación tuvo por objetivo evaluar el efecto de variaciones (perturbaciones) operacionales (E_{an} y la DQO inicial) sobre el desempeño de la CEM de dos cámaras para la producción de hidrógeno utilizando una mezcla de AGV (efluente sintético de la fermentación oscura). El estudio se enfoca principalmente en la evaluación de la robustez de la biopelícula electroactiva a estos cambios y su efecto sobre la biomasa adherida al ánodo, así como su diversidad microbiana al final de la operación.

5.2 MATERIALES Y MÉTODOS

Para el desarrollo experimental se utilizó la CEM de bordes redondeados (Fig. 3.4 y 5.1A) descrita en la sección 3.2 del Capítulo III.

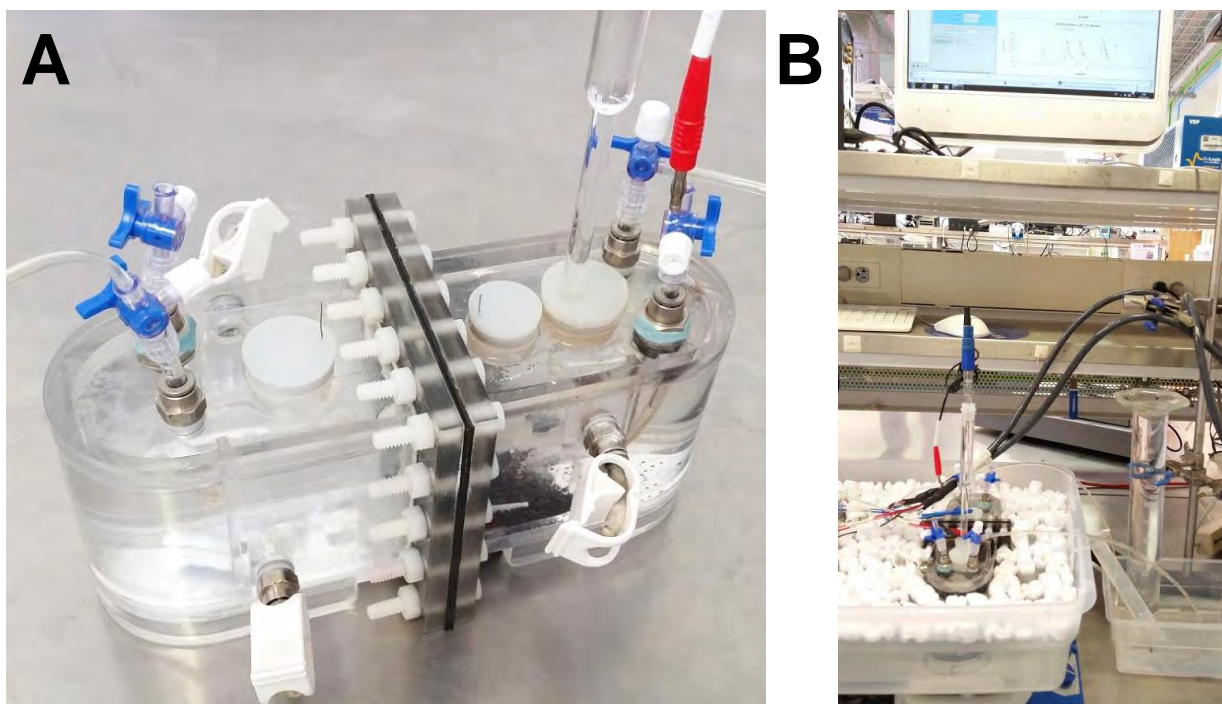


Figura 5.1. A) CEM de bordes redondeados utilizadas para evaluar la robustez de la biopelícula electroactiva. B) Arreglo experimental utilizado para todas las pruebas realizadas.

Para todas las pruebas experimentales se utilizó solución buffer de fosfatos 50 mM como catolito reemplazándolo al final de cada ciclo de operación. Para evaluar la variación de la concentración inicial de sustrato se utilizó un efluente acidogénico sintético con la siguiente composición: 57% butirato, 30 % acetato y 13 % propionato y se utilizó un E_{an} fijo de 0.3 V. Las concentraciones

respecto a DQO fueron de 0.5 a 2.0 g DQO/L y en la Tabla 5.1 se muestra el diseño utilizado el cual fue de tipo aleatorio estableciendo 1.0 g DQO/L como la concentración de referencia. La condición operacional 1 fue la utilizada para la formación de la biopelícula electroactiva sobre la superficie del ánodo utilizando la metodología descrita en la sección 3.4. Para determinar el efecto de cada una de las condiciones a evaluar se realizaron un mínimo de 7 ciclos operacionales asegurando la reproducibilidad de los experimentos y la certeza de los resultados. Los experimentos se llevaron a cabo de manera continua hasta probar las 5 condiciones operacionales en la misma CEM.

Tabla 5.1. Concentraciones de sustrato evaluadas en CEM.

Condición	DQO _{inicial} (g/L)	E_{an} (V)	No. de ciclos
1	1.0	0.3	7
2	0.5	0.3	7
3	1.0	0.3	8
4	2.0	0.3	7
5	1.0	0.3	7

Para evaluar el efecto del E_{an} sobre la robustez de la biopelícula electroactiva se aplicaron tres diferentes potenciales 0.5, 0.3 y 0.2 V con el apoyo de un potenciostato/galvanostato VSP/Z-01 (BioLogic Science Instruments, France). La Tabla 5.2 muestra el diseño experimental utilizado de carácter aleatorio, la concentración de sustrato se mantuvo fija en 1.0 g-DQO/L para estas pruebas y la estrategia para la formación de la biopelícula o colonización se describió en la sección 3.4 utilizando la condición 1 (Tabla 5.2) como variables de arranque. Al igual que el bloque experimental anterior se operó un mínimo de 7 ciclos por condición y las pruebas se ejecutaron de manera continua para evaluar las 5 condiciones en un solo experimento.

Tabla 5.2. Potenciales anódicos (E_{an}) evaluados en CEM.

Condición	DQO _{inicial} (g/L)	E_{an} (V)	No. de ciclos
1	1.0	0.5	7
2	1.0	0.3	7
3	1.0	0.5	8
4	1.0	0.2	7
5	1.0	0.2	7

Cada bloque experimental (DQO_i y E_{an}) se realizó por duplicado y uno de los reactores se utilizó para obtener muestras de biomasa y poder determinar la cantidad de biopelícula que se formaba

sobre el ánodo. Al finalizar la evaluación de una condición operativa se tomaba una muestra del ánodo (fieltro de grafito 5x5 mm) al cual se le realizó el análisis de proteínas por Lowry (sección 3.5.3) y la medición se correlacionó con los SV.

Al terminar la experimentación se tomaron muestras de biomasa de la biopelícula sobre el ánodo para llevar a cabo la caracterización de la comunidad microbiana como lo indica la sección 3.5.4.

5.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.3.1 Efecto de la variación de DQO inicial sobre la producción de H_2 en CEM

La formación de la biopelícula electroactiva se hizo a un $E_{an}=0.3$ V y una concentración inicial de sustrato de 1.0 g DQO/L con la presencia de lodo granular anaerobio como (20 g/L). La actividad electrogénica empezó a observarse a partir del día 3 (Fig. 5.2). El periodo de formación de biopelícula duro aproximadamente 18 días con ciclos de operación de aproximadamente 48 h; los últimos 3 ciclos de operación del período de colonización presentaron j_v similares resultando en una biopelícula electroactiva madura (Carmona-Martínez *et al.*, 2015). Al concluir este tiempo el inóculo fue retirado. A partir del día 18 se iniciaron las pruebas para evaluar la robustez de la biopelícula electroactiva manteniendo la concentración de sustrato inicial (DQO_i) en 1.0 g DQO/L, al remover el inóculo se redujo el tiempo de reacción a 24 h. El desempeño de la CEM se representa con los valores promedio obtenidos al finalizar la evaluación de una condición (se consideran todos los ciclos operados bajo cada condición).

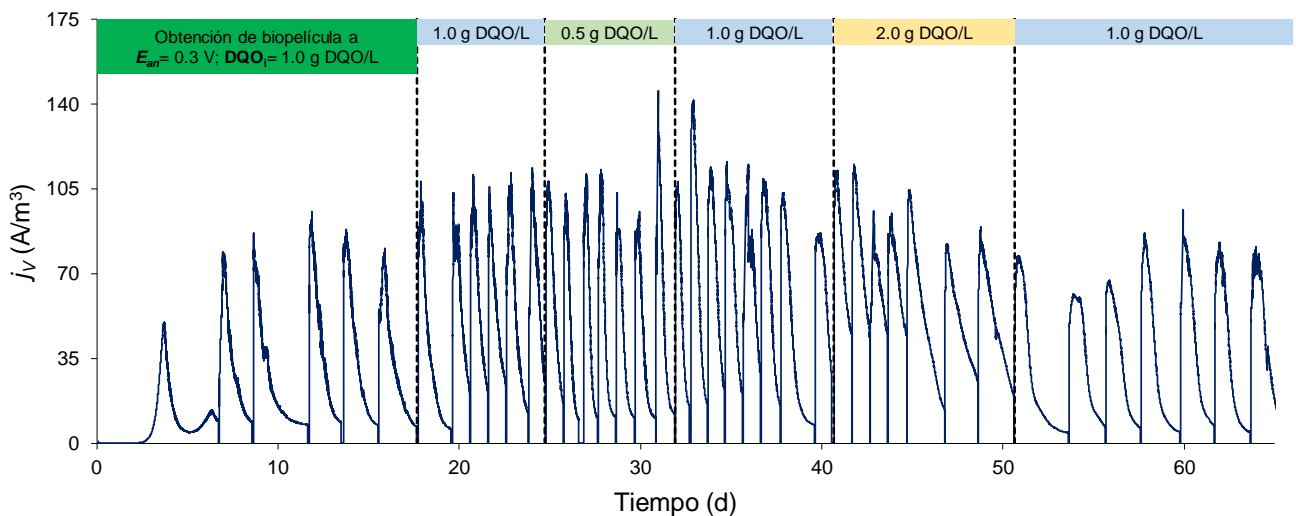


Figura 5.2. Cronoamperometría obtenida durante la operación de una CEM con variación de la DQO_i .

En la Figura 5.2 se presenta la cronoamperometría que se obtuvo de la operación de la CEM al variar la concentración inicial de sustrato; se realizaron 7 ciclos en promedio para la evaluación de cada una de las condiciones. Se observó un aumento de los tiempos de reacción al pasar de 24 a 48h cuando la DQO_i se modificó de 1.0 a 2.0 g DQO/L.

En la figura 5.3, se presentan las j_v y tasas de producción de hidrógeno obtenidas durante la operación de la CEM a diferentes pulsos de concentración inicial de DQO. Ambos parámetros tienen una dependencia directa, es decir, la cantidad de hidrógeno generado dependerá de la intensidad de corriente generada. La j_v es el resultado de los electrones generados en el ánodo y los electrones cosechados en el ánodo viajarán al cátodo para llevar a cabo la reacción de reducción y generación de hidrógeno ($2H_2O + 2e^- \rightarrow 2OH^- + H_2$) (Rozendal *et al.*, 2007). La j_v y Q obtenidas (Fig. 5.3) poseen la misma tendencia denotando que los electrones cosechados en el ánodo están siendo aprovechados de manera proporcional en el cátodo, con lo que se descartaron pérdidas de hidrógeno en la cámara catódica. La relación entre estos dos parámetros de respuesta es tan estrecha que se propone obtener las tasas de producción de hidrógeno a partir de la densidad de corriente generada en las CEM (Logan *et al.*, 2008; Buitrón *et al.*, 2018). El desempeño del reactor respecto a Q y j_v se ve disminuido al aumentar la concentración de DQO de 1.0 a 2.0 g/L después del día 40 de operación y a pesar de que después del día 48 se regresó a la concentración de arranque (1.0 g DQO/L) no se observó una recuperación significativa.

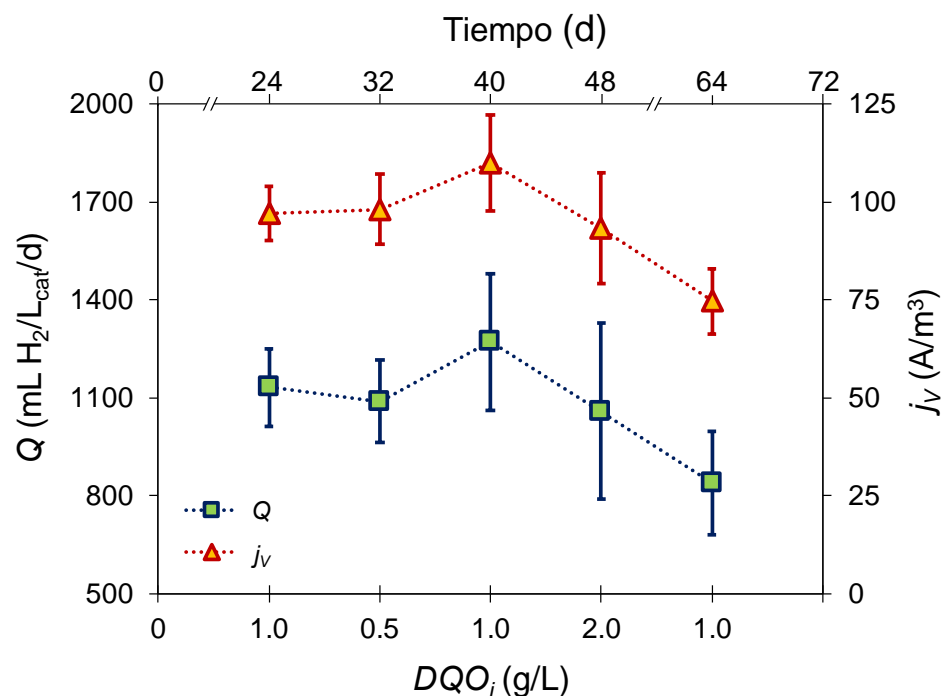
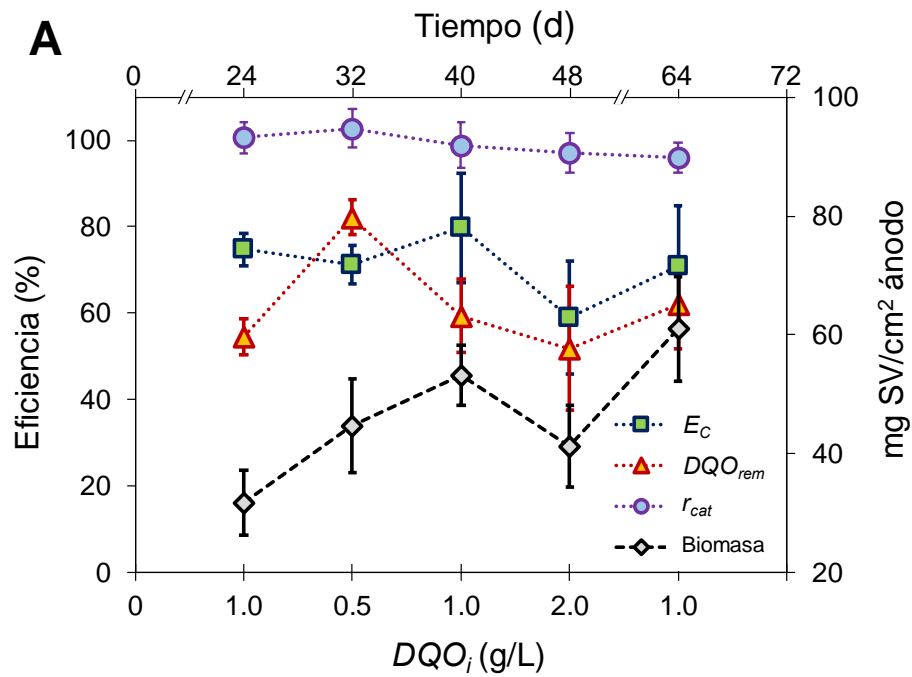


Figura 5.3. Tasas de producción de hidrógeno (Q) y densidades de corriente (j_v) obtenidas durante la evaluación de la DQO_i en CEM

El desempeño de la CEM se puede apreciar en la Figura 5.4 y la Tabla 5.3. A los gráficos se agregaron los datos de la cantidad de biomasa de la biopelícula adherida al ánodo para poder apreciar las posibles relaciones con los parámetros de respuesta medidos. Es importante mencionar que no toda la biomasa sobre la superficie del ánodo pertenece a microorganismos exoelectrogénicos.



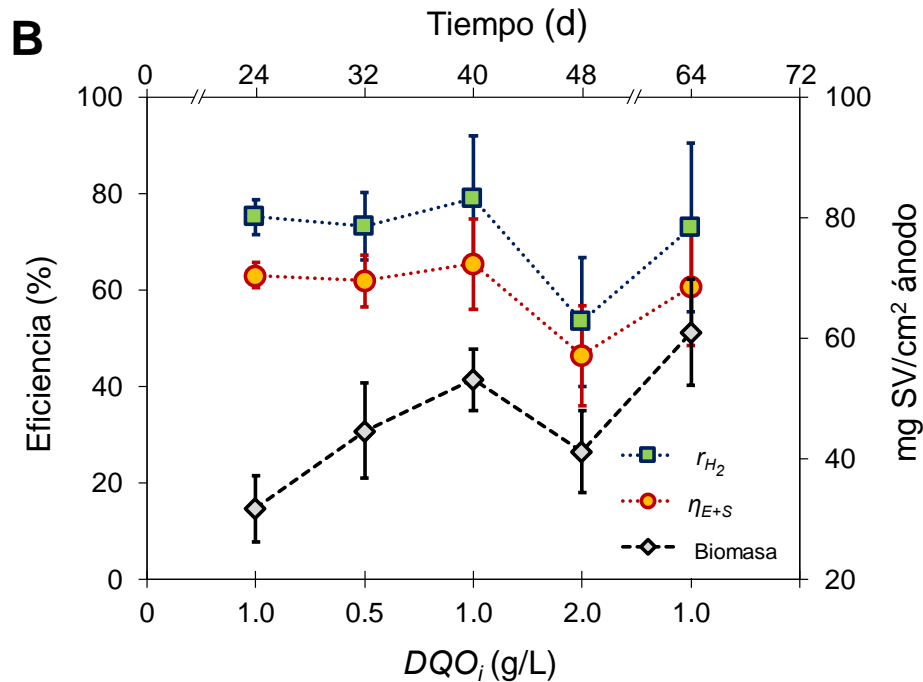


Figura 5.4. Relación entre la biomasa adherida al ánodo y parámetros de respuesta al variar la DQO_i : A) eficiencia coulombica, DQO removida y recuperación de H_2 en el cátodo, B) recuperación total de H_2 , eficiencia energética total.

El análisis de varianza indica que la variación de la concentración inicial de DQO sobre la CEM tiene un efecto significativo para el volumen de hidrógeno obtenido, la DQO removida, la E_C , r_{H_2} , el rendimiento de hidrógeno (Y_{H_2}) y η_{E+S} . Sin embargo, el ANOVA respecto a la biomasa adherida al ánodo arroja un efecto significativo sobre la mayoría de los parámetros de respuesta a excepción de la r_{cat} y la eficiencia eléctrica. En la Figura 5.4A se corroborará lo arrojado por el análisis de varianza, la biopelícula del ánodo genera una influencia sobre la E_C y la DQO removida pero no afecta la recuperación de hidrógeno en el cátodo. Pero la similitud en el comportamiento de la biopelícula es mayor a la recuperación de hidrógeno total y a la eficiencia energética global (Figura 5.4B). La recuperación de hidrógeno en el cátodo se mantuvo estable durante toda la operación del reactor ($99 \pm 4\%$), indicando una excelente conversión de electrones a hidrógeno y mostrando que esta conversión es independiente a la variación de sustrato y cantidad de biopelícula sobre el ánodo (Buitrón *et al.*, 2018).

Por otro lado, en la Tabla 5.3 se observa el volumen de H_2 producido a pesar de que las últimas dos condiciones evaluadas presentan altos volúmenes, esto también es resultado de que los tiempos de reacción aumentaron de 24 a 48 h. La j_A se ve influenciada por la cantidad de biomasa en el ánodo (Cercado *et al.*, 2013a), pero no por la variación de la concentración de sustrato alimentada.

El Y_{H_2} que se obtuvo fue alto ($>70\%$), a excepción de cuando se alimentó con 2 g DQO/L en donde el rendimiento de hidrógeno fue del $53 \pm 13\%$ (Y_{H_2} máximo: 1419 ml de H_2 /g DQO) (Logan *et al.*, 2008).

Tabla 5.3. Desempeño de la CEM obtenido de la variación de la concentración inicial de sustrato.

Tiempo (d)	DQO_i	Biomasa sobre el ánodo (mg SV/cm ²)	Volumen (mL H ₂)	j_A (A/m ²)	Y_{H_2} (mL H ₂ /g DQO)	η_E (%)	ΔpH^*
24 ^a	1.0	32 ± 5	229 ± 14	43 ± 3	1052 ± 51	412 ± 14	6.1 ± 0.1
32 ^a	0.5	45 ± 8	178 ± 13	43 ± 4	1026 ± 97	421 ± 18	5.3 ± 0.2
40 ^a	1.0	53 ± 5	256 ± 15	48 ± 5	1104 ± 183	405 ± 21	5.9 ± 0.3
48 ^b	2.0	41 ± 7	320 ± 60	41 ± 6	747 ± 188	398 ± 19	6.2 ± 0.4
64 ^b	1.0	61 ± 9	271 ± 26	33 ± 4	1021 ± 244	393 ± 14	5.9 ± 0.2

Duración de ciclos: ^a 24 h, ^b 48 h.

* ΔpH = pH final del catolito – pH final del anolito

El mejor desempeño de la CEM se observó durante el día 32 y 40 cuando la DQO_i fue de 1.0 g/L presentando 53 ± 5 mg SV/cm² de ánodo. La j_v y Q fueron de 110 ± 5 A/m³ y 1271 ± 210 mL H₂/L_{cat}/d, respectivamente; mientras que se obtuvieron $80 \pm 13\%$ de E_C , $79 \pm 13\%$ de r_{H_2} , $65 \pm 9\%$ de η_{E+S} . El rendimiento de hidrógeno fue de 1104 ± 183 mL H₂/g DQO un $78 \pm 13\%$ del óptimo. Estos resultados son interesantes ya que se pudieron deber a una buena aclimatación de la biopelícula electroactiva y la posibilidad de que se generará un rango de tolerancia de 0.5 g DQO/L respecto a la concentración de sustrato de puesta en marcha (1.0 g DQO/L).

La pureza del hidrógeno obtenida en la cámara catódica fue del 100% durante la operación de las CEM con variación de la concentración inicial de sustrato. La diferencia de pH entre la cámara anódica y catódica (ΔpH) fue medida al final de cada ciclo de operación (Tabla 5.3) y osciló entre 5.3 y 6.2. Rivera *et al.*, (2015) informan que a concentraciones de 0.4 g DQO/L se observó un ΔpH = 0.6, mientras que a 1.2 g DQO/L el ΔpH fue de 0.82, concluyendo que a una mayor concentración de sustrato se genera una mayor pérdida energética como resultado del gradiente de pH. En este estudio dicho fenómeno fue mayor, el gradiente más alto fue de ΔpH = 6.2 ± 0.4 al utilizar 2.0 g de DQO/L y el más bajo fue con 0.5 g de DQO/L (ΔpH = 5.3 ± 0.2). Aunque las tasas de producción de hidrógeno son mayores en el presente estudio.

En la Fig. 5.5, se presenta una relación entre la concentración de sustrato alimentado y el sustrato consumido y la cual se observó durante la experimentación. La relación existente permite suponer

que no es posible consumir el 100 % del sustrato (bajo las condiciones de trabajo propuestas en la presente investigación) y el consumo será proporcional a la DQO alimentada. Este aspecto tiene que ser investigado más a detalle para conocer el origen de este fenómeno y si es posible revertirlo modificando y/o controlando alguna de las condiciones de operación de la CEM.

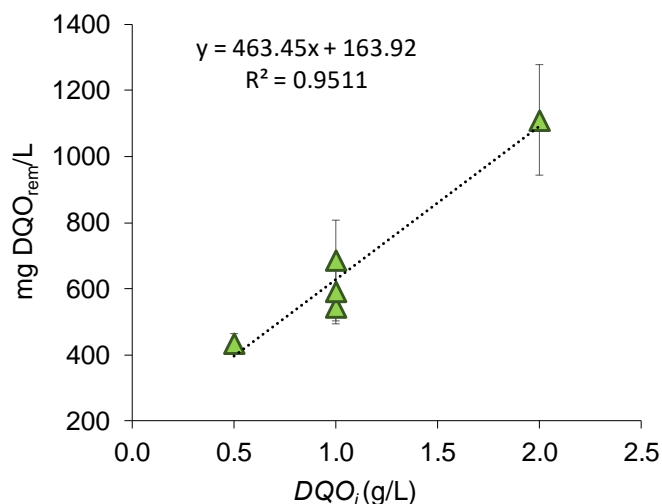


Figura 5.5. Relación entre la materia orgánica alimentada y removida (medida como DQO).

5.3.2 Efecto de aplicar perturbaciones de E_{an} sobre la producción de H_2 en CEM

Para obtener la biopelícula electroactiva sobre la superficie del ánodo se utilizaron como condiciones de arranque un $E_{an} = 0.5$ V y DQO_i de 1.0 g DQO/L agregando la fuente de inóculo (20 g/L) en la cámara anódica. La biopelícula empezó a presentar electroactividad después del día 3 (Fig. 5.6). Al igual que en bloque experimental anterior el periodo de formación de biopelícula tuvo una duración de aproximadamente 18 días con ciclos de operación de aproximadamente 48 h. Para determinar la formación de la biopelícula con microorganismos exoelectrogénicos sobre la superficie del ánodo se esperó la presencia de curvas de densidad de corriente similares (3) y posteriormente se retiró la fuente de inóculo (Carmona-Martínez *et al.*, 2015).

Posterior al periodo de formación de biopelícula (día 18) se empezaron a correr los experimentos variando el E_{an} y manteniendo fija la concentración de sustrato inicial (1.0 g DQO/L). A partir del día 18 se iniciaron las pruebas para evaluar la robustez de la biopelícula electroactiva manteniendo la concentración de sustrato inicial (DQO_i) en 1.0 g DQO/L, al remover el inóculo, se redujó el tiempo de reacción a 24 h. De la cronoamperometría se puede apreciar que la CEM funciona de manera regular hasta el día 37, posteriormente se presentó un aumento en los tiempos de reacción

(de 24 a 48 h). También se aprecia una disminución en las densidades de corriente. Al terminar de evaluar la cuarta condición (días 41-51) no se observa una recuperación en el desempeño de la CEM. Por esta razón, la condición 4 fue prolongada hasta el final de la operación de los reactores (día 67).

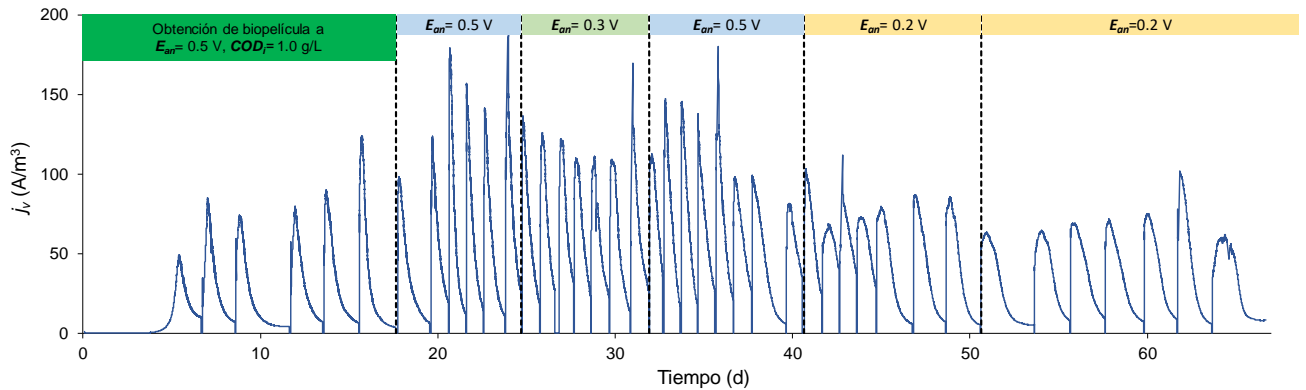


Figura 5.6. Cronoamperometría obtenida durante la operación de una CEM con variación del E_{an} .

En la Figura 5.7 se puede apreciar mejor el efecto del E_{an} sobre la tasa de producción de hidrógeno y la densidad de corriente generada. Aunque la tendencia es la misma para ambos parámetros la disminución a partir del primer cambio de E_{an} no se revierte pasando de 1417 ± 188 ($E_{an}= 0.5$ V) a 745 ± 125 ($E_{an}= 0.2$ V) mL $H_2/L_{cat}/d$. Mientras que la j_v disminuye de 138 ± 188 ($E_{an}= 0.5$ V) a 71 ± 13 ($E_{an}= 0.2$ V). El análisis de pureza del gas producido en la cámara catódica únicamente presentó hidrógeno como componente. El análisis de varianza determina un efecto significativo del E_{an} y la biomasa en la biopelícula sobre la tasa de producción de hidrógeno y la j_v .

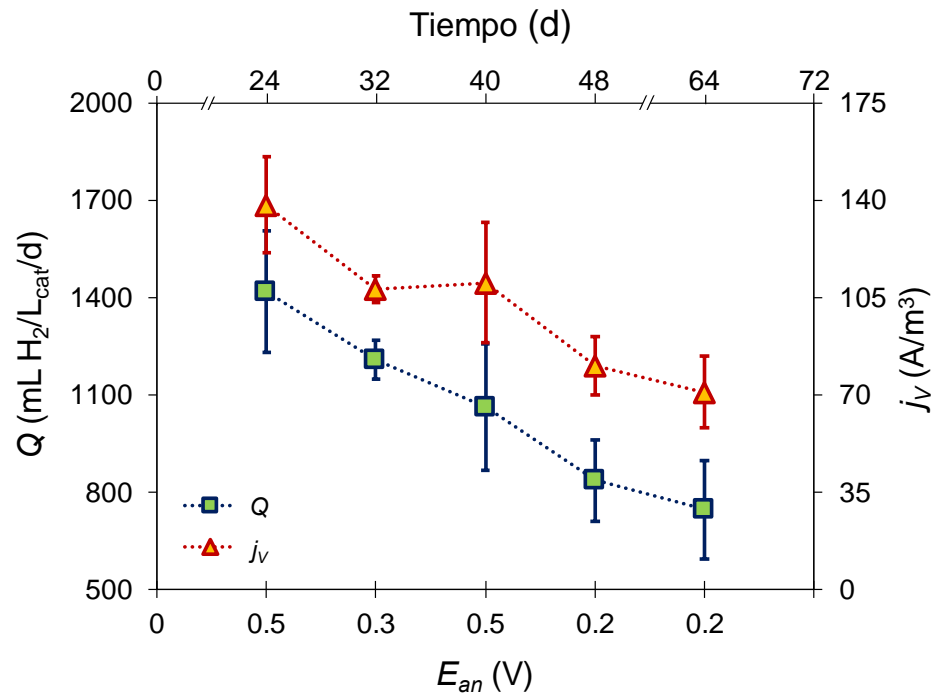


Figura 5.7. Tasas de producción de hidrógeno (Q) y densidades de corriente (j_v) obtenidas durante la evaluación del E_{an} en CEM.

La Figura 5.8 presenta resultados de desempeño de la CEM con una comparativa de la cantidad de biomasa que se encontraba adherida a la biopelícula sobre el ánodo. El ANOVA arrojó que el variar el E_{an} tuvo un efecto significativo sobre la DQO removida, la η_E y sobre la biopelícula anódica. La cantidad de microorganismos en la biopelícula tuvo un efecto significativo en los mismos parámetros de respuesta. El volumen de hidrógeno obtenido se ve afectado por la cantidad de microorganismos en la biopelícula, pero no por la variación del E_{an} (Tabla 5.4). La E_C y la r_{cat} no se ven afectadas significativamente por las variables operacionales (E_{an} y biomasa) tal y como se observa en la Fig. 5.8A. El crecimiento de la biopelícula adherida al ánodo no mostró un aumento en el desempeño de la CEM lo que muy seguramente es resultado de la diversidad microbiana y de una baja actividad de los microorganismos exoelectrogénicos ya que a pesar de observar una tendencia al aumento de remoción de materia orgánica no se tradujo en una mayor captación de electrones. Ya se ha observado la variación de la comunidad microbiana en la biopelícula adherida al ánodo respecto al potencial anódico y se encontró un predominio de microorganismos exoelectrogénicos a bajos E_{an} (-0.349 y -0.289 V vs Ag/AgCl) y con un potencial de 0.171 V vs Ag/AgCl se encontró una mayor diversidad microbiana (Torres *et al.*, 2009).

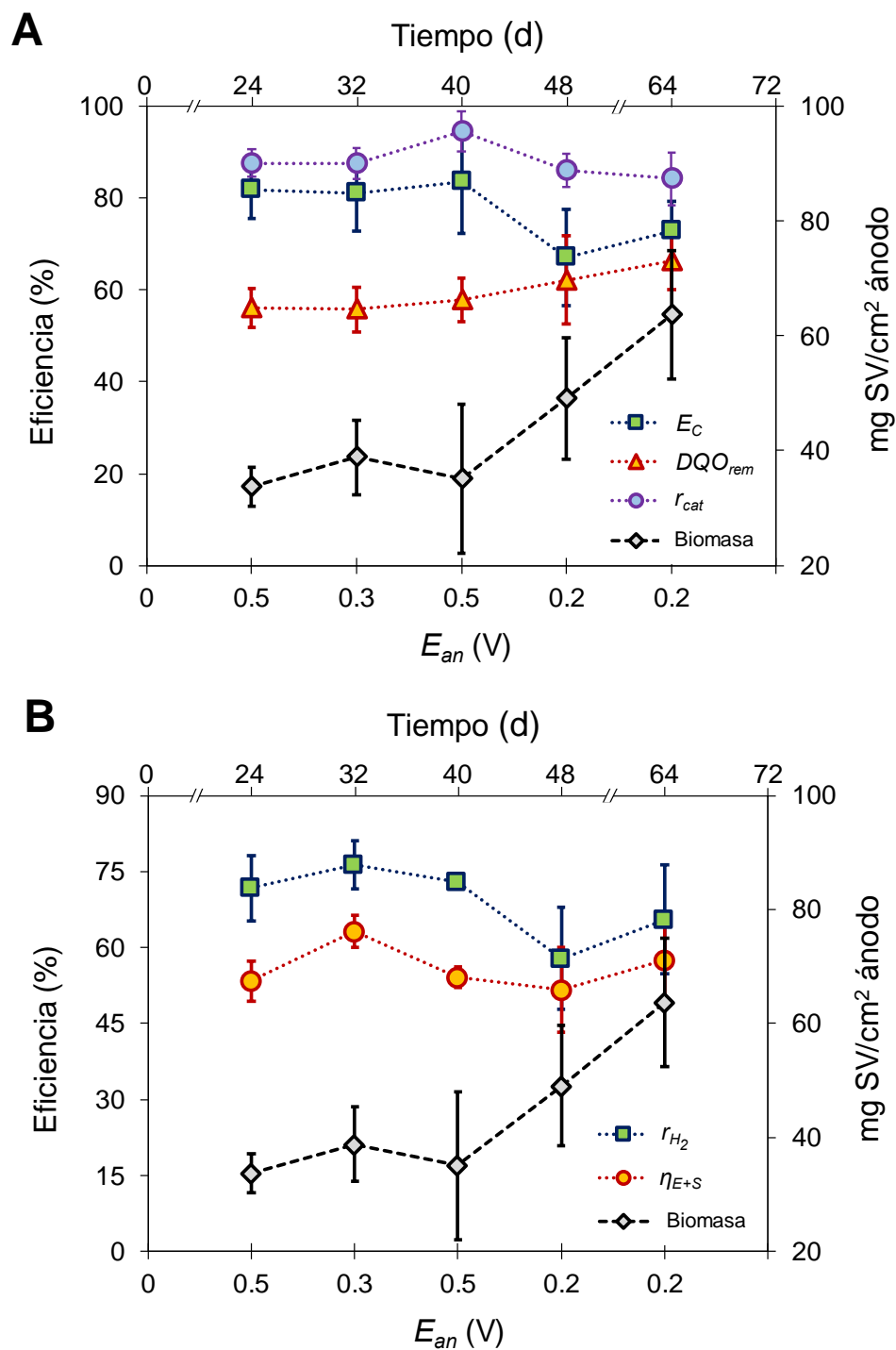


Figura 5.8. Relación entre la biomasa adherida al ánodo y parámetros de respuesta al variar el E_{an} : A) eficiencia coulombica, DQO removida y recuperación de H_2 en el cátodo, B) recuperación total de H_2 , eficiencia energética global.

Por otro lado, en la Fig. 5.8B se aprecia de manera clara que el E_{an} y la biopelícula no tienen un efecto significativo sobre la recuperación total de hidrógeno y la eficiencia energética global. Se puede identificar que los parámetros de respuesta relacionados con la transformación de sustrato a

electrones (cámara anódica: E_C) y aprovechamiento de los electrones a hidrógeno (cámara catódica: r_{cat}) se mantienen dentro de un rango de estabilidad (<10 % respecto a la desviación estándar). Es decir, que la disminución en el desempeño de la CEM es resultado del efecto que tiene la variación del E_{an} sobre la actividad de los microorganismos exoelectrónicos presentes en la biopelícula. Ya que a pesar de que los volúmenes de H₂ producido rondaron los 235 ± 28 mL H₂ (Tabla 5.4) durante la experimentación las tasas de producción disminuyeron conforme aumentaba el tiempo de operación (Fig. 5.7)

Tabla 5.4. Desempeño de la CEM obtenido de la variación del E_{an} .

Tiempo (d)	E_{an}	Biomasa sobre el ánodo (mg SV/cm ²)	Volumen (mL H ₂)	j_A (A/m ²)	Y_{H_2} (mL H ₂ /g DQO)	η_E (%)	ΔpH
24 ^a	0.5	34 ± 3	224 ± 14	61 ± 8	1004 ± 91	215 ± 8	6.1 ± 0.1
32 ^a	0.3	39 ± 6	225 ± 10	47 ± 2	1068 ± 65	387 ± 31	6.1 ± 0.2
40 ^a	0.5	35 ± 13	226 ± 23	48 ± 9	1022 ± 16	217 ± 25	5.6 ± 0.3
48 ^b	0.2	49 ± 11	223 ± 31	35 ± 5	810 ± 142	529 ± 22	5.7 ± 0.2
64 ^b	0.2	64 ± 11	264 ± 26	31 ± 6	917 ± 150	517 ± 35	5.7 ± 0.2

*Duración de ciclos: ^a 24 h, ^b 48 h.

Respecto al rendimiento de hidrógeno al variar el E_{an} hasta el día 40 de operación (3 condiciones evaluadas) se mantuvo en 1031 ± 33 mL H₂/g DQO. Sin embargo, al disminuir el potencial en la cuarta condición (0.2 V) se presenta una disminución significativa para posteriormente aumentar (día 64) sin alcanzar los desempeños iniciales. Las eficiencias coulombicas y remociones de DQO son del 82.1 ± 1.2 % y 56.5 ± 1.1 %, respectivamente, durante las primeras 3 condiciones evaluadas. Mientras que la E_C decae al 63.4 ± 7.4 % con la cuarta condición la remoción de DQO aumenta al 63.5 ± 7.8 % y aunque la cuarta y quinta condición utilizó el mismo E_{an} (0.2 V) al final de la operación de la CEM (día 67) lo que se obtienen son remociones de DQO del 68.6 ± 2.7 % pero E_C de apenas 72.8 ± 6.5 % que son 10 % inferiores a las obtenidas en los primeros 40 días de operación. Por tanto, la predominancia de microorganismos exoelectrónicos se ve desplazada por otras comunidades microbianas que no son capaces de brindar electrones al sistema.

5.3.3 Análisis de la comunidad microbiana que forma las biopelículas

La Figura 5.9A representa la diversidad microbiana que se presentó la biopelícula anódica al final de la operación de la CEM sometida a variaciones de la concentración inicial de sustrato y la Figura 5.9B muestra la comunidad bacteriana del ánodo que estuvo bajo los efectos de la variación del

E_{an} . En ambas biopelículas el género de mayor abundancia es *Geobacter sp* (A: 53.1 % y B: 46.2 %) que ha sido descrita ampliamente por su capacidad de realizar la transferencia extracelular de electrones (a otras especies microbianas o electrodos de grafito) a su vez son organismos versátiles. Son capaces de oxidar acetato, ácidos orgánicos y alcoholes (Röling, 2014). *Geobacter sp* es el género que más se ha encontrado en sistemas bioelectroquímicos utilizando cepas puras y cultivos mixtos su abundancia es resultado de su capacidad para oxidar un amplio rango de compuestos orgánicos (Lovley *et al.*, 2011, 1993).

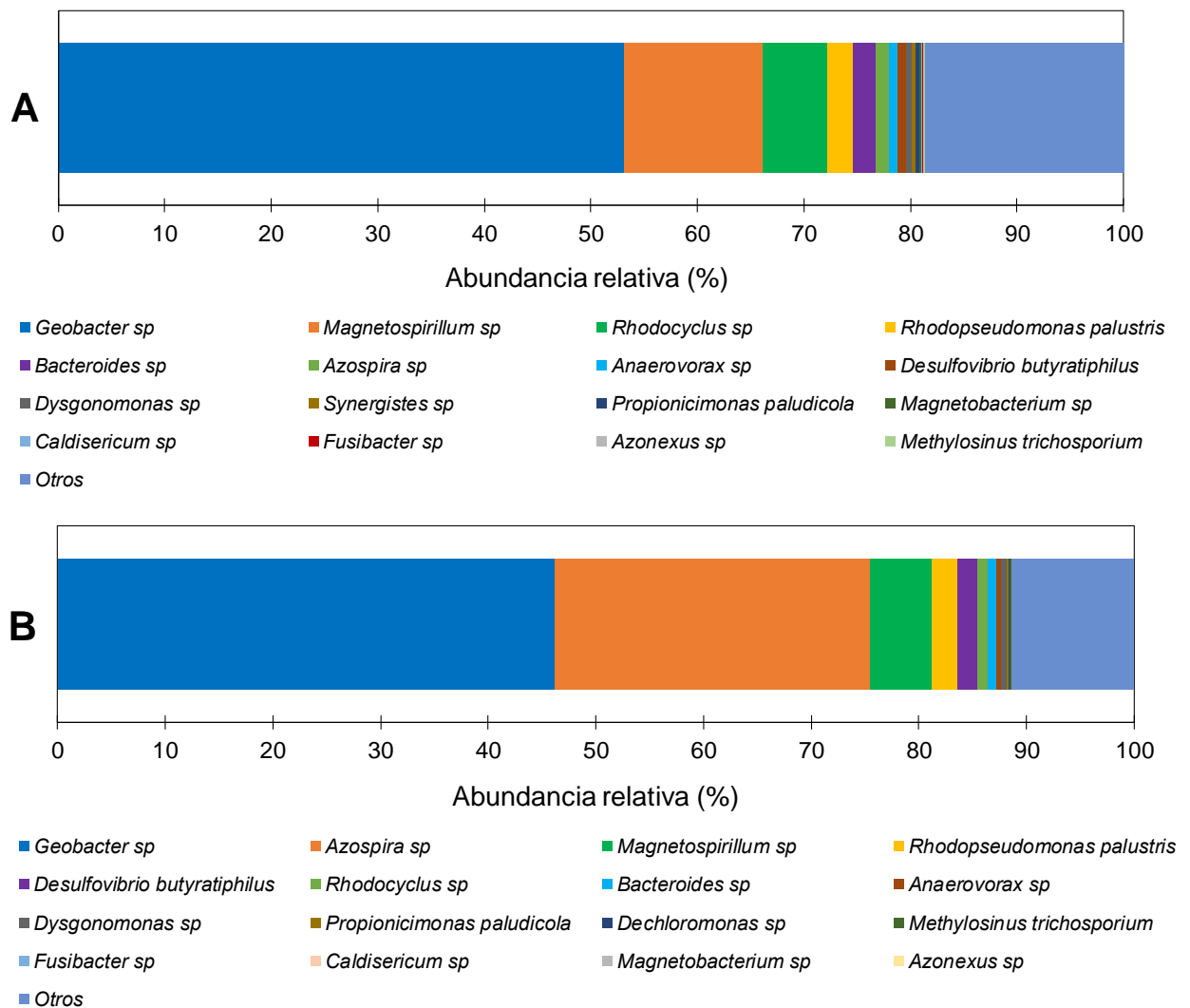


Figura 5.9 Abundancia relativa de los géneros microbianos presentes en las biopelículas al final de la operación de la CEM sometida a variaciones en: A) concentración inicial de sustrato y B) E_{an} .

Otro microorganismo que se encontró en ambas biopelículas es *Azospira sp*, aunque a la CEM que se le aplicó la variación del E_{an} presentó una abundancia del 29.2 % vs 1.3 % de la que enfrentó variación de la DQO_i . *Azospira sp* es un microorganismo que es capaz de crecer en una gran variedad de ácidos grasos entre ellos acetato y propionato a temperaturas mesofílicas (20-40 °C) y

pH neutro. Se ha observado que son capaces de almacenar polihidroxicarboxilatos como reserva energética. Son bacterias fijadoras de nitrógeno y se han encontrado en biopelículas electroactivas en celdas de combustible microbianas, sin embargo, no se conoce el rendimiento individual de este microorganismo (Baranitharan *et al.*, 2015; Borole *et al.*, 2009; Oren, 2014; Xiao *et al.*, 2015). Otro organismo que se encuentra en ambas biopelículas es *Magnetospirillum sp* (A: 13.0 % y B: 5.8 %), este género es capaz de utilizar productos finales de la fermentación como acetato, propionato, lactato y etanol como fuentes de carbono y donadores de electrones para el crecimiento heterotrófico y se pueden cultivar quimiolitotróficamente con hidrógeno como donador de electrones (Thrash *et al.*, 2010) y también se ha encontrado en biopelículas de sistemas bioelectroquímicos junto a *Geobacter sp* (Li *et al.*, 2013) pero no queda claro si contribuye a la producción de electrones extracelulares. *Rhodospseudomonas palustris* estuvo presente en abundancias similares en ambas biopelículas (A: 2.4 % y B: 2.4 %); es una bacteria fotosintética púrpura no del azufre y que también puede transferir electrones a un electrodo (microorganismos exoelectrogénicos) (Xing *et al.*, 2008). El crecimiento fototrófico de *R. palustris* puede darse en varios sustratos orgánicos, incluyendo acetato, lactato, succinato, piruvato por mencionar algunos (Jiao *et al.*, 2005). *Rhodocyclus sp* tiene una presencia del 6.1 % en la biopelícula con variación de DQO_i y se ha encontrado en otras biopelículas en sistemas bioelectroquímicos (Miyahara *et al.*, 2015; Parameswaran *et al.*, 2010); es capaz de crecer en condiciones anaerobias y de luz en presencia de acetato, butirato, caproato, piruvato y malato (Pfennig, 1978) no se ha clasificado en el grupo de organismos con capacidad de transferir electrones. La biopelícula B también contiene *Rhodocyclus sp*, pero a un 1 %.

A pesar de que los sistemas se sometieron a dos diferentes perturbaciones al final de la operación ambas biopelículas presentan una composición microbiana muy similar, pero con diferentes porcentajes de abundancia. Aunque al final de la operación el mejor desempeño de producción de hidrógeno y de electrones es ligeramente mayor en el sistema perturbado por la DQO_i lo que coincide con una mayor abundancia de *Geobacter sp* para la CEM con perturbaciones de E_{an} pareciera que *Geobacter* se ha visto desplazado por los géneros que cohabitan sobre la superficie del ánodo.

5.4 CONCLUSIONES

La robustez de la biopelícula electroactiva en una CEM empleada para la producción de hidrógeno se evaluó a partir de la variación de la concentración inicial de sustrato y E_{an} . La biopelícula

electroactiva se vio afectada significativamente por la variación de la concentración del sustrato afectando los parámetros de respuesta. Mantener la concentración de sustrato en un rango regulado durante la operación del reactor es importante si se desea mantener un desempeño estable. Definir el rango de tolerancia para las variaciones de la concentración de sustrato es un tema que debe estudiarse a futuro. La recuperación de hidrógeno en el cátodo no se vio afectada por ninguna de las variaciones (DQO_i y E_{an}), lo que significa que la actividad catalítica de la espuma de níquel permanece constante brindando robustez al funcionamiento de la CEM.

La variación del potencial anódico afectó significativamente el crecimiento y actividad de la biopelícula electroactiva y ésta a su vez tuvo un efecto significativo sobre la producción de hidrógeno, remoción de DQO y densidad de corriente. Los parámetros de respuesta relacionados con la conversión de sustrato a electrones y de electrones a hidrógeno no fueron perturbados. Por tanto, es importante definir los E_{an} de operación de los sistemas bioelectroquímicos productores de hidrógeno ya que más de dos variaciones de este parámetro afectarán significativamente la actividad de las bacterias exoelectrogénicas.

CAPÍTULO VI

6. INTERACCIÓN DEL pH DEL ANOLITO, CONCENTRACIÓN DE CATOLITO Y E_{AN} EN LA PRODUCCIÓN DE HIDRÓGENO EN CEMS

6.1 INTRODUCCIÓN

La CEM de dos cámaras separada por una membrana de intercambio iónico es un excelente diseño si lo que se desea es obtener hidrógeno de alta pureza (Nam y Logan, 2011; Yossan *et al.*, 2013). La membrana también evita que se mezclen el anolito y catolito. A partir de ácidos grasos volátiles la CEM puede producir hidrógeno (Yang *et al.*, 2015). Las bacterias exoelectrogénicas en el ánodo oxidan los compuestos orgánicos o inorgánicos y liberan electrones en un circuito y protones en el agua. Si se utiliza una membrana de intercambio catiónico los electrones y protones se combinan en el cátodo anaerobio generando hidrógeno al aplicar energía adicional al circuito para hacer que la producción de hidrógeno sea termodinámicamente favorable. En caso de utilizar una membrana de intercambio aniónico los electrones reducen la molécula de agua para producir hidrógeno aplicando un voltaje extra (Ruiz *et al.*, 2014). En ambos casos se presenta un equilibrio de la carga con iones que se mueven entre las cámaras de los electrodos (Nam y Logan, 2011) esto genera como resultado la acidificación del ánodo y la alcalinización del cátodo, produciendo un desequilibrio de pH entre la cámara anódica y catódica (Rozendal *et al.*, 2006a). Para minimizar los desequilibrios de pH se utiliza un buffer de fosfatos, pero el uso de estos no es sostenible (altos costos y efectos ambientales) y su uso incluso a concentraciones altas no evita la alcalinización de la cámara catódica (He *et al.*, 2008; Munoz *et al.*, 2010; Nam *et al.*, 2010; Yossan *et al.*, 2013). Estudios posteriores muestran que no es necesario controlar el pH del catolito con una solución tampón ya que en realidad la salinidad de la solución parece ser más importante (Kyazze *et al.*, 2010). Al usar una solución de NaCl como catolito (134 mM NaCl) con una conductividad alta (13.9 mS/cm) se han observado un rendimiento de hidrógeno cercano al que se obtiene con solución buffer de fosfatos, pero a un menor costo (Yossan *et al.*, 2013). Otro estudio ha encontrado que el uso de solución salina (68 mM NaCl) ha mejorado la producción de hidrógeno en comparación con solución amortiguadora de fosfato alcanzando altas producciones de hidrógeno (1.6 ± 0.2 L H₂/L/d) al alcanzar una alta conductividad.

El pH del anolito es otro factor de la cámara anódica que afecta el desempeño de la CEM. La mayoría de los estudios de producción de hidrógeno en CEM se han realizado a condiciones de pH neutras en la cámara anódica (Li *et al.*, 2014, 2; Villano *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2010a; Wang *et al.*, 2010b). Es importante el estudio de los microorganismos exoelectrogénicos que trabajan a pHs básicos ya que las intensidades de corriente más altas alcanzadas hasta el momento se han observado con el género *Geoalkalibacter* a condiciones alcalinas (Badalamenti *et al.*, 2013). Utilizando pH 9.3 en el anolito se alcanzaron producciones de 2.6 L H_2 /L/d, encontrando que *Geoalkalibacter* sp fue altamente abundante en la biopelícula anódica (Rago *et al.*, 2016). Previamente, se había reportado para el anolito un pH 9.0 como valor optimizado alcanzando 0.55 L H_2 /L/d (Liu *et al.*, 2014).

Los potenciales ánodos (E_{an}) bien regulados son útiles para seleccionar biopelículas eficientes, dominadas por *Geobacter* y disminuir el tiempo de puesta en marcha (Commault *et al.*, 2013). Sin embargo, los potenciales óptimos varían, algunos trabajos de investigación reportan mejores desempeños de los sistemas bioelectroquímicos a potenciales anódicos altos (Cho y Ellington, 2007; Wang *et al.*, 2009) mientras que otros presentan mejores resultados a potenciales bajos (Torres *et al.*, 2009). Por lo que se concluye que un E_{an} optimizado se debe determinar para cada caso específico debido a factores que pueden variar de un sistema a otro como lo puede ser la composición de la comunidad microbiana (influenciado por factores como el origen del inóculo (Ruiz *et al.*, 2014)) o la arquitectura del reactor (Kumar *et al.*, 2013). Un E_{an} óptimo está definido como aquel que genera altas densidades de corriente, tiempos de arranque cortos y favorece al desarrollo de la población exoelectrogénica sobre el ánodo y mejora su capacidad de descarga de electrones (Carmona-Martínez *et al.*, 2013; Kumar *et al.*, 2017).

Al momento de operar la CEM los factores que afectan la cámara anódica y catódica presentan una interacción que provoca que lo que sucede en la cámara anódica influya directamente en la eficiencia de la cámara catódica. Por tanto, es difícil intentar optimizar de manera independiente cada una de las condiciones operacionales. Estudios previos han identificado ciertas interacciones entre el material del cátodo y el pH del catolito (Ribot-Llobet *et al.*, 2013), entre el pH del anolito y el cátodo (Liu *et al.*, 2014). Pero el más importante hasta el momento es el de Nam y Logan, (2012) que optimizaron la concentración de catolito y el pH del anolito en una CEM de dos cámaras, alcanzando una tasa de producción de hidrógeno de 2.2 L H_2 /L/d con una concentración de 98 mM de NaCl y un pH en el anolito de 9.0. Encontraron que el pH en el anolito debe

permanecer por encima de 6.0, de lo contrario el rendimiento de la CEM se ve reducido por la inhibición del pH sobre los microorganismos exoelectrogénicos. Los parámetros que han sido estudiados hasta el momento se han llevado a cabo con sustrato modelo (acetato de sodio). Tampoco se han evaluado las interacciones en conjunto de los parámetros operacionales antes mencionados y no se ha observado la influencia y efecto de utilizar un sustrato compuesto por ácidos grasos volátiles. Por tanto, resulta relevante diseñar pruebas experimentales que permitan analizar las interacciones que se presentan entre el pH del anolito, concentración del catolito y potencial anódico aplicado con un sustrato complejo que permitan aumentar el desempeño de la CEM a partir de la optimización de estas condiciones de operación.

El objetivo de este capítulo fue evaluar la interacción entre el pH del anolito, la concentración del catolito (mM NaCl) y el E_{an} aplicado en una CEM de dos cámaras que utiliza ácidos grasos volátiles como sustrato, para maximizar la producción de H₂ y el desempeño de los reactores utilizando una metodología de superficie de respuesta.

6.2 MATERIALES Y MÉTODOS

6.2.1 Diseño experimental – Central Compuesto

El pH del anolito, la concentración de catolito y el potencial anódico se consideraron las variables de estudio en esta actividad experimental. La metodología de superficie de respuesta seleccionada fue un diseño central compuesto (DCC) el cual puede ajustarse a un modelo cuadrático completo en estudios de optimización de procesos. El DCC es un diseño factorial con puntos centrales, ampliado con un grupo de puntos axiales (también denominados puntos de estrella) que permiten estimar la curvatura. En este caso se consideró un diseño factorial completo 3³ como la base del DCC con tres factores para conservar la rotabilidad. El DCC cuenta con 21 corridas de las cuales 7 corresponden a los puntos centrales, el valor de $\alpha = 1.682$ fue el utilizado para la distancia entre los puntos axiales y centrales (Myers *et al.*, 2009).

Para el pH del anolito se propuso como nivel bajo 7 que es el pH de uso generalizado (Li *et al.*, 2014, 2; Villano *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2010a; Wang *et al.*, 2010b) y como nivel alto se seleccionó 8.8 muy cercano al óptimo que se ha reportado para producción de hidrógeno en CEM (Nam y Logan, 2012; Rago *et al.*, 2016). El nivel bajo de la concentración de catolito fue de 80 mM NaCl (Nam y Logan, 2012, 2011) y el alto de 240 mM NaCl (Ahn y Logan, 2013). Respecto al E_{an} un potencial positivo debería permitir que los microorganismos exoelectrogénicos ganen más

energía por electrón transferido que las reacciones llevadas a cabo con un potencial más bajo (Wagner *et al.*, 2010). Por tanto, se seleccionaron como E_{an} de nivel bajo 0.3 V vs Ag/AgCl y 0.8 V vs Ag/AgCl para el nivel alto (Busalmen *et al.*, 2008; Cardeña *et al.*, 2018; Finkelstein *et al.*, 2006). La Tabla 6.1 presenta las variables seleccionadas y los rangos y niveles de cada variable (alta (+1), media (0) y baja (-1)).

Tabla 6.1. Valores empleados en diseño experimental Central Compuesto.

Variable	Código	Variables codificadas y naturales del diseño				
		-1.682	-1	0	1	1.682
pH anolito	X ₁	6.4	7	7.9	8.8	9.4
Concentración catolito (mM NaCl)	X ₂	25.5	80	160	240	294
E_{an} (V)	X ₃	0.13	0.3	0.55	0.8	0.97

Tabla 6.2. Corridas arrojadas por el diseño central compuesto usando el Minitab 15.

Corrida	Anolito (pH)	Catolito (mM NaCl)	E_{an} (V)
	X ₁	X ₂	X ₃
1	6.4	160	0.55
2	7.0	80	0.80
3	7.0	80	0.30
4	7.0	240	0.80
5	7.0	240	0.30
6	7.9	160	0.55
7	7.9	160	0.55
8	7.9	160	0.55
9	7.9	160	0.55
10	7.9	160	0.55
11	7.9	25.5	0.55
12	7.9	294	0.55
13	7.9	160	0.13
14	7.9	160	0.97
15	7.9	160	0.55
16	7.9	160	0.55
17	8.8	80	0.80
18	8.8	80	0.30
19	8.8	240	0.80
20	8.8	240	0.30
21	9.4	160	0.55

El arreglo experimental se obtuvo utilizando el programa Minitab 18.1. La Tabla 6.2 presenta las 21 corridas arrojadas las cuales se desarrollaron en 5 bloques experimentales. Cada corrida fue arrancada de manera individual e independiente para evitar el efecto de condiciones anteriores sobre el desempeño de la CEM.

Al obtener los resultados de las 21 pruebas, se analizaron en el programa Minitab 18.1 y se generaron las gráficas de superficie de respuesta y se utilizó el optimizador de respuesta para obtener las mejores condiciones operacionales.

6.2.2 Reactores CEM y operación

Los reactores utilizados para desarrollar las pruebas arrojadas por el DCC son las CEM de acrílico con bordes redondeados que se muestran en la Fig. 6.1 y que han sido descritas en la sección 3.2 del Capítulo III. Las pruebas se realizaron bajo el control de un potenciostato/galvanostato VSP/Z-01 (BioLogic Science Instruments, France).

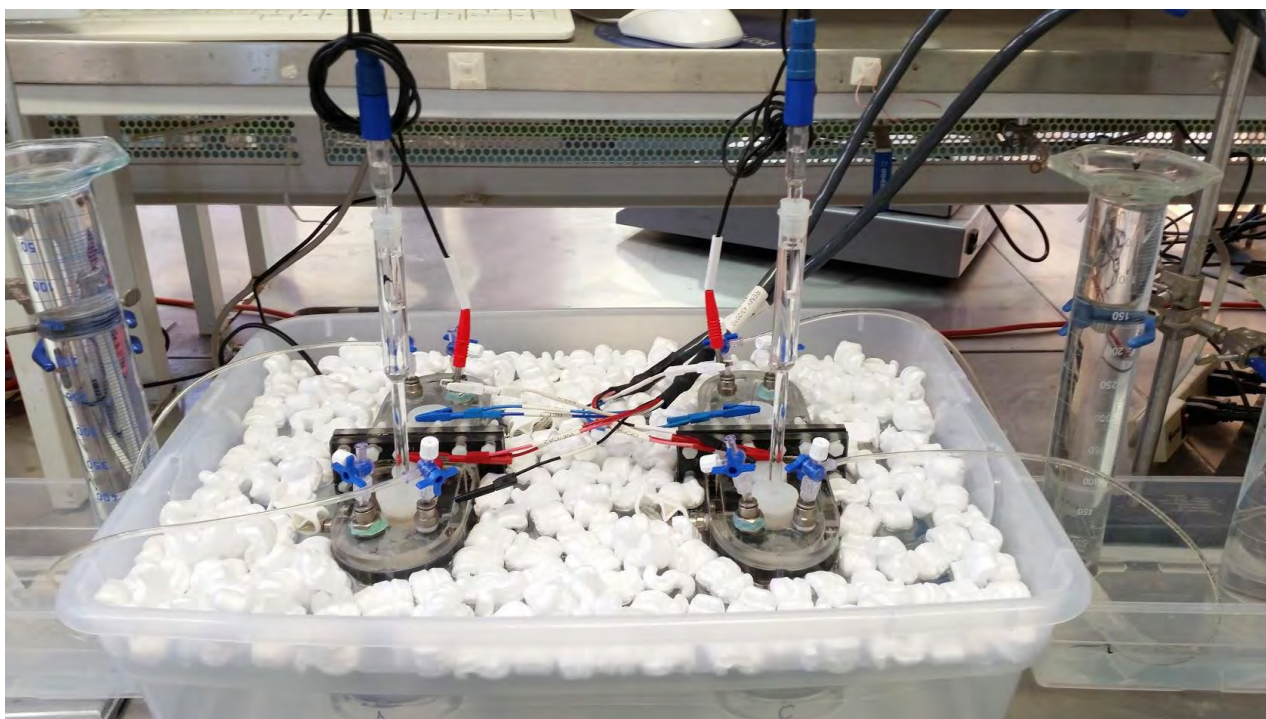


Figura 6.1. CEM de bordes redondeados utilizadas para evaluar la robustez de la biopelícula electroactiva y arreglo experimental utilizado para el DCC.

La concentración de sustrato inicial fue de 1.5 g DQO/L para todas las pruebas utilizando la siguiente composición: 57% butirato, 30 % acetato y 13 % propionato. Cada una de las 21 pruebas se llevó a cabo de manera independiente con su respectiva formación de biopelícula para evitar

efectos precedentes de alguna condición previa. La estrategia de formación de biopelícula que se siguió es la descrita en la sección 3.4 del capítulo III utilizando como condiciones de arranque las establecidas en la Tabla 6.2; cada inicio de ciclo el anolito y catolito eran reemplazados por medios nuevos. Para determinar el efecto de cada una de las condiciones a evaluar se realizaron un mínimo de 6 ciclos operacionales (que presentaran respuestas similares) posteriores a la remoción del inóculo, asegurando la reproducibilidad de los experimentos y la certeza de los resultados. Los experimentos se realizaron de manera continua (5 bloques) hasta evaluar los 21 experimentos arrojados por el DCC (Tabla 6.2).

6.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los periodos de colonización (formación de biopelícula) presentaron un periodo de entre 15 y 20 días. Posteriormente los parámetros de respuesta se midieron por un periodo de 6 ciclos en los que las densidades de corriente se mantuvieron con una desviación estándar menor al 10 % asegurando la reproducibilidad de las condiciones. Para los E_{an} superiores a 0.55 V vs Ag/AgCl los valores que se reportan para los parámetros de respuesta se les asignó 0 dado que no se alcanzó estabilidad en estas pruebas. La Figura 6.2 es un ejemplo de lo sucedido al aplicar un E_{an} de 0.8 V (pH = 7 y 80 mM NaCl) en el cual después de 4 ciclos la densidad de corriente y tasas de producción de hidrógeno alcanzando desviaciones estándar superiores al 15 %. Disminuyendo el rendimiento del resto de parámetros de respuesta. Este efecto se observó en todas las corridas con $E_{an} = 0.8$ y 0.94 V. Por tanto, se concluye que voltajes superiores a los 0.55 V resultan perjudiciales para los microorganismos exoelectrogénicos en la biopelícula impidiendo su correcto desarrollo y llegando a provocar un efecto inhibitorio.

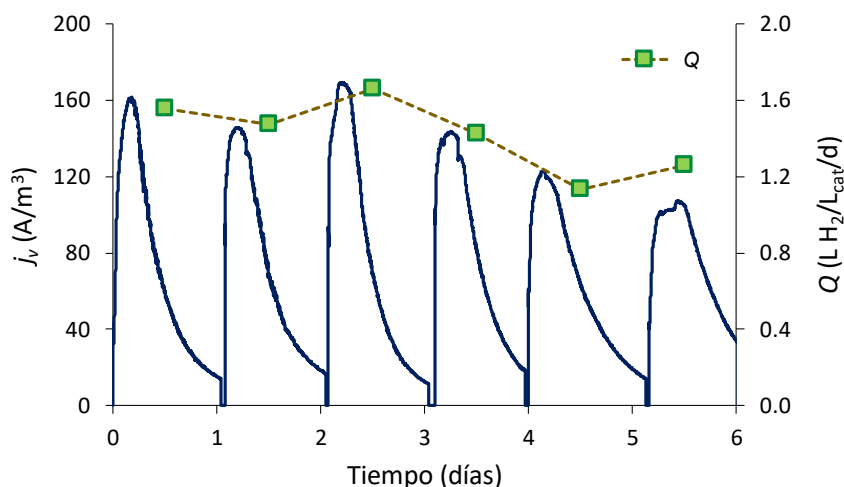


Figura 6.2. Densidad de corriente y tasa de producción de corrida 2 ($E_{an} = 0.8$ V, 80 mM NaCl y pH 7.0).

Se ha reportado que a E_{an} de 0.51 y 0.81 V las corrientes eléctricas disminuyen. Las diferencias en el rendimiento del ánodo a distintos E_{an} establecidos sugieren que las comunidades exoelectrogénicas autorregulan sus vías de transferencia de electrones exocelulares para adaptarse a diferentes potenciales del ánodo (Zhu *et al.*, 2014).

En la Tabla 6.3 se presentan los resultados condensados obtenidos a partir de las 21 corridas evaluadas. Sólo se aceptaron valores que presentaran desviaciones estándar menores a 10 %. La única excepción fueron las tasas de producción de hidrógeno para las cuales se puso un límite del 15 %. Ya obtenidos los valores de respuesta se ingresaron al programa Minitab 18.1 para realizar el análisis estadístico. Los parámetros de respuesta evaluados fueron: volumen de hidrógeno, tasa de producción de hidrógeno, remoción de DQO, eficiencia coulombica, recuperación catódica de hidrógeno y rendimiento de H₂. Para cada una de las respuestas se realizó un análisis de varianza y se validaron los modelos obtenidos. De igual forma se obtuvieron las gráficas de superficie de respuesta para interpretar la interacción de las variables propuestas.

El análisis de varianza del volumen de hidrógeno mostró un modelo significativo ($p = 0.0001$) con una correlación de 91.3 % y una R^2 ajustada de 84.2 % del que se obtuvo la siguiente ecuación polinomial:

$$\begin{aligned} Vol. (mL H_2) = & -3269 + 747.5X_1 + 0.71X_2 + 1488.3X_3 - 0.048X_1X_2 - 136.9X_1X_3 + 0.2X_2X_3 - 39.1X_1^2 \\ & - 0.0016X_2^2 - 744.4X_3^2 \end{aligned}$$

en donde X_1 es el pH del anolito X_2 es la concentración del catolito y X_3 el E_{an} . El modelo generado mostró un efecto significativo del pH del anolito ($p = 0.0035$) y el E_{an} ($p = 0.0001$) sobre el volumen de H₂ generado. También el cuadrado del pH del anolito ($p = 0.013$) y E_{an} ($p = 0.001$) son efectos significativos. La Figura 6.3 muestra que a un menor E_{an} y un pH alcalino se obtienen mayores volúmenes de hidrógeno (Fig. 6.3C). Sin embargo, un rango óptimo de entre 8 y 9 del pH del anolito se puede observar (Fig. 6.3B) al igual que un umbral de 0.2 a 0.4 V de E_{an} (Fig 6.3A). Respecto a la concentración de catolito una buena producción se aprecia entre los 25 y 184 mM de NaCl (Fig. 6.3A y B). Queda claro que los efectos más significativos sobre la cantidad de H₂ producido son el E_{an} y el pH del anolito (Fig 6.3C). El mayor volumen (300 ± 15 mL H₂) se obtuvo a un $E_{an} = 0.3$ V, 80 mM NaCl y 8.8 de pH en el anolito. El pH alcalino en el anolito favorece la producción de hidrógeno aunado a un voltaje positivo (0.2 – 0.4 V).

Tabla 6.3. Desempeño de las pruebas en CEM obtenidos a partir de la evaluación de las pruebas arrojadas por el DCC.

	Anolito (pH)	Catolito (mM NaCl)	E_{an} (V)	V (mL H_2)	Q (mL $H_2/L_{cat}/d$)	DQO_{rem} (%)	E_C (%)	r_{cat} (%)	r_{H_2} (%)	Y_{H_2} (mL H_2/g DQO)	η_E (%)	η_{E+S} (%)
1	6.4	160	0.55	66 ± 9	316 ± 51	19 ± 1	42 ± 5	96 ± 5	40 ± 6	573 ± 85	215 ± 12	34 ± 5
2	7.0	80	0.8	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3	7.0	80	0.3	163 ± 8	1049 ± 170	42 ± 6	50 ± 8	93 ± 6	47 ± 6	666 ± 103	384 ± 8	41 ± 6
4	7.0	240	0.8	0	0	0	0	0	0	0	0	0
5	7.0	240	0.3	161 ± 18	1314 ± 214	29 ± 2	68 ± 3	96 ± 1	66 ± 3	931 ± 45	394 ± 4	56 ± 2
6	7.9	160	0.55	203 ± 5	644 ± 129	45 ± 3	69 ± 11	78 ± 12	53 ± 4	756 ± 57	175 ± 27	40 ± 3
7	7.9	160	0.55	205 ± 16	876 ± 141	38 ± 3	72 ± 7	90 ± 6	65 ± 3	915 ± 44	202 ± 14	48 ± 2
8	7.9	160	0.55	207 ± 10	940 ± 137	41 ± 1	61 ± 7	95 ± 10	58 ± 1	819 ± 8	211 ± 22	45 ± 1
9	7.9	160	0.55	210 ± 22	590 ± 24	33 ± 4	76 ± 9	102 ± 15	76 ± 5	1083 ± 74	228 ± 33	57 ± 4
10	7.9	160	0.55	246 ± 9	1352 ± 85	44 ± 3	71 ± 5	91 ± 6	65 ± 1	917 ± 10	203 ± 14	49 ± 1
11	7.9	25.45	0.55	240 ± 29	722 ± 113	43 ± 4	79 ± 8	83 ± 6	65 ± 6	926 ± 87	186 ± 14	48 ± 4
12	7.9	294.54	0.55	206 ± 12	809 ± 165	43 ± 2	66 ± 8	82 ± 12	54 ± 5	760 ± 65	183 ± 26	41 ± 4
13	7.9	160	0.13	241 ± 19	3488 ± 654	43 ± 6	72 ± 9	94 ± 5	68 ± 10	962 ± 149	893 ± 43	61 ± 9
14	7.9	160	0.97	0	0	0	0	0	0	0	0	0
15	7.9	160	0.55	241 ± 18	660 ± 51	44 ± 3	83 ± 12	77 ± 10	64 ± 4	903 ± 53	173 ± 22	46 ± 2
16	7.9	160	0.55	232 ± 8	1259 ± 10	32 ± 4	81 ± 11	96 ± 3	64 ± 6	956 ± 18	179 ± 43	47 ± 6
17	8.8	80	0.8	0	0	0	0	0	0	0	0	0
18	8.8	80	0.3	300 ± 15	3175 ± 588	54 ± 4	63 ± 6	102 ± 1	65 ± 6	918 ± 91	419 ± 4	56 ± 5
19	8.8	240	0.8	0	0	0	0	0	0	0	0	0
20	8.8	240	0.3	270 ± 14	3238 ± 466	45 ± 5	68 ± 8	103 ± 7	70 ± 10	991 ± 138	423 ± 30	59 ± 8
21	9.4	160	0.55	259 ± 20	3701 ± 637	46 ± 5	67 ± 7	100 ± 7	67 ± 8	945 ± 114	223 ± 17	51 ± 5

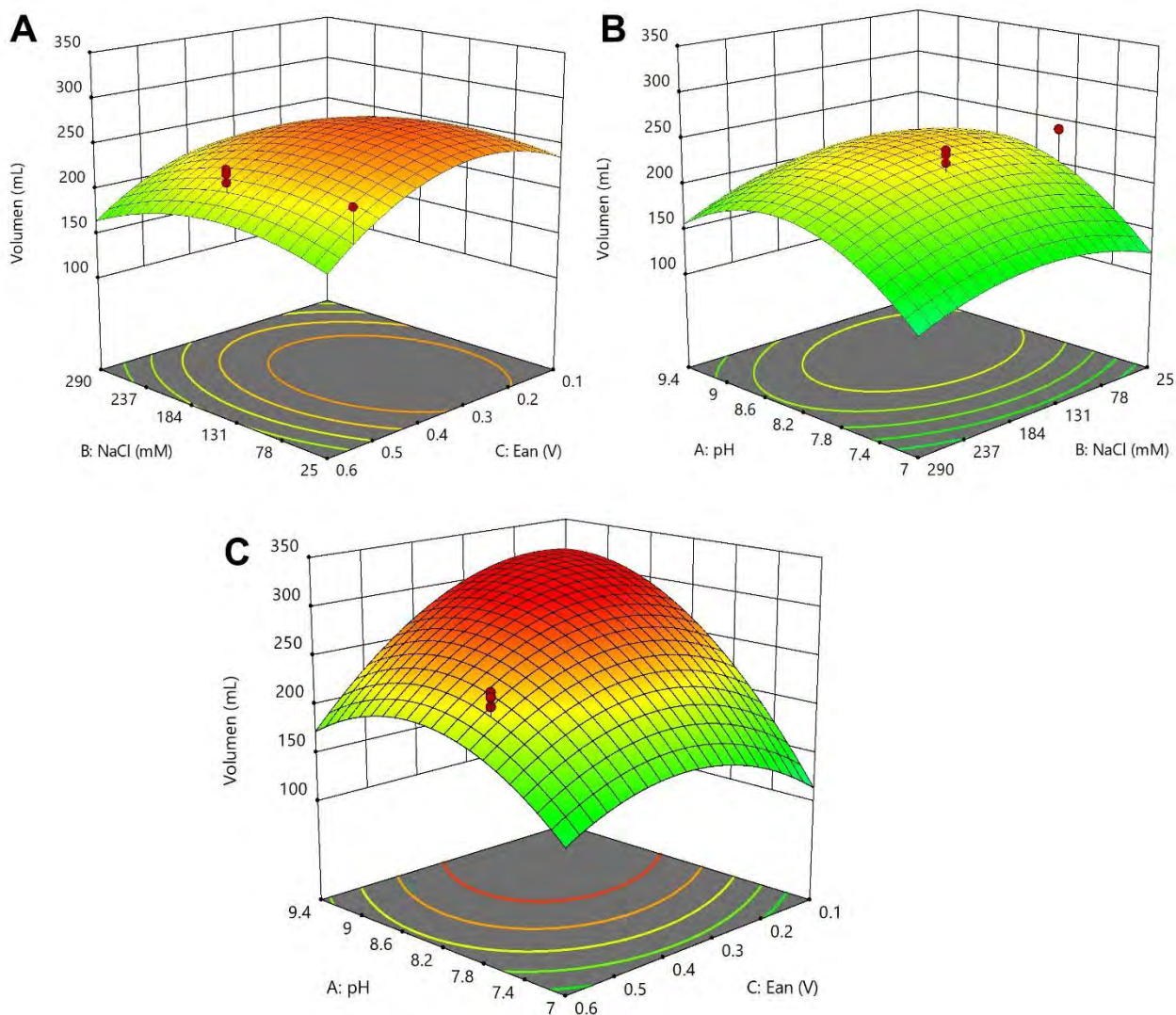


Figura 6.3. Superficies de respuesta para el volumen de H_2 en función del pH del anolito, catolito (mM NaCl) y E_{an} .

La ecuación obtenida para la tasa de producción de hidrógeno a partir del ANOVA realizado se presenta a continuación:

$$Q \left(mL \frac{H_2}{L_{cat} \cdot d} \right) = 9884.1 - 3717.1X_1 + 11.4X_2 + 10226.3X_3 - 0.35X_1X_2 - 2250.2X_1X_3 - 2X_2X_3 + 367.3X_1^2 - 0.022X_2^2 + 3263.6X_3^2$$

en donde X_1 es el pH del anolito X_2 es la concentración del catolito y X_3 el E_{an} . El análisis de varianza mostró que el modelo generado es significativo ($p = 0.0001$) el valor del coeficiente de regresión R^2 fue de 93 % y una R^2 ajustada del 87.3 %. El pH del anolito tiene un efecto significativo ($p = 0.0001$) al igual que el E_{an} ($p = 0.0001$) y su interacción $pH \cdot E_{an}$ ($p = 0.0067$) sobre la velocidad de producción de H_2 . El efecto cuadrático del pH del anolito también fue

significativo ($p = 0.021$). La Figura 6.4A muestra que la Q aumenta a pH alcalino del anolito. La interacción entre el E_{an} y Q es muy clara en la Fig 6.4B, entre más bajo sea el E_{an} (<0.3 V) y más alcalino el anolito (>8), mayor será la tasa de producción de H_2 . La mayor Q obtenida se encontró a pH 9.4 en el anolito, un $E_{an} = 0.55$ V y 160 mM NaCl (3.7 L $H_2/L_{cat}/d$). La concentración del catolito no tuvo un efecto significativo y para la Q las áreas con mayor intensidad parecen las cercanas a los 150 mM de NaCl (Fig. 6A y C).

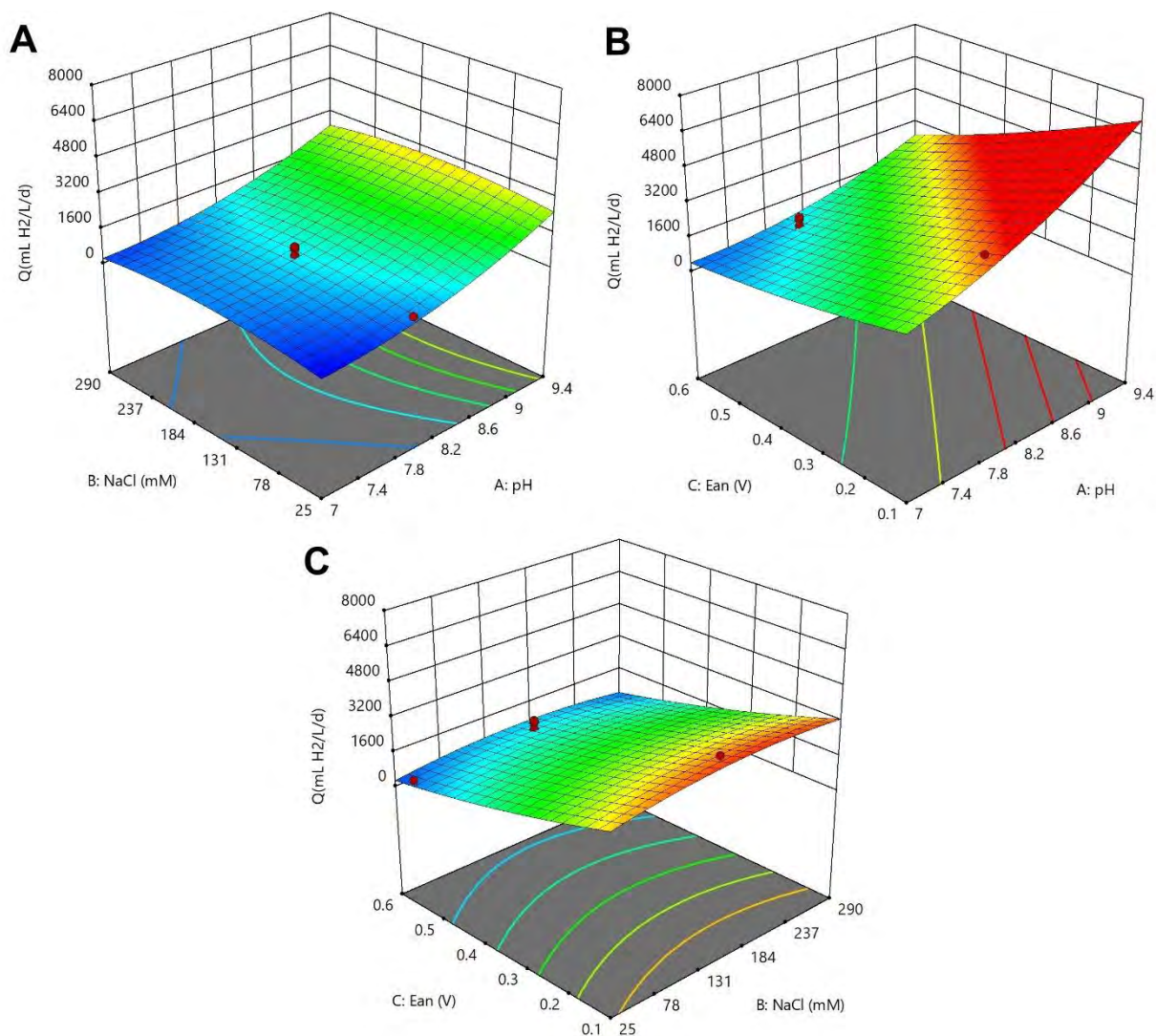


Figura 6.4. Superficies de respuesta para la Q en función del pH del anolito, catolito (mM NaCl) y E_{an} .

Los resultados respecto a la producción de hidrógeno parecieran indicar que se debió ampliar los rangos evaluados. Sin embargo, analizando los parámetros restantes quedará claro que una alta producción de hidrógeno no necesariamente significa que la CEM tiene un buen desempeño. La remoción de materia orgánica en estos sistemas es muy importante ya que se busca dar tratamiento

a un residuo y obtener el hidrógeno como producto de valor agregado. El ANOVA ofreció la siguiente ecuación:

$$DQO_{rem} (\%) = -414.3 + 103.9X_1 - 0.10X_2 + 181.1X_3 + 0.007X_1X_2 - 15.5X_1X_3 + 0.14X_2X_3 - 5.7X_1^2 - 0.0001X_2^2 - 137.9X_3^2$$

en donde X_1 es el pH del anolito X_2 es la concentración del catolito y X_3 el E_{an} . El modelo generado fue significativo ($p = 0.0007$) a partir del ANOVA realizado. Con un coeficiente de regresión R^2 de 87.8 % y una R^2 ajustada del 77.9 %. Al igual que en los modelos anteriores el pH del anolito y el E_{an} tienen un efecto significativo sobre la remoción de la materia orgánica ($p = 0.049$ y 0.0001 , respectivamente).

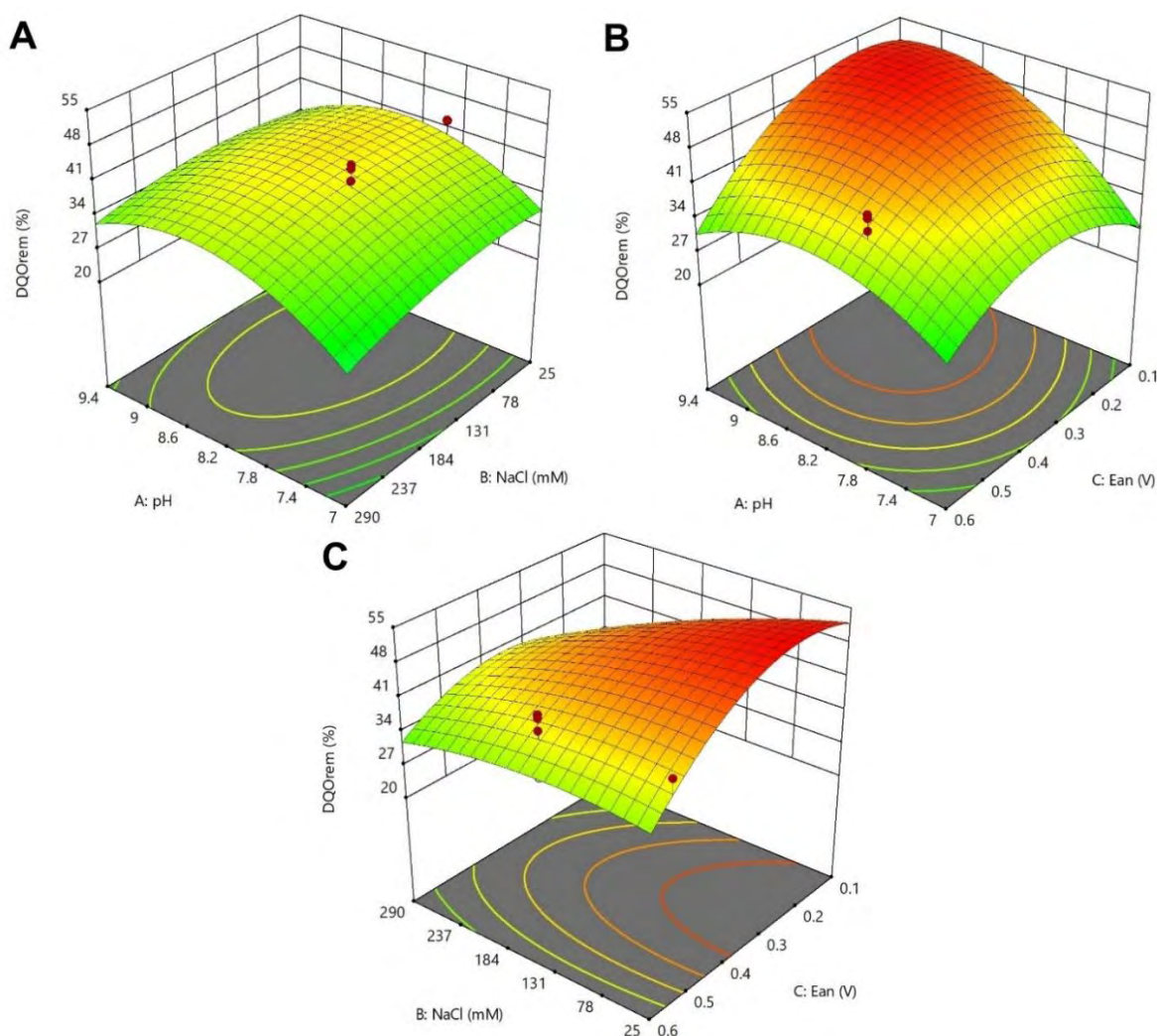


Figura 6.5. Interacciones del pH del anolito, catolito (mM NaCl) y E_{an} respecto a la materia orgánica removida medida como DQO.

Las superficies de respuesta generadas encuentran las mejores remociones a un rango de pH de anolito de entre 8.4 y 9, un $E_{an} = 0.2 - 0.3$ V y una concentración de catolito de entre 25 y 180 mM

NaCl (Fig. 6.5). La mayor remoción de la materia orgánica (medida como DQO) obtenida para DCC arrojó un valor de 54 % a $E_{an} = 0.3$ V, 80 mM NaCl y un pH del anolito de 8.8.

La eficiencia coulombica es la cantidad de electrones cosechados en el ánodo a partir del sustrato consumido por los microorganismos. Al representar una importante variable de respuesta también se evaluó mediante la metodología de superficie de respuesta. El ANOVA realizado respecto a la E_C arrojó la siguiente ecuación:

$$E_C (\%) = -951.5 + 232.5X_1 + 0.5X_2 + 283.9X_3 - 0.024X_1X_2 - 6.9X_1X_3 - 0.14X_2X_3 - 13.9X_1^2 - 0.0008X_2^2 - 286.3X_3^2$$

en donde X_1 es el pH del anolito X_2 es la concentración del catolito y X_3 el E_{an} .

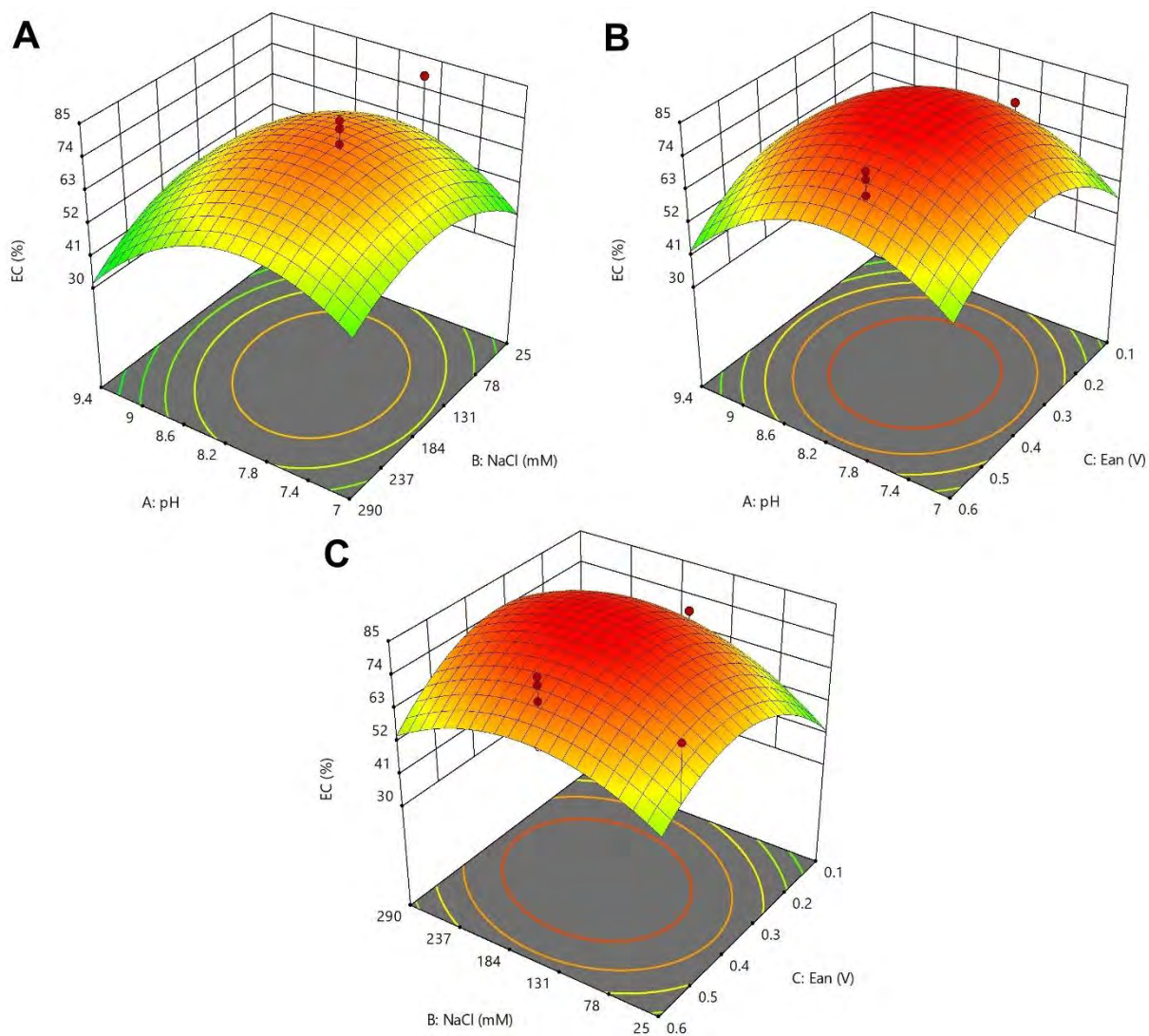


Figura 6.6. Interacciones del pH del anolito, catolito (mM NaCl) y E_{an} respecto a la E_C .

El ANOVA realizado a los resultados mostró que el modelo era significativo ($p = 0.0009$). Solamente se observa un efecto significativo por parte del E_{an} ($p = 0.0001$). Se encontró que el E_{an} , el cuadrado del pH y el cuadrado del E_{an} son términos significativos ($p = 0.0001$, 0.014 y 0.0007 , respectivamente). El valor del coeficiente de regresión R^2 obtenido fue de 87.3% y una R^2 ajustada del 76.8% . En la Figura 6.6 se puede ver que existen áreas óptimas claramente definidas para las interacciones estudiadas. pH del anolito en un rango de $7.8 - 8.6$, una concentración de catolito alrededor de 180 mM de NaCl y un E_{an} de entre 0.3 y 0.4 V parecen ofrecer las mejores eficiencias coulombicas.

La recuperación catódica de hidrógeno permite conocer la cantidad de electrones aprovechados para la reacción de producción de H_2 que se da en el cátodo. Para este caso el ANOVA aplicado generó la ecuación que a continuación se detalla:

$$r_{cat} (\%) = -205.4 + 56.7X_1 + 0.4X_2 + 271.4X_3 - 0.003X_1X_2 - 8.9X_1X_3 - 0.02X_2X_3 - 3.14X_1^2 - 0.0012X_2^2 - 326.9X_3^2$$

en donde X_1 es el pH del anolito X_2 es la concentración del catolito y X_3 el E_{an} . El modelo generado para esta respuesta fue significativo ($p = 0.0007$) con una regresión lineal de 87.8% y una R^2 ajustada de 77.8% . Sólo se observó un efecto significativo por parte del E_{an} y su cuadrado ($p = 0.0001$ y 0.0018 , respectivamente). Las superficies de respuesta presentan respuestas muy claras de las interacciones que se presentan. Una concentración de 140 a 180 mM parece brindar mejores recuperaciones de hidrógeno aunado a E_{an} en un rango de 0.2 a 0.4 V (Fig. 6.7). El pH del anolito no tiene un efecto significativo se presentan altas r_{cat} entre 7.0 y 9.4 un intervalo bastante amplio (Fig. 6.7A y B). De manera general durante la experimentación del DCC se obtuvieron recuperaciones catódicas superiores al 77% y en más del 70% de las pruebas las r_{cat} estuvieron por encima del 90% . Esto es muy importante, ya que de entrada el material de cátodo interactúa favorablemente con la solución salina de cloruro de sodio para la recuperación de hidrógeno. El hidrógeno obtenido en este caso es producto de la reducción del agua ($2H_2O + 2e^- \rightarrow H_2 + 2OH^-$) lo que a su vez está saturando el catolito de hidroxilos generando un aumento del pH en la cámara catódica.

La recuperación global de hidrógeno no se evaluó como respuesta en el DCC ya que este parámetro es el producto de la eficiencia coulombica y recuperación catódica de hidrógeno ($r_{H_2} = E_C * r_{cat}$) y por tanto está implícita al momento de calcular la E_C y la r_{cat} de manera individual.

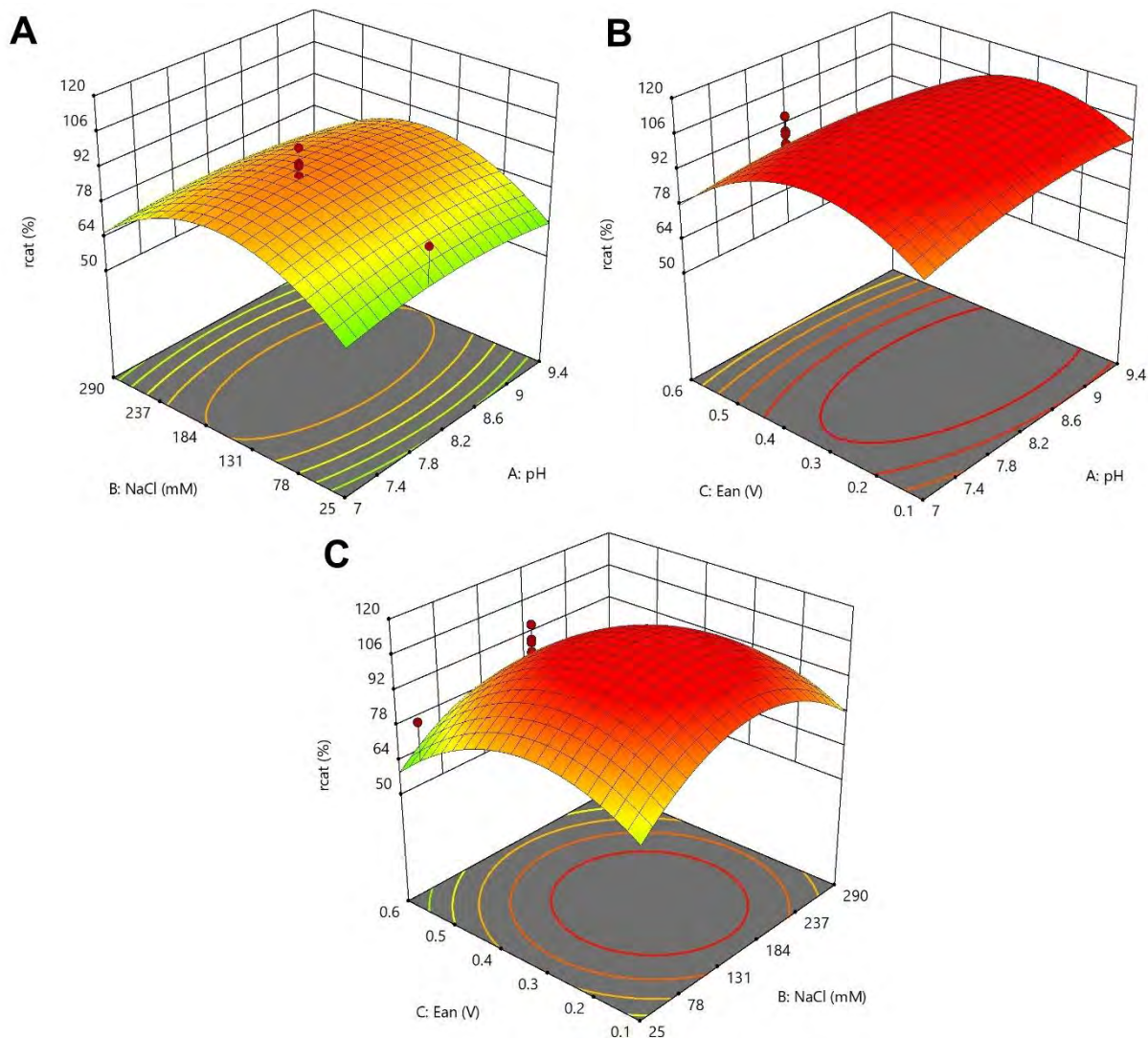


Figura 6.7. Interacciones del pH del anolito, catolito (mM NaCl) y E_{an} respecto a la r_{cat} .

El último parámetro de respuesta evaluado en la metodología de superficie de respuesta del DCC fue el rendimiento de hidrógeno. Aunque la medición del Y_{H_2} como se viene realizando es una medición subjetiva, ya que el rendimiento está dado por la cantidad total de materia orgánica removida, pero debería estar dada únicamente por el sustrato que se transformó a electrones. Sin embargo, es un indicador muy útil para cuantificar la valorización de los residuos a ser tratados en un sistema bioelectroquímico. La ecuación del modelo para el Y_{H_2} es la siguiente:

$$Y_{H_2} (\%) = -205.4 + 56.7X_1 + 0.4X_2 + 271.4X_3 - 0.003X_1X_2 - 8.9X_1X_3 - 0.02X_2X_3 - 3.14X_1^2 - 0.0012X_2^2 - 326.9X_3^2$$

en donde X_1 es el pH del anolito X_2 es la concentración del catolito y X_3 el E_{an} . El modelo obtenido es significativo ($p = 0.0006$) posee una R^2 de 88.1 % y una correlación ajustada del 78.3 %. El

rendimiento de hidrógeno se ve influenciado significativamente por el potencial anódico ($p = 0.0001$) y el cuadrado del E_{an} ($p = 0.0015$). Las superficies de respuesta muestran rendimientos de hidrógeno máximos en rangos de $E_{an} = 0.2 - 0.4$ V, pH del anolito = $8.0 - 8.6$ y concentración de catolito de $130 - 180$ mM NaCl (Fig. 6.8).

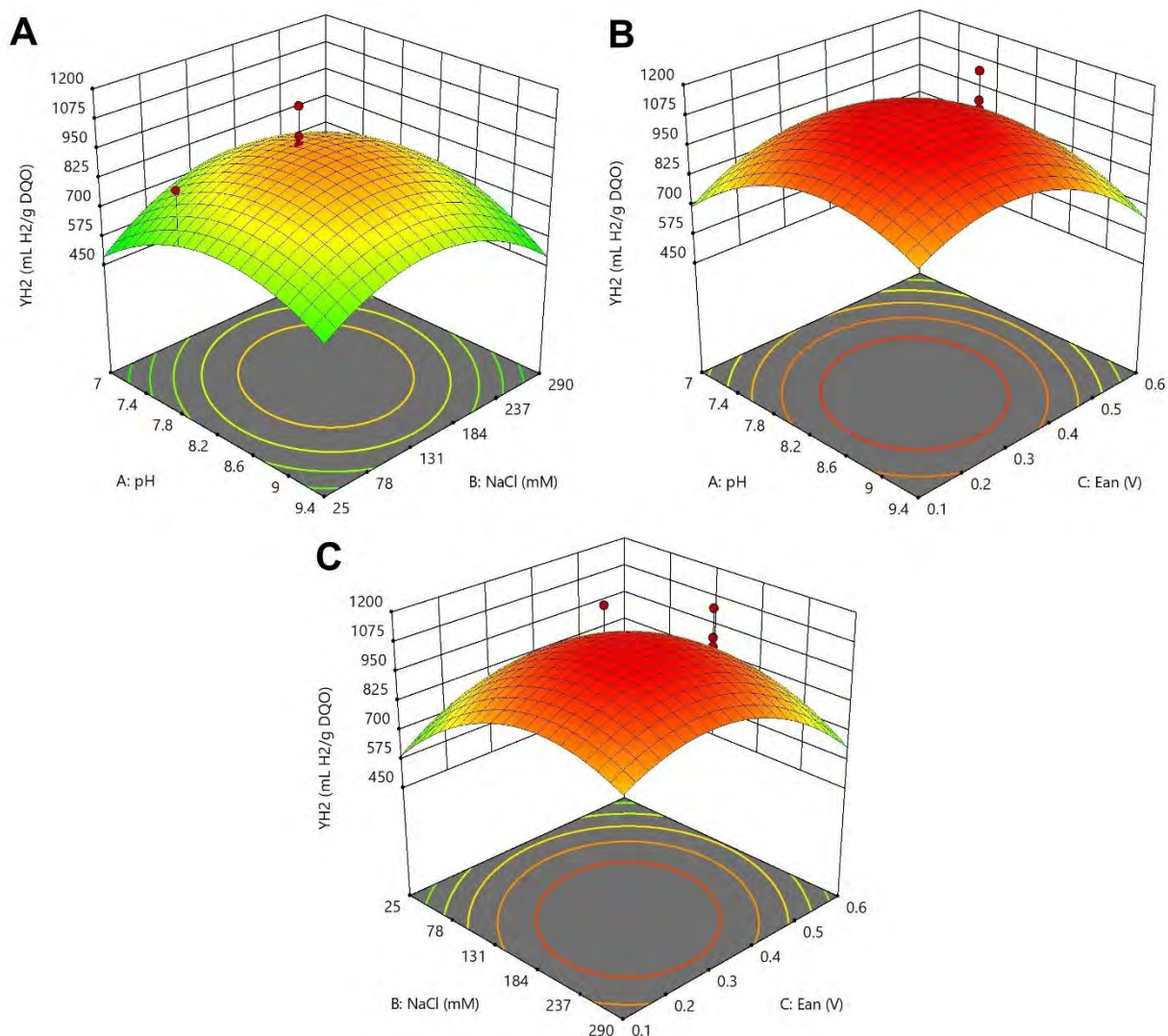


Figura 6.8. Interacciones del pH del anolito, catolito (mM NaCl) y E_{an} respecto al Y_{H_2} .

De los resultados anteriores es claro que la variable que más influye sobre el rendimiento de la CEM es el potencial anódico. Sin embargo, no se puede ignorar la interacción que se presenta entre el resto de las variables. A través de este estudio se revela la importancia de estudiar en la metodología de superficie más parámetros de respuesta a parte de los relacionados con la producción de hidrógeno (Volumen de H_2 y Q) ya que al aplicar un optimizador este tendrá mayor posibilidad de arrojar condiciones que permitan maximizar el desempeño global de la CEM.

Al aplicar el optimizador al DCC estudiado se obtuvo como condiciones operacionales óptimas un $E_{an} = 0.2$ V, un pH del anolito de 8.7 y una concentración para el catolito de 150 mM de NaCl. Condiciones a las cuales se esperaría obtener una $Q = 4.3$ L $H_2/L_{cat}/d$, una remoción de DQO del 54 %, $E_C = 76$ %, $r_{cat} = 100$ % y un $Y_{H_2} = 1065$ mL H_2/g DQO.

Los estudios previos que han buscado optimizar las condiciones operacionales en conjunto de la CEM son escasos. Nam y Logan (2012) reportaron condiciones optimizadas para el pH del anolito (9.0) y concentración de catolito (98 mM NaCl) con las cuales alcanzaron una tasa de producción de 2.2 L $H_2/L_{an}/d$. Mencionan que utilizar concentraciones mayores a 98 mM de NaCl conducía a reducciones de pH en la cámara anódica a 4.6, no obstante en el presente estudio ese fenómeno no fue observado el pH mínimo alcanzado en la cámara anódica fue de 5.0 al utilizar un pH inicial de 7.0 pero utilizando como pH inicial de anolito de 9.0 el pH final llegaba únicamente a 6.0. Otro problema con el estudio antes mencionado es que como respuestas únicamente consideran la j_A y la producción de hidrógeno (Volumen de H_2 y Q) sin tener en cuenta parámetros como la E_C , r_{cat} y rendimiento de H_2 . Las pruebas se realizaron con acetato como sustrato modelo el cual es fácilmente asimilable por los microorganismos exoelectrogénicos, pero no brinda la oportunidad de conocer las interacciones en un entorno más apegado a la realidad. Lo anterior conllevó a que el Y_{H_2} únicamente este dado para el acetato. Sin embargo, a pesar de usar acetato como sustrato las remociones de sustrato alcanzan 90 % y su E_C es del 80 %. Los resultados obtenidos en este trabajo resultan ligeramente inferiores en cuanto a la DQO_{rem} y la E_C , pero tratándose de un sustrato más complejo que representa una mezcla de AGVs aunque respecto a la producción de hidrógeno a condiciones de pH del anolito de 8.8, 80 mM NaCl y $E_{an} = 0.3$ V se alcanza una Q de 3.2 L $H_2/L_{cat}/d$ y un volumen de 7938 mL H_2/L_{cat} cantidades considerablemente mayores respecto a los 2.2 L $H_2/L_{an}/d$ y 1393 mL H_2/L_{an} obtenidos por Nam y Logan (2012).

Otro estudio evaluó el pH del anolito y la cantidad de Pt en el cátodo utilizando acetato como sustrato modelo (Liu *et al.*, 2014). Encontraron que 9.0 era el pH óptimo para el anolito alcanzando una Q de 0.55 L $H_2/L_{an}/d$ con una remoción de DQO del 76 % pero con una r_{cat} de 69 %. La recuperación de hidrógeno en el cátodo es baja probablemente por el catolito que utilizaron (HCl al 0.1 M), utilizando NaCl como catolito en el presente estudio las r_{cat} fueron mayores al 77 % en el estudio realizado por Nam y Logan (2012) las r_{cat} alcanzaron rendimientos mayores al 90 %. El NaCl como catolito presenta mejores resultados que las soluciones acidificadas.

Wang *et al.*, (2017) estudiaron la influencia del pH inicial del anolito y la temperatura sobre la producción de hidrógeno en CEM obteniendo tasas de producción de 7.2 L H_2 /L_{cat}/d a un pH inicial de 6.5 difiriendo en gran medida de los resultados obtenidos en esta investigación. La única explicación puede ser por el sustrato utilizado ya que emplearon paja de arroz para generar una sacarificación y fermentación simultánea. No obstante, el estudio no presenta resultados extras fuera de las producciones de hidrógeno.

El pH inicial del anolito se ha evaluado en condiciones neutras (7.0) y condiciones alcalinas (9.3) mejorando la tasa de producción de hidrógeno en un 216 % al trabajar en medio alcalino alcanzando 2.6 L H_2 /L/d, aunque la CEM empleada fue de una sola cámara teniendo una sobreestimación de la E_C (110 %) muy probablemente producto de la oxidación del H_2 en el ánodo (Su *et al.*, 2016).

Muy probablemente a las condiciones alcalinas que se han trabajado el microorganismo exoelectrogénico predominante ya no es *Geobacter* sp. Se ha reportado que a un pH de 9.3 en la biopelícula electroactiva predomina *Geoalkalibacter* (Rago *et al.*, 2016). Estudios futuros tendrán que evaluar un control de pH en el ánodo durante la operación de los reactores, esto podría traducirse en una mejora del desempeño de la CEM al atenuar el efecto del gradiente de pH y brindar mayor estabilidad a los microorganismos exoelectrogénicos.

6.4 CONCLUSIONES

El potencial anódico es la variable que tiene un mayor impacto sobre el desempeño de los reactores CEM para la producción de hidrógeno. Los resultados obtenidos son prometedores ya que permiten aumentar de manera generalizada el desempeño de la CEM y no únicamente la producción de hidrógeno. La interacción entre el pH del anolito y el E_{an} son las más importantes dentro de la CEM ya que se presentan en la mayoría de las respuestas que se generaron para el sistema. E_{an} superiores a 0.55 V producen incertidumbre sobre el desempeño de la CEM e inestabilidad sobre la actividad de los microorganismos exoelectrogénicos. Aunque las máximas tasas de producción de H_2 se dan a E_{an} inferiores de 0.2 V y pH de 9.4 el desempeño de la CEM no es el mejor a esas condiciones. Las condiciones optimizadas obtenidas se encontraron en los siguientes rangos: para el $E_{an} = 0.2 - 0.3$ V, el pH del anolito entre 8.4 – 8.8 y la concentración del catolito de 110 a 150 mM de NaCl. Los microorganismos exoelectrogénicos tienen un mejor desempeño a pHs alcalinos y se desenvuelven mejor a potenciales anódicos de 0.2 V mejorando el desempeño de la CEM.

CAPÍTULO VII

CONCLUSIONES GENERALES

La evaluación de los factores que afectan el funcionamiento de la cámara anódica y catódica en celdas de electrólisis microbianas utilizadas para la producción de hidrógeno se llevó a cabo variando los parámetros operacionales. Se pudo mejorar el desempeño de los reactores CEM, encontrando que el pH alcalino en la cámara anódica permite aumentar el desempeño de los sistemas bioelectroquímicos. El potencial anódico tiene un efecto significativo sobre las bacterias exoelectrogénicas y si se someten a más de una variación éstas se ven inhibidas.

La estrategia de arranque en celdas de electrólisis microbiana se implementó lo cual permitió desarrollar una biopelícula donde predominaron los microorganismos exoelectrogénicos. La estrategia de arranque desarrollada consistió en variar los E_{an} al inicio de la operación de la CEM. La estrategia logró aumentar un 72 % la velocidad de producción de hidrógeno y obtener una biopelícula electroactiva robusta en 25 días. Durante esta etapa también fue evidente que los microorganismos exoelectrogénicos oxidan fácilmente el acetato un sustrato con una composición de 148 mg acetato/L presentó una tasa de producción de 582 mL H₂/L_{cat}/d, mientras que un sustrato con 302 mg acetato/L alcanzó los 973 mL H₂/L_{cat}/d. Por tanto, resulta importante que al momento de seleccionar un sustrato para alimentar una CEM para producción de hidrógeno éste contenga la mayor cantidad de acetato posible.

La biopelícula que se forma sobre la superficie del ánodo es la parte medular de un sistema bioelectroquímico y por tal motivo se determinó la robustez a variaciones de la concentración inicial de sustrato y del potencial anódico hallando que los microorganismos presentes en la biopelícula son sensibles a los cambios abruptos de éstos, provocando la inestabilidad de los reactores. Se concluye que al operar la CEM la concentración de sustrato inicial debe mantenerse con un mínimo de variaciones. El E_{an} únicamente debe ser variado como estrategia de arranque un debido a la sensibilidad de los microorganismos exoelectrogénicos que comprometen su electroactividad afectando el desempeño general del sistema. Debido a lo anterior es posible usar este parámetro para el control del proceso.

Finalmente, se analizó la interacción entre el pH del anolito, E_{an} y concentración del catolito, NaCl) para obtener las interacciones entre las variables y su efecto sobre los parámetros de respuesta de

la CEM para producción de hidrógeno. Se halló que el E_{an} es el que tiene un mayor efecto sobre el desempeño del sistema y que la interacción E_{an} -pH inicial del anolito es la que se observa en la mayoría de los parámetros de respuesta. Se determinó que la concentración de NaCl en el catolito no debe exceder los 175 mM ya que de lo contrario habrá un exceso de iones Cl^- que migrarán hacia el ánodo favoreciendo la acidificación de la cámara anódica.

En cuanto la hipótesis se mejoró el desempeño de la celda de electrólisis microbiana al establecer condiciones alcalinas y un potencial anódico positivo para la formación de la biopelícula electroactiva sobre la superficie del ánodo.

CAPÍTULO VIII

PERSPECTIVAS

Parece importante recalcar que las celdas de electrólisis microbianas aún son una tecnología reciente por lo que se requiere realizar más pruebas que permitan la completa comprensión de estos sistemas, un entendimiento que permita llevar a una aplicación real de esta tecnología. Entre las áreas de oportunidad que se pueden destacar se encuentran:

- Las relaciones área/volumen respecto a la superficie del ánodo y volumen de la cámara anódica, es importante encontrar la relación óptima de este parámetro para el diseño de futuros reactores piloto.
- Evaluar las concentraciones iniciales de sustrato para encontrar en que rangos se presentan las inhibiciones por exceso de materia orgánica. En el mismo sentido resulta importante diseñar una estrategia de aclimatación que permita aumentar la tolerancia de los microorganismos a concentraciones de sustrato más altas que las que ya se han reportado en la literatura.
- Evaluar las condiciones ya optimizadas, pero con sustratos reales para validarlas y poderlas implementar en arquitecturas optimizadas.
- Implementar controles de pH que busquen aumentar los rendimientos de hidrógeno y de remoción de materia orgánica a partir de la estabilización de las condiciones ambientales de la biopelícula electroactiva.
- Trabajar en arquitecturas de reactores CEM que reduzcan las resistencias internas y aumenten la transferencia de masa pensando en volúmenes de trabajo que se acerquen a un diseño escalable.
- Comparar la operación de reactores en continuo y en lote para seleccionar el mejor modo de operación para este tipo de sistemas.

PRODUCTOS

ARTÍCULOS

Cardeña, R., Moreno-Andrade I., y Buitrón, G. (2017). Improvement of the bioelectrochemical hydrogen production from food waste fermentation effluent by using a novel start-up strategy. *Journal of Chemical Technology y Biotechnology*. 93(3), 878-886.

Cardeña, R., Cercado-Quezada B., Buitrón, G. Robustness of electroactive biofilm for the hydrogen production in microbial electrolysis cells: substrate initial concentration and anodic potential perturbations. *Chemosphere*. (En preparación)

Cardeña, R. and Buitrón, G. Evaluation of anodic potential, anolyte pHs and catholyte concentration on the performance of two chamber microbial electrolysis cells. *Bioelectrochemistry*. (En preparación)

CAPÍTULOS EN LIBROS

Buitrón, G., **Cardeña, R.**, Arcila JS. (2018). Bioelectrosynthesis of methane integrated by anaerobic digestion. In *Microbial Electrochemical Technology: Platform for Fuels, Chemicals and Remediation (Elsevier)*. (En prensa)

Cardeña, R., Cercado-Quezada B., Buitrón, G. (2018). Microbial electrolysis cell for biohydrogen production. In *Biohydrogen 2nd Edition (Elsevier)* (En prensa)

CONGRESOS

Cardeña R., Marone A., Trably E., Latrille E. and Buitrón G. (24-26 de abril de 2015). *Effect of the electrodes and acetate concentration on hydrogen production by microbial electrolysis cell*. Presentación oral. Congreso de la IWA—4th Young Water Professionals México 2015. Guanajuato, México.

Cardeña R. y Buitrón, G. (26-28 de septiembre de 2016). *Effect of the applied voltage y the initial concentration on the MEC performances for H₂ production*. Formato póster. 3er European Meeting of the International Society for Microbial Electrochemistry y Technology. Roma, Italia.

Cardeña R. y Buitrón, G. (25-30 de junio de 2017). *Uso de efluentes acidogénicos para la producción de hidrógeno en celdas de electrólisis microbiana: Condiciones de operación*. Formato póster. XVII Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería. Pto. Vallarta, México.

Cardeña R., Valdez-Vazquez I, Buitrón G. (24-26 de mayo de 2017) Methane synthesis in microbial electrolysis cell with effluent from organic solid waste by dark-fermentation. Presentación oral. 5th Young Water Professionals Conference IWA-MEXICO. Morelia, Mexico.

René Cardeña, Isaac Monroy, Germán Buitrón. Comparación de variables estadísticamente significativas en el proceso de producción de hidrógeno en celdas de electrólisis microbianas. IV Reunión Nacional de la red Temática en Bioenergía, XIII de la Red Mexicana de Bioenergía. Cuernavaca, Morelos 13-15 de noviembre de 2017

Cardeña R., Moreno-Andrade I., Buitrón G. (16-21 de septiembre de 2018) Hydrogen production in microbial electrolysis cell using an acidogenic effluent from food waste fermentation. IWA World Water Congress & Exhibition 2018. Tokyo, Japón.

Cardeña R., Buitrón G. (21-24 de octubre de 2018) Methane electrosynthesis coupling microbial electrolysis cell with anaerobic digestion using vinasses. XIII Latin American Workshop and Symposium on Anaerobic Digestion (DAALXIII). Medellín, Colombia.

REFERENCIAS

- Aelterman, P., Freguia, S., Keller, J., Verstraete, W., Rabaey, K. (2008) *The anode potential regulates bacterial activity in microbial fuel cells. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **78**, 409–418.
- Ahn, Y. Logan, B.E. (2013) *Saline catholytes as alternatives to phosphate buffers in microbial fuel cells. Bioresour. Technol.*, **132**, 436–439.
- Ambler, J.R. Logan, B.E. (2011) *Evaluation of stainless steel cathodes and a bicarbonate buffer for hydrogen production in microbial electrolysis cells using a new method for measuring gas production. Int. J. Hydrog. Energy*, **36**, 160–166.
- Argun, H. Kargi, F. (2011) *Bio-hydrogen production by different operational modes of dark and photo-fermentation: An overview. Int. J. Hydrog. Energy*, **36**, 7443–7459.
- Badalamenti, J.P., Krajmalnik-Brown, R., Torres, C.I. (2013) *Generation of High Current Densities by Pure Cultures of Anode-Respiring Geoalkalibacter spp. under Alkaline and Saline Conditions in Microbial Electrochemical Cells. mBio*, **4**, e00144-13.
- Bakonyi, P., Buitrón, G., Valdez-Vazquez, I., Nemestóthy, N., Bélafi-Bakó, K. (2017) *A novel gas separation integrated membrane bioreactor to evaluate the impact of self-generated biogas recycling on continuous hydrogen fermentation. Appl. Energy*, **190**, 813–823.
- Bakonyi, P., Kumar, G., Koók, L., Tóth, G., Rózsenszki, T., Bélafi-Bakó, K., Nemestóthy, N. (2018) *Microbial electrohydrogenesis linked to dark fermentation as integrated application for enhanced biohydrogen production: A review on process characteristics, experiences and lessons. Bioresour. Technol.*, **251**, 381–389.
- Baranitharan, E., Khan, M.R., Yousuf, A., Teo, W.F.A., Tan, G.Y.A., Cheng, C.K. (2015) *Enhanced power generation using controlled inoculum from palm oil mill effluent fed microbial fuel cell. Fuel*, **143**, 72–79.
- Blasco-Gómez, R., Batlle-Vilanova, P., Villano, M., Balaguer, M.D., Colprim, J., Puig, S. (2017) *On the Edge of Research and Technological Application: A Critical Review of Electromethanogenesis. Int. J. Mol. Sci.*, **18**, 874.
- Boboescu, I.Z., Gherman, V.D., Lakatos, G., Pap, B., Bíró, T., Maróti, G. (2016) *Surpassing the current limitations of biohydrogen production systems: The case for a novel hybrid approach. Bioresour. Technol.*, **204**, 192–201.
- Borole, A.P., Hamilton, C.Y., Vishnivetskaya, T., Leak, D., Andras, C. (2009) *Improving power production in acetate-fed microbial fuel cells via enrichment of exoelectrogenic organisms in flow-through systems. Biochem. Eng. J.*, **48**, 71–80.
- Buitrón, G., Cercado B., Ruíz V. (2018) *Assesment of the performance parameters for effectively evaluating production in a microbial electrolysis cell (En prensa).*
- Busalmen, J.P., Esteve-Nuñez, A., Feliu, J.M. (2008) *Whole Cell Electrochemistry of Electricity-Producing Microorganisms Evidence an Adaptation for Optimal Exocellular Electron Transport. Environ. Sci. Technol.*, **42**, 2445–2450.
- Butti, S.K., Velvizhi, G., Sulonen, M.L.K., Haavisto, J.M., Oguz Koroglu, E., Yusuf Cetinkaya, A., et al. (2016) *Microbial electrochemical technologies with the perspective of harnessing bioenergy: Maneuvering towards upscaling. Renew. Sustain. Energy Rev.*, **53**, 462–476.
- Call, D. Logan, B.E. (2008) *Hydrogen Production in a Single Chamber Microbial Electrolysis Cell Lacking a Membrane. Environ. Sci. Technol.*, **42**, 3401–3406.

- Call, D.F., Merrill, M.D., Logan, B.E. (2009) *High Surface Area Stainless Steel Brushes as Cathodes in Microbial Electrolysis Cells. Environ. Sci. Technol.*, **43**, 2179–2183.
- Call, D.F., Wagner, R.C., Logan, B.E. (2009) *Hydrogen Production by Geobacter Species and a Mixed Consortium in a Microbial Electrolysis Cell. Appl. Environ. Microbiol.*, **75**, 7579–7587.
- Cardeña, R., Moreno, G., Valdez-Vazquez, I., Buitrón, G. (2015) *Optimization of volatile fatty acids concentration for photofermentative hydrogen production by a consortium. Int. J. Hydrog. Energy*, **40**, 17212–17223.
- Cardeña, R., Moreno-Andrade, I., Buitrón, G. (2018) *Improvement of the bioelectrochemical hydrogen production from food waste fermentation effluent using a novel start-up strategy. J. Chem. Technol. Biotechnol.*, **93**, 878–886.
- Carmona-Martínez, A.A., Harnisch, F., Kuhlicke, U., Neu, T.R., Schröder, U. (2013) *Electron transfer and biofilm formation of Shewanella putrefaciens as function of anode potential. Bioelectrochemistry*, **93**, 23–29.
- Carmona-Martínez, A.A., Pierra, M., Trably, E., Bernet, N. (2013) *High current density via direct electron transfer by the halophilic anode respiring bacterium Geoalkalibacter subterraneus. Phys. Chem. Chem. Phys.*, **15**, 19699–19707.
- Carmona-Martínez, A.A., Trably, E., Milferstedt, K., Lacroix, R., Etcheverry, L., Bernet, N. (2015) *Long-term continuous production of H₂ in a microbial electrolysis cell (MEC) treating saline wastewater. Water Res.*, **81**, 149–156.
- Cercado-Quezada, B., Delia, M., Bergel, A. (2010) *Testing various food-industry wastes for electricity production in microbial fuel cell. Bioresour. Technol.*, **101**, 2748–2754.
- Cercado, B., Cházaro-Ruiz, L.F., Ruiz, V., López-Prieto, I. de J., Buitrón, G., Razo-Flores E. (2013a) *Biotic and abiotic characterization of bioanodes formed on oxidized carbon electrodes as a basis to predict their performance. Biosens. Bioelectron.*, **50**, 373–381.
- Cercado, B., Byrne, N., Bertrand, M., Pocaznoi, D., Rimboud, M., Achouak, W., Bergel, A. (2013b) *Garden compost inoculum leads to microbial bioanodes with potential-independent characteristics. Bioresour. Technol.*, **134**, 276–284.
- Chae, K.-J., Choi, M.-J., Kim, K.-Y., Ajayi, F.F., Chang, I.-S., Kim, I.S. (2010) *Selective inhibition of methanogens for the improvement of biohydrogen production in microbial electrolysis cells. Int. J. Hydrog. Energy*, **35**, 13379–13386.
- Chae, K.-J., Choi, M.-J., Lee, J., Ajayi, F.F., Kim, I.S. (2008) *Biohydrogen production via biocatalyzed electrolysis in acetate-fed bioelectrochemical cells and microbial community analysis. Int. J. Hydrog. Energy*, **33**, 5184–5192.
- Cheng, S., Logan, B.E. (2008) *Evaluation of catalysts and membranes for high yield biohydrogen production via electrohydrogenesis in microbial electrolysis cells (MECs). Water Sci. Technol. J. Int. Assoc. Water Pollut. Res.*, **58**, 853–857.
- Cheng, S., Logan, B.E. (2011) *High hydrogen production rate of microbial electrolysis cell (MEC) with reduced electrode spacing. Bioresour. Technol.*, **102**, 3571–3574.
- Cheng, S., Logan, B.E. (2007) *Sustainable and efficient biohydrogen production via electrohydrogenesis. Proc. Natl. Acad. Sci.*, **104**, 18871–18873.
- Cheng, S., Xing, D., Call, D.F., Logan, B.E. (2009) *Direct Biological Conversion of Electrical Current into Methane by Electromethanogenesis. Environ. Sci. Technol.*, **43**, 3953–3958.
- Cho, E.J. y Ellington, A.D. (2007) *Optimization of the biological component of a bioelectrochemical cell. Bioelectrochemistry*, **70**, 165–172.

- Chookaew, T., Prasertsan, P., Ren, Z.J. (2014) *Two-stage conversion of crude glycerol to energy using dark fermentation linked with microbial fuel cell or microbial electrolysis cell*. *New Biotechnol.*, **31**, 179–184.
- Clauwaert, P. and Verstraete, W. (2008) *Methanogenesis in membraneless microbial electrolysis cells*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **82**, 829–836.
- Commault, A.S., Lear, G., Packer, M.A., Weld, R.J. (2013) *Influence of anode potentials on selection of Geobacter strains in microbial electrolysis cells*. *Bioresour. Technol.*, **139**, 226–234.
- CONAGUA (2016) *Atlas del agua en México 2016*.
- Cusick, R.D., Bryan, B., Parker, D.S., Merrill, M.D., Mehanna, M., Kiely, P.D., et al. (2011) *Performance of a pilot-scale continuous flow microbial electrolysis cell fed winery wastewater*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **89**, 2053–2063.
- Cusick, R.D., Kiely, P.D., Logan, B.E. (2010) *A monetary comparison of energy recovered from microbial fuel cells and microbial electrolysis cells fed winery or domestic wastewaters*. *Int. J. Hydrog. Energy*, **35**, 8855–8861.
- Das, D. Veziroglu, T.N. (2008) *Advances in biological hydrogen production processes*. *Int. J. Hydrog. Energy*, **33**, 6046–6057.
- Das, D. Veziroğlu, T.N. (2001) *Hydrogen production by biological processes: a survey of literature*. *Int. J. Hydrog. Energy*, **26**, 13–28.
- Diaz, A.B., Blandino, A., aCaro, I. (2018) *Value added products from fermentation of sugars derived from agro-food residues*. *Trends Food Sci. Technol.*, **71**, 52–64.
- Ditzig, J., Liu, H., Logan, B.E. (2007) *Production of hydrogen from domestic wastewater using a bioelectrochemically assisted microbial reactor (BEAMR)*. *Int. J. Hydrog. Energy*, **32**, 2296–2304.
- Dowd, S.E., Callaway, T.R., Wolcott, R.D., Sun, Y., McKeegan, T., Hagevoort, R.G., Edrington, T.S. (2008) *Evaluation of the bacterial diversity in the feces of cattle using 16S rDNA bacterial tag-encoded FLX amplicon pyrosequencing (bTEFAP)*. *BMC Microbiol.*, **8**, 125.
- Edgar, R.C. (2010) *Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST*. *Bioinformatics*, **26**, 2460–2461.
- Edgar, R.C. (2013) *UPARSE: highly accurate OTU sequences from microbial amplicon reads*. *Nat. Methods*, **10**, 996–998.
- Edgar, R.C., Haas, B.J., Clemente, J.C., Quince, C., and Knight, R. (2011) *UCHIME improves sensitivity and speed of chimera detection*. *Bioinformatics*, **27**, 2194–2200.
- El-Naggar, M.Y., Wanger, G., Leung, K.M., Yuzvinsky, T.D., Southam, G., Yang, J., et al. (2010) *Electrical transport along bacterial nanowires from Shewanella oneidensis MR-1*. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **107**, 18127–18131.
- Erbale, B., Féron, D., Bergel, A. (2012) *Microbial Catalysis of the Oxygen Reduction Reaction for Microbial Fuel Cells: A Review*. *ChemSusChem*, **5**, 975–987.
- Escapa, A., Manuel, M.-F., Morán, A., Gómez, X., Guiot, S.R., Tartakovsky, B. (2009) *Hydrogen Production from Glycerol in a Membraneless Microbial Electrolysis Cell*. *Energy Fuels*, **23**, 4612–4618.
- Escapa, A., Mateos, R., Martínez, E.J., Blanes, J. (2016) *Microbial electrolysis cells: An emerging technology for wastewater treatment and energy recovery. From laboratory to pilot plant and beyond*. *Renew. Sustain. Energy Rev.*, **55**, 942–956.
- Fan, Y., Hu, H., Liu, H. (2007) *Sustainable Power Generation in Microbial Fuel Cells Using Bicarbonate Buffer and Proton Transfer Mechanisms*. *Environ. Sci. Technol.*, **41**, 8154–8158.

- Fascetti, E., D'Addario, E., Todini, O., Robertiello, A. (1998) *Photosynthetic hydrogen evolution with volatile organic acids derived from the fermentation of source selected municipal solid wastes*. *Int. J. Hydrog. Energy*, **23**, 753–760.
- Finkelstein, D.A., Tender, L.M., Zeikus, J.G. (2006) *Effect of Electrode Potential on Electrode-Reducing Microbiota*. *Environ. Sci. Technol.*, **40**, 6990–6995.
- Flemming, H.-C. Wingender, J. (2010) *The biofilm matrix*. *Nat. Rev. Microbiol.*, **8**, 623–633.
- Freguia, S., Rabaey, K., Yuan, Z., Keller, J. (2007) *Non-catalyzed cathodic oxygen reduction at graphite granules in microbial fuel cells*. *Electrochimica Acta*, **53**, 598–603.
- Gao, Y., Ryu, H., Santo Domingo, J.W., Lee, H.-S. (2014) *Syntrophic interactions between H₂-scavenging and anode-respiring bacteria can improve current density in microbial electrochemical cells*. *Bioresour. Technol.*, **153**, 245–253.
- Gavala, H.N., Skiadas, I.V., Ahring, B.K. (2006) *Biological hydrogen production in suspended and attached growth anaerobic reactor systems*. *Int. J. Hydrog. Energy*, **31**, 1164–1175.
- Geelhoed, J.S., Hamelers, H.V., Stams, A.J. (2010) *Electricity-mediated biological hydrogen production*. *Curr. Opin. Microbiol.*, **13**, 307–315.
- Ghimire, A., Frunzo, L., Pirozzi, F., Trably, E., Escudie, R., Lens, P.N.L., Esposito, G. (2015) *A review on dark fermentative biohydrogen production from organic biomass: Process parameters and use of by-products*. *Appl. Energy*, **144**, 73–95.
- Gil, G.-C., Chang, I.-S., Kim, B.H., Kim, M., Jang, J.-K., Park, H.S., Kim, H.J. (2003) *Operational parameters affecting the performance of a mediator-less microbial fuel cell*. *Biosens. Bioelectron.*, **18**, 327–334.
- Gómez, X., Fernández, C., Fierro, J., Sánchez, M.E., Escapa, A., Morán, A. (2011) *Hydrogen production: Two stage processes for waste degradation*. *Bioresour. Technol.*, **102**, 8621–8627.
- Gorby, Y.A., Yanina, S., McLean, J.S., Rosso, K.M., Moyles, D., Dohnalkova, A., et al. (2006) *Electrically conductive bacterial nanowires produced by *Shewanella oneidensis* strain MR-1 and other microorganisms*. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **103**, 11358–11363.
- Guevara-López, E. Buitrón, G. (2015) *Evaluation of different support materials used with a photo-fermentative consortium for hydrogen production*. *Int. J. Hydrog. Energy*, **40**, 17231–17238.
- Guo, X., Liu, J., Xiao, B. (2013) *Bioelectrochemical enhancement of hydrogen and methane production from the anaerobic digestion of sewage sludge in single-chamber membrane-free microbial electrolysis cells*. *Int. J. Hydrog. Energy*, **38**, 1342–1347.
- Guwy, A.J., Dinsdale, R.M., Kim, J.R., Massanet-Nicolau, J., Premier, G. (2011) *Fermentative biohydrogen production systems integration*. *Bioresour. Technol.*, **102**, 8534–8542.
- Hallenbeck, P.C. Ghosh, D. (2009) *Advances in fermentative biohydrogen production: the way forward?* *Trends Biotechnol.*, **27**, 287–297.
- Harnisch, F., Sievers, G., Schröder, U. (2009) *Tungsten carbide as electrocatalyst for the hydrogen evolution reaction in pH neutral electrolyte solutions*. *Appl. Catal. B Environ.*, **89**, 455–458.
- Hasany, M., Mardanpour, M.M., Yaghmaei, S. (2016) *Biocatalysts in microbial electrolysis cells: A review*. *Int. J. Hydrog. Energy*, **41**, 1477–1493.
- He, Z., Huang, Y., Manohar, A.K., Mansfeld, F. (2008) *Effect of electrolyte pH on the rate of the anodic and cathodic reactions in an air-cathode microbial fuel cell*. *Bioelectrochemistry*, **74**, 78–82.
- Heidrich, E.S., Edwards, S.R., Dolfing, J., Cotterill, S.E., Curtis, T.P. (2014) *Performance of a pilot scale microbial electrolysis cell fed on domestic wastewater at ambient temperatures for a 12 month period*. *Bioresour. Technol.*, **173**, 87–95.

- Holladay, J.D., Hu, J., King, D.L., Wang, Y. (2009) *An overview of hydrogen production technologies. Catal. Today*, **139**, 244–260.
- Horiuchi, J.-I., Shimizu, T., Tada, K., Kanno, T., Kobayashi, M. (2002) *Selective production of organic acids in anaerobic acid reactor by pH control. Bioresour. Technol.*, **82**, 209–213.
- Hu, H., Fan, Y., Liu, H. (2009) *Hydrogen production in single-chamber tubular microbial electrolysis cells using non-precious-metal catalysts. Int. J. Hydrog. Energy*, **34**, 8535–8542.
- Hu, H., Fan, Y., Liu, H. (2008) *Hydrogen production using single-chamber membrane-free microbial electrolysis cells. Water Res.*, **42**, 4172–4178.
- Huang, Y.-X., Liu, X.-W., Sun, X.-F., Sheng, G.-P., Zhang, Y.-Y., Yan, G.-M., et al. (2011) *A new cathodic electrode deposit with palladium nanoparticles for cost-effective hydrogen production in a microbial electrolysis cell. Int. J. Hydrog. Energy*, **36**, 2773–2776.
- Hussy, I., Hawkes, F.R., Dinsdale, R., Hawkes, D.L. (2005) *Continuous fermentative hydrogen production from sucrose and sugarbeet. Int. J. Hydrog. Energy*, **30**, 471–483.
- Jeremiasse, A.W., Hamelers, H.V.M., Buisman, C.J.N. (2010a) *Microbial electrolysis cell with a microbial biocathode. Bioelectrochemistry*, **78**, 39–43.
- Jeremiasse, A.W., Hamelers, H.V.M., Saakes, M., Buisman, C.J.N. (2010b) *Ni foam cathode enables high volumetric H₂ production in a microbial electrolysis cell. Int. J. Hydrog. Energy*, **35**, 12716–12723.
- Jiao, Y., Kappler, A., Croal, L.R., Newman, D.K. (2005) *Isolation and Characterization of a Genetically Tractable Photoautotrophic Fe(II)-Oxidizing Bacterium, Rhodospseudomonas palustris Strain TIE-1. Appl. Environ. Microbiol.*, **71**, 4487–4496.
- Kadier, A., Kalil, M.S., Abdeshahian, P., Chandrasekhar, K., Mohamed, A., Azman, N.F., et al. (2016) *Recent advances and emerging challenges in microbial electrolysis cells (MECs) for microbial production of hydrogen and value-added chemicals. Renew. Sustain. Energy Rev.*, **61**, 501–525.
- Kadier, A., Simayi, Y., Kalil, M.S., Abdeshahian, P., Hamid, A.A. (2014) *A review of the substrates used in microbial electrolysis cells (MECs) for producing sustainable and clean hydrogen gas. Renew. Energy*, **71**, 466–472.
- Katuri, K.P., Rengaraj, S., Kavanagh, P., O’Flaherty, V., Leech, D. (2012) *Charge Transport through Geobacter sulfurreducens Biofilms Grown on Graphite Rods. Langmuir*, **28**, 7904–7913.
- Khanal, S.K., Chen, W.-H., Li, L., Sung, S. (2004) *Biological hydrogen production: effects of pH and intermediate products. Int. J. Hydrog. Energy*, **29**, 1123–1131.
- Khater, D.Z., El-Khatib, K.M., Hassan, H.M. (2017) *Microbial diversity structure in acetate single chamber microbial fuel cell for electricity generation. J. Genet. Eng. Biotechnol.*, **15**, 127–137.
- Kiely, Patrick D., Cusick, R., Call, D.F., Selembo, P.A., Regan, J.M., Logan, B.E. (2011a) *Anode microbial communities produced by changing from microbial fuel cell to microbial electrolysis cell operation using two different wastewaters. Bioresour. Technol.*, **102**, 388–394.
- Kiely, Patrick D., Rader, G., Regan, J.M., Logan, B.E. (2011b) *Long-term cathode performance and the microbial communities that develop in microbial fuel cells fed different fermentation endproducts. Bioresour. Technol.*, **102**, 361–366.
- Kiely, Patrick D., Regan, J.M., Logan, B.E. (2011c) *The electric picnic: synergistic requirements for exoelectrogenic microbial communities. Curr. Opin. Biotechnol.*, **22**, 378–385.
- Kim, J.R., Cheng, S., Oh, S.-E., Logan, B.E. (2007) *Power Generation Using Different Cation, Anion, and Ultrafiltration Membranes in Microbial Fuel Cells. Environ. Sci. Technol.*, **41**, 1004–1009.
- Kinoshita, D.K. (1992) *Electrochemical Oxygen Technology*. John Wiley & Sons.

- Kita, A., Miura, T., Okamura, Y., Aki, T., Matsumura, Y., Tajima, T., et al. (2015) *Dysgonomonas alginatilytica* sp. nov., an alginate-degrading bacterium isolated from a microbial consortium. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **65**, 3570–3575.
- Kumar, A., Katuri, K., Lens, P., Leech, D. (2012) Does bioelectrochemical cell configuration and anode potential affect biofilm response? *Biochem. Soc. Trans.*, **40**, 1308–1314.
- Kumar, A., Siggins, A., Katuri, K., Mahony, T., O’Flaherty, V., Lens, P., Leech, D. (2013) Catalytic response of microbial biofilms grown under fixed anode potentials depends on electrochemical cell configuration. *Chem. Eng. J.*, **230**, 532–536.
- Kumar, G., Bakonyi, P., Kobayashi, T., Xu, K.-Q., Sivagurunathan, P., Kim, S.-H., et al. (2016) Enhancement of biofuel production via microbial augmentation: The case of dark fermentative hydrogen. *Renew. Sustain. Energy Rev.*, **57**, 879–891.
- Kumar, G., Bakonyi, P., Zhen, G., Sivagurunathan, P., Koók, L., Kim, S.-H., et al. (2017) Microbial electrochemical systems for sustainable biohydrogen production: Surveying the experiences from a start-up viewpoint. *Renew. Sustain. Energy Rev.*, **70**, 589–597.
- Kumar, G., Shobana, S., Nagarajan, D., Lee, D.-J., Lee, K.-S., Lin, C.-Y., et al. (2018) Biomass based hydrogen production by dark fermentation—recent trends and opportunities for greener processes. *Curr. Opin. Biotechnol.*, **50**, 136–145.
- Kundu, A., Sahu, J.N., Redzwan, G., and Hashim, M.A. (2013) An overview of cathode material and catalysts suitable for generating hydrogen in microbial electrolysis cell. *Int. J. Hydrog. Energy*, **38**, 1745–1757.
- Kyazze, G., Popov, A., Dinsdale, R., Esteves, S., Hawkes, F., Premier, G., Guwy, A. (2010) Influence of catholyte pH and temperature on hydrogen production from acetate using a two chamber concentric tubular microbial electrolysis cell. *Int. J. Hydrog. Energy*, **35**, 7716–7722.
- Lalaurette, E., Thammannagowda, S., Mohagheghi, A., Maness, P.-C., Logan, B.E. (2009) Hydrogen production from cellulose in a two-stage process combining fermentation and electrohydrogenesis. *Int. J. Hydrog. Energy*, **34**, 6201–6210.
- Lay, J.-J., Lee, Y.-J., and Noike, T. (1999) Feasibility of biological hydrogen production from organic fraction of municipal solid waste. *Water Res.*, **33**, 2579–2586.
- Lee, H.-S. and Rittmann, B.E. (2010) Characterization of energy losses in an upflow single-chamber microbial electrolysis cell. *Int. J. Hydrog. Energy*, **35**, 920–927.
- Lee, H.-S., Salerno, M.B., and Rittmann, B.E. (2008) Thermodynamic Evaluation on H₂ Production in Glucose Fermentation. *Environ. Sci. Technol.*, **42**, 2401–2407.
- Lee, H.-S., Torres, C.I., Parameswaran, P., and Rittmann, B.E. (2009) Fate of H₂ in an Upflow Single-Chamber Microbial Electrolysis Cell Using a Metal-Catalyst-Free Cathode. *Environ. Sci. Technol.*, **43**, 7971–7976.
- Li, F., Sharma, Y., Lei, Y., Li, B., Zhou, Q. (2009) *Microbial Fuel Cells: The Effects of Configurations, Electrolyte Solutions, and Electrode Materials on Power Generation*. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, **160**, 168–181.
- Li, X.-H., Liang, D.-W., Bai, Y.-X., Fan, Y.-T., Hou, H.-W. (2014) Enhanced H₂ production from corn stalk by integrating dark fermentation and single chamber microbial electrolysis cells with double anode arrangement. *Int. J. Hydrog. Energy*, **39**, 8977–8982.
- Li, X.M., Cheng, K.Y., Selvam, A., and Wong, J.W.C. (2013) Bioelectricity production from acidic food waste leachate using microbial fuel cells: Effect of microbial inocula. *Process Biochem.*, **48**, 283–288.

- Liang, D.-W., Peng, S.-K., Lu, S.-F., Liu, Y.-Y., Lan, F., Xiang, Y. (2011) *Enhancement of hydrogen production in a single chamber microbial electrolysis cell through anode arrangement optimization. Bioresour. Technol.*, **102**, 10881–10885.
- Lin, C.Y. and Lay, C.H. (2005) *A nutrient formulation for fermentative hydrogen production using anaerobic sewage sludge microflora. Int. J. Hydrog. Energy*, **30**, 285–292.
- Liu, H., Grot, S., Logan, B.E. (2005) *Electrochemically Assisted Microbial Production of Hydrogen from Acetate. Environ. Sci. Technol.*, **39**, 4317–4320.
- Liu, H. and Hu, H. (2012) *Microbial Electrolysis: Novel Biotechnology for Hydrogen Production from Biomass*. In: *Microbial Technologies in Advanced Biofuels Production* (Hallenbeck, P.C., ed), pp. 93–105. Springer US.
- Liu, Hong, Hu, H., Chignell, J., Fan, Y. (2010) *Microbial electrolysis: novel technology for hydrogen production from biomass. Biofuels*, **1**, 129–142.
- Liu, Huan, Matsuda, S., Kato, S., Hashimoto, K., Nakanishi, S. (2010) *Redox-Responsive Switching in Bacterial Respiratory Pathways Involving Extracellular Electron Transfer. ChemSusChem*, **3**, 1253–1256.
- Liu, H., Matsuda, S., Kawai, T., Hashimoto, K., Nakanishi, S. (2011) *Feedback stabilization involving redox states of c-type cytochromes in living bacteria. Chem. Commun.*, **47**, 3870–3872.
- Liu, J., Qiao, Y., Guo, C.X., Lim, S., Song, H., Li, C.M. (2012) *Graphene/carbon cloth anode for high-performance mediatorless microbial fuel cells. Bioresour. Technol.*, **114**, 275–280.
- Liu, W., Wang, A., Cheng, S., Logan, B.E., Yu, H., Deng, Y., et al. (2010) *GeoChip-Based Functional Gene Analysis of Anodophilic Communities in Microbial Electrolysis Cells under Different Operational Modes. Environ. Sci. Technol.*, **44**, 7729–7735.
- Liu, Y.-P., Wang, Y.-H., Wang, B.-S., Chen, Q.-Y. (2014) *Effect of anolyte pH and cathode Pt loading on electricity and hydrogen co-production performance of the bio-electrochemical system. Int. J. Hydrog. Energy*, **39**, 14191–14195.
- Logan, B.E., Call, D., Cheng, S., Hamelers, H.V.M., Sleutels, T.H.J.A., Jeremiassen, A.W., Rozendal, R.A. (2008) *Microbial Electrolysis Cells for High Yield Hydrogen Gas Production from Organic Matter. Environ. Sci. Technol.*, **42**, 8630–8640.
- Lohner, S. (2014) *Bioelectrochemical Hydrogen Production*. In: *Encyclopedia of Applied Electrochemistry* (Kreysa, G., Ota, K., and Savinell, R.F., eds), pp. 115–120. Springer New York.
- Lovley, D.R. (2006) *Bug juice: harvesting electricity with microorganisms. Nat. Rev. Microbiol.*, **4**, 497–508.
- Lovley, D.R., Giovannoni, S.J., White, D.C., Champine, J.E., Phillips, E.J.P., Gorby, Y.A., Goodwin, S. (1993) *Geobacter metallireducens* gen. nov. sp. nov., a microorganism capable of coupling the complete oxidation of organic compounds to the reduction of iron and other metals. *Arch. Microbiol.*, **159**, 336–344.
- Lovley, D.R., Ueki, T., Zhang, T., Malvankar, N.S., Shrestha, P.M., Flanagan, K.A., et al. (2011) *Geobacter: The Microbe Electric's Physiology, Ecology, and Practical Applications*. In: *Advances in Microbial Physiology* Advances in Microbial Physiology (Poole, R.K., ed), pp. 1–100. Academic Press.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J. (1951) *Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent. J. Biol. Chem.*, **193**, 265–275.
- Lu, L., Ren, N., Xing, D., Logan, B.E. (2009) *Hydrogen production with effluent from an ethanol-H₂-coproducing fermentation reactor using a single-chamber microbial electrolysis cell. Biosens. Bioelectron.*, **24**, 3055–3060.

- Lu, L. Ren, Z.J. (2016) *Microbial electrolysis cells for waste biorefinery: A state of the art review. Bioresour. Technol.*, **215**, 254–264.
- Manuel, M.-F., Neburchilov, V., Wang, H., Guiot, S.R., Tartakovsky, B. (2010) *Hydrogen production in a microbial electrolysis cell with nickel-based gas diffusion cathodes. J. Power Sources*, **195**, 5514–5519.
- Marone, A., Ayala-Campos, O.R., Trably, E., Carmona-Martínez, A.A., Moscoviz, R., Latrille, E., et al. (2017) *Coupling dark fermentation and microbial electrolysis to enhance bio-hydrogen production from agro-industrial wastewaters and by-products in a bio-refinery framework. Int. J. Hydrog. Energy*, **42**, 1609–1621.
- Meher Kotay, S. Das, D. (2008) *Biohydrogen as a renewable energy resource—Prospects and potentials. Int. J. Hydrog. Energy*, **33**, 258–263.
- Miceli, J.F., Parameswaran, P., Kang, D.-W., Krajmalnik-Brown, R., Torres, C.I. (2012) *Enrichment and Analysis of Anode-Respiring Bacteria from Diverse Anaerobic Inocula. Environ. Sci. Technol.*, **46**, 10349–10355.
- Miyahara, M., Kouzuma, A., Watanabe, K. (2015) *Effects of NaCl concentration on anode microbes in microbial fuel cells. AMB Express*, **5**, 34.
- Moreno-Andrade, I., Carrillo-Reyes, J., Santiago, S.G., Bujanos-Adame, M.C. (2015) *Biohydrogen from food waste in a discontinuous process: Effect of HRT and microbial community analysis. Int. J. Hydrog. Energy*, **40**, 17246–17252.
- Müller, N., Worm, P., Schink, B., Stams, A.J.M., Plugge, C.M. (2010) *Syntrophic butyrate and propionate oxidation processes: from genomes to reaction mechanisms. Environ. Microbiol. Rep.*, **2**, 489–499.
- Munoz, L.D., Erable, B., Etcheverry, L., Riess, J., Basséguy, R., Bergel, A. (2010) *Combining phosphate species and stainless steel cathode to enhance hydrogen evolution in microbial electrolysis cell (MEC). Electrochem. Commun.*, **12**, 183–186.
- Myers, R.H., Montgomery, D.C., Anderson-Cook, C.M. (2009) *Response Surface Methodology: Process and Product Optimization Using Designed Experiments*, 3 edition. Hoboken, N.J.: Wiley.
- Nam, J.-Y., Kim, H.-W., Lim, K.-H., Shin, H.-S., Logan, B.E. (2010) *Variation of power generation at different buffer types and conductivities in single chamber microbial fuel cells. Biosens. Bioelectron.*, **25**, 1155–1159.
- Nam, J.-Y. Logan, B.E. (2011) *Enhanced hydrogen generation using a saline catholyte in a two chamber microbial electrolysis cell. Int. J. Hydrog. Energy*, **36**, 15105–15110.
- Nam, J.-Y. Logan, B.E. (2012) *Optimization of catholyte concentration and anolyte pHs in two chamber microbial electrolysis cells. Int. J. Hydrog. Energy*, **37**, 18622–18628.
- Nam, J.-Y., Tokash, J.C., Logan, B.E. (2011) *Comparison of microbial electrolysis cells operated with added voltage or by setting the anode potential. Int. J. Hydrog. Energy*, **36**, 10550–10556.
- Nevin, K.P., Zhang, P., Franks, A.E., Woodard, T.L., Lovley, D.R. (2011) *Anaerobes unleashed: Aerobic fuel cells of Geobacter sulfurreducens. J. Power Sources*, **196**, 7514–7518.
- Ntaikou, I., Antonopoulou, G., and Lyberatos, G. (2010) *Biohydrogen Production from Biomass and Wastes via Dark Fermentation: A Review. Waste Biomass Valorization*, **1**, 21–39.
- Oh, S. Logan, B.E. (2005) *Hydrogen and electricity production from a food processing wastewater using fermentation and microbial fuel cell technologies. Water Res.*, **39**, 4673–4682.
- Oren, A. (2014) *The Family <Emphasis Type="Italic">Rhodocyclaceae</Emphasis>. In: The Prokaryotes*, pp. 975–998. Springer, Berlin, Heidelberg.

- Parameswaran, P., Torres, C.I., Lee, H.-S., Rittmann, B.E., Krajmalnik-Brown, R. (2011) *Hydrogen consumption in microbial electrochemical systems (MXCs): The role of homo-acetogenic bacteria*. *Bioresour. Technol.*, **102**, 263–271.
- Parameswaran, P., Zhang, H., Torres, C.I., Rittmann, B.E., Krajmalnik-Brown, R. (2010) *Microbial community structure in a biofilm anode fed with a fermentable substrate: The significance of hydrogen scavengers*. *Biotechnol. Bioeng.*, **105**, 69–78.
- Parkhey, P. Gupta, P. (2017) *Improvisations in structural features of microbial electrolytic cell and process parameters of electrohydrogenesis for efficient biohydrogen production: a review*. *Renew. Sustain. Energy Rev.*, **69**, 1085–1099.
- Pfennig, N. (1978) *Rhodocyclus purpureus gen. nov. and sp. nov., a Ring-Shaped, Vitamin B12-Requiring Member of the Family Rhodospirillaceae*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **28**, 283–288.
- Pierra, M., Carmona-Martínez, A.A., Trably, E., Godon, J.-J., Bernet, N. (2015) *Specific and efficient electrochemical selection of Geoalkalibacter subterraneus and Desulfuromonas acetoxidans in high current-producing biofilms*. *Bioelectrochemistry*, **106**, 221–225.
- Rabaey, K., Boon, N., Höfte, M., Verstraete, W. (2005) *Microbial Phenazine Production Enhances Electron Transfer in Biofuel Cells*. *Environ. Sci. Technol.*, **39**, 3401–3408.
- Rader, G.K. Logan, B.E. (2010) *Multi-electrode continuous flow microbial electrolysis cell for biogas production from acetate*. *Int. J. Hydrog. Energy*, **35**, 8848–8854.
- Rago, L., Baeza, J.A., Guisasola, A. (2016) *Increased performance of hydrogen production in microbial electrolysis cells under alkaline conditions*. *Bioelectrochemistry*, **109**, 57–62.
- Ramos, C., Buitrón, G., Moreno-Andrade, I., Chamy, R. (2012) *Effect of the initial total solids concentration and initial pH on the bio-hydrogen production from cafeteria food waste*. *Int. J. Hydrog. Energy*, **37**, 13288–13295.
- Reguera, G., McCarthy, K.D., Mehta, T., Nicoll, J.S., Tuominen, M.T., Lovley, D.R. (2005) *Extracellular electron transfer via microbial nanowires*. *Nature*, **435**, 1098–1101.
- Ren, N., Li, J., Li, B., Wang, Y., Liu, S. (2006) *Biohydrogen production from molasses by anaerobic fermentation with a pilot-scale bioreactor system*. *Int. J. Hydrog. Energy*, **31**, 2147–2157.
- Ribot-Llobet, E., Nam, J.-Y., Tokash, J.C., Guisasola, A., Logan, B.E. (2013) *Assessment of four different cathode materials at different initial pHs using unbuffered catholytes in microbial electrolysis cells*. *Int. J. Hydrog. Energy*, **38**, 2951–2956.
- Rivera, I., Buitrón, G., Bakonyi, P., Nemestóthy, N., Bélafi-Bakó, K. (2015) *Hydrogen production in a microbial electrolysis cell fed with a dark fermentation effluent*. *J. Appl. Electrochem.*, **45**, 1223–1229.
- Röling, W.F.M. (2014) *The Family Geobacteraceae*. 157–172.
- Rozendal, R.A., Hamelers, H.V.M., Buisman, C.J.N. (2006) *Effects of Membrane Cation Transport on pH and Microbial Fuel Cell Performance†*. *Environ. Sci. Technol.*, **40**, 5206–5211.
- Rozendal, R.A., Hamelers, H.V.M., Euverink, G.J.W., Metz, S.J., and Buisman, C.J.N. (2006) *Principle and perspectives of hydrogen production through biocatalyzed electrolysis*. *Int. J. Hydrog. Energy*, **31**, 1632–1640.
- Rozendal, R.A., Hamelers, H.V.M., Molenkamp, R.J., Buisman, C.J.N. (2007) *Performance of single chamber biocatalyzed electrolysis with different types of ion exchange membranes*. *Water Res.*, **41**, 1984–1994.
- Rozendal, R.A., Jeremiasse, A.W., Hamelers, H.V.M., Buisman, C.J.N. (2008) *Hydrogen Production with a Microbial Biocathode*. *Environ. Sci. Technol.*, **42**, 629–634.

- Ruiz, V., Ilhan, Z.E., Kang, D.-W., Krajmalnik-Brown, R., Buitrón, G. (2014) *The source of inoculum plays a defining role in the development of MEC microbial consortia fed with acetic and propionic acid mixtures. J. Biotechnol.*, **182–183**, 11–18.
- Ruiz Yolanda, Baeza Juan A., Guisasola Albert (2014) *Enhanced Performance of Bioelectrochemical Hydrogen Production using a pH Control Strategy. ChemSusChem*, **8**, 389–397.
- Schröder, U. (2007) *Anodic electron transfer mechanisms in microbial fuel cells and their energy efficiency. Phys. Chem. Chem. Phys.*, **9**, 2619–2629.
- Schroeder, U. Harnisch, F. (2014) *Biofilms, Electroactive*. In: *Encyclopedia of Applied Electrochemistry* (Kreysa, G., Ota, K., and Savinell, R.F., eds), pp. 120–126. Springer New York.
- Schultz, J.E. Breznak, J.A. (1979) *Cross-Feeding of Lactate Between Streptococcus lactis and Bacteroides sp. Isolated from Termite Hindguts. Appl. Environ. Microbiol.*, **37**, 1206–1210.
- Selembo, P.A., Merrill, M.D., Logan, B.E. (2009) *The use of stainless steel and nickel alloys as low-cost cathodes in microbial electrolysis cells. J. Power Sources*, **190**, 271–278.
- Selembo, P.A., Perez, J.M., Lloyd, W.A., Logan, B.E. (2009) *High hydrogen production from glycerol or glucose by electrohydrogenesis using microbial electrolysis cells. Int. J. Hydrog. Energy*, **34**, 5373–5381.
- Shin, H.-S., Youn, J.-H., Kim, S.-H. (2004) *Hydrogen production from food waste in anaerobic mesophilic and thermophilic acidogenesis. Int. J. Hydrog. Energy*, **29**, 1355–1363.
- Sleutels, T.H.J.A., Darus, L., Hamelers, H.V.M., Buisman, C.J.N. (2011) *Effect of operational parameters on Coulombic efficiency in bioelectrochemical systems. Bioresour. Technol.*, **102**, 11172–11176.
- Speers, A.M. Reguera, G. (2012) *Electron Donors Supporting Growth and Electroactivity of Geobacter sulfurreducens Anode Biofilms. Appl. Environ. Microbiol.*, **78**, 437–444.
- Su, M., Wei, L., Qiu, Z., Wang, G., Shen, J. (2016) *Hydrogen production in single chamber microbial electrolysis cells with stainless steel fiber felt cathodes. J. Power Sources*, **301**, 29–34.
- Sun, Y., Wei, J., Liang, P., Huang, X. (2011) *Electricity generation and microbial community changes in microbial fuel cells packed with different anodic materials. Bioresour. Technol.*, **102**, 10886–10891.
- Tao, Y., Chen, Y., Wu, Y., He, Y., Zhou, Z. (2007) *High hydrogen yield from a two-step process of dark- and photo-fermentation of sucrose. Int. J. Hydrog. Energy*, **32**, 200–206.
- Tartakovsky, B., Manuel, M.-F., Wang, H., Guiot, S.R. (2009) *High rate membrane-less microbial electrolysis cell for continuous hydrogen production. Int. J. Hydrog. Energy*, **34**, 672–677.
- Tartakovsky, B., Mehta, P., Santoyo, G., Guiot, S.R. (2011) *Maximizing hydrogen production in a microbial electrolysis cell by real-time optimization of applied voltage. Int. J. Hydrog. Energy*, **36**, 10557–10564.
- Tenca, A., Cusick, R.D., Schievano, A., Oberti, R., Logan, B.E. (2013) *Evaluation of low cost cathode materials for treatment of industrial and food processing wastewater using microbial electrolysis cells. Int. J. Hydrog. Energy*, **38**, 1859–1865.
- Thrash, J.C., Ahmadi, S., Torok, T., Coates, J.D. (2010) *Magnetospirillum bellicus sp. nov., a Novel Dissimilatory Perchlorate-Reducing Alphaproteobacterium Isolated from a Bioelectrical Reactor. Appl. Environ. Microbiol.*, **76**, 4730–4737.
- Tokash, J.C. Logan, B.E. (2011) *Electrochemical evaluation of molybdenum disulfide as a catalyst for hydrogen evolution in microbial electrolysis cells. Int. J. Hydrog. Energy*, **36**, 9439–9445.
- Torres, C.I., Kato Marcus, A., Rittmann, B.E. (2008) *Proton transport inside the biofilm limits electrical current generation by anode-respiring bacteria. Biotechnol. Bioeng.*, **100**, 872–881.

- Torres, C.I., Krajmalnik-Brown, R., Parameswaran, P., Marcus, A.K., Wanger, G., Gorby, Y.A., Rittmann, B.E. (2009) *Selecting Anode-Respiring Bacteria Based on Anode Potential: Phylogenetic, Electrochemical, and Microscopic Characterization*. *Environ. Sci. Technol.*, **43**, 9519–9524.
- Torres, C.I., Marcus, A.K., Lee, H.-S., Parameswaran, P., Krajmalnik-Brown, R., Rittmann, B.E. (2010) *A kinetic perspective on extracellular electron transfer by anode-respiring bacteria*. *FEMS Microbiol. Rev.*, **34**, 3–17.
- Turon, V., Trably, E., Fouilland, E., Steyer, J.-P. (2016) *Potentialities of dark fermentation effluents as substrates for microalgae growth: A review*. *Process Biochem.*, **51**, 1843–1854.
- Venkata Mohan, S. and Lenin Babu, M. (2011) *Dehydrogenase activity in association with poised potential during biohydrogen production in single chamber microbial electrolysis cell*. *Bioresour. Technol.*, **102**, 8457–8465.
- Venkata Mohan, S., Nikhil, G.N., Chiranjeevi, P., Nagendranatha Reddy, C., Rohit, M.V., Kumar, A.N., Sarkar, O. (2016) *Waste biorefinery models towards sustainable circular bioeconomy: Critical review and future perspectives*. *Bioresour. Technol.*, **215**, 2–12.
- Venkata Mohan, S., Velvizhi, G., Vamshi Krishna, K., Lenin Babu, M. (2014) *Microbial catalyzed electrochemical systems: A bio-factory with multi-facet applications*. *Bioresour. Technol.*, **165**, 355–364.
- Verea, L., Savadogo, O., Verde, A., Campos, J., Ginez, F., Sebastian, P.J. (2014) *Performance of a microbial electrolysis cell (MEC) for hydrogen production with a new process for the biofilm formation*. *Int. J. Hydrog. Energy*, **39**, 8938–8946.
- Villano, M., Aulenta, F., Beccari, M., Majone, M. (2012) *Start-up and performance of an activated sludge bioanode in microbial electrolysis cells*. *Chem. Eng. Trans.*, **27**, 109–114.
- Wagner, R.C., Call, D.F., Logan, B.E. (2010) *Optimal Set Anode Potentials Vary in Bioelectrochemical Systems*. *Environ. Sci. Technol.*, **44**, 6036–6041.
- Wagner, R.C., Regan, J.M., Oh, S.-E., Zuo, Y., Logan, B.E. (2009) *Hydrogen and methane production from swine wastewater using microbial electrolysis cells*. *Water Res.*, **43**, 1480–1488.
- Wang, A., Liu, L., Sun, D., Ren, N., Lee, D.-J. (2010) *Isolation of Fe(III)-reducing fermentative bacterium *Bacteroides* sp. W7 in the anode suspension of a microbial electrolysis cell (MEC)*. *Int. J. Hydrog. Energy*, **35**, 3178–3182.
- Wang, A., Liu, W., Cheng, S., Xing, D., Zhou, J., Logan, B.E. (2009) *Source of methane and methods to control its formation in single chamber microbial electrolysis cells*. *Int. J. Hydrog. Energy*, **34**, 3653–3658.
- Wang, A., Liu, W., Ren, N., Cheng, H., Lee, D.-J. (2010a) *Reduced internal resistance of microbial electrolysis cell (MEC) as factors of configuration and stuffing with granular activated carbon*. *Int. J. Hydrog. Energy*, **35**, 13488–13492.
- Wang, A., Liu, W., Ren, N., Zhou, J., Cheng, S. (2010b) *Key factors affecting microbial anode potential in a microbial electrolysis cell for H₂ production*. *Int. J. Hydrog. Energy*, **35**, 13481–13487.
- Wang, A., Sun, D., Cao, G., Wang, H., Ren, N., Wu, W.-M., Logan, B.E. (2011) *Integrated hydrogen production process from cellulose by combining dark fermentation, microbial fuel cells, and a microbial electrolysis cell*. *Bioresour. Technol.*, **102**, 4137–4143.
- Wang, X., Feng, Y., Ren, N., Wang, H., Lee, H., Li, N., Zhao, Q. (2009) *Accelerated start-up of two-chambered microbial fuel cells: Effect of anodic positive poised potential*. *Electrochimica Acta*, **54**, 1109–1114.

- Wang, Y.-Z., Zhang, L., Xu, T., Ding, K. (2017) *Influence of initial anolyte pH and temperature on hydrogen production through simultaneous saccharification and fermentation of lignocellulose in microbial electrolysis cell. Int. J. Hydrog. Energy*, **42**, 22663–22670.
- Wrana, N., Sparling, R., Cicek, N., Levin, D.B. (2010) *Hydrogen gas production in a microbial electrolysis cell by electrohydrogenesis. J. Clean. Prod.*, **18**, S105–S111.
- Xiao, Y., Zheng, Y., Wu, S., Zhang, E.-H., Chen, Z., Liang, P., et al. (2015) *Pyrosequencing Reveals a Core Community of Anodic Bacterial Biofilms in Bioelectrochemical Systems from China. Front. Microbiol.*, **6**.
- Xing, D., Zuo, Y., Cheng, S., Regan, J.M., Logan, B.E. (2008) *Electricity Generation by Rhodospseudomonas palustris DX-1. Environ. Sci. Technol.*, **42**, 4146–4151.
- Xu, S. Liu, H. (2011) *New exoelectrogen Citrobacter sp. SX-1 isolated from a microbial fuel cell. J. Appl. Microbiol.*, **111**, 1108–1115.
- Yang, N., Hafez, H., Nakhla, G. (2015) *Impact of volatile fatty acids on microbial electrolysis cell performance. Bioresour. Technol.*, **193**, 449–455.
- Yossan, S., Xiao, L., Prasertsan, P., He, Z. (2013) *Hydrogen production in microbial electrolysis cells: Choice of catholyte. Int. J. Hydrog. Energy*, **38**, 9619–9624.
- Zhang, Y., Merrill, M.D., Logan, B.E. (2010) *The use and optimization of stainless steel mesh cathodes in microbial electrolysis cells. Int. J. Hydrog. Energy*, **35**, 12020–12028.
- Zhen, G., Lu, X., Kumar, G., Bakonyi, P., Xu, K., Zhao, Y. (2017) *Microbial electrolysis cell platform for simultaneous waste biorefinery and clean electrofuels generation: Current situation, challenges and future perspectives. Prog. Energy Combust. Sci.*, **63**, 119–145.
- Zhu, G., Wu, T., Jha, A.K., Zou, R., Liu, L., Huang, X., Liu, C. (2014) *Review of bio-hydrogen production and new application in the pollution control via microbial electrolysis cell. Desalination Water Treat.*, **52**, 5413–5421.
- Zhu, X., Yates, M.D., Hatzell, M.C., Ananda Rao, H., Saikaly, P.E., Logan, B.E. (2014) *Microbial Community Composition Is Unaffected by Anode Potential. Environ. Sci. Technol.*, **48**, 1352–1358.