



INSTITUTO MEXICANO DE TECNOLOGÍA DEL AGUA

**COORDINACIÓN DE DESARROLLO
PROFESIONAL E INSTITUCIONAL**

SUBCOORDINACIÓN DE POSGRADO

TESIS

**CARACTERIZACIÓN DE UN SISTEMA HÍBRIDO DE CELDA
DE COMBUSTIBLE MICROBIANA PRODUCTORA DE
HIDRÓGENO-CELDA DE COMBUSTIBLE DE HIDRÓGENO
PARA LA PRODUCCIÓN DE ELECTRICIDAD**

Que para obtener el grado de

MAESTRO EN CIENCIAS Y TECNOLOGÍA DEL AGUA

Presenta

OSCAR GUADARRAMA PÉREZ

DIRECTOR DE TESIS: Dr. EDSON BALTAZAR ESTRADA ARRIAGA

JIUTEPEC, MORELOS

AGOSTO, 2017

Con fundamento en los artículos 21 y 27 de la Ley Federal del Derecho de Autor y como titular de los derechos moral y patrimoniales de la obra titulada “Caracterización de un sistema híbrido de celda de combustible microbiana productora de hidrógeno-celda de combustible de hidrógeno para la producción de electricidad”, otorgo de manera gratuita y permanente al Instituto Mexicano de Tecnología del Agua, autorización para que fijen la obra en cualquier medio, incluido el electrónico y la divulguen entre su personal, estudiantes o terceras personas, sin que pueda percibir por tal divulgación una contraprestación.

OSCAR GUADARRAMA PÉREZ

JIUTEPEC, MORELOS A 14 DE AGOSTO DEL 2017



INSTITUTO MEXICANO DE TECNOLOGÍA DEL AGUA
PROGRAMA DE MAESTRÍA EN CIENCIAS Y
TECNOLOGÍA DEL AGUA

JURADO ASIGNADO:

Presidente	Dra. Petia Mijaylova Nacheva
Secretario	Dra. Maricarmen Espinosa Bouchot
1er. Vocal	Dr. Edson Baltazar Estrada Arriaga
2do. Vocal	Dra. Gabriela E. Moeller Chávez
3er. Vocal	Dr. Jesús Hernández Romano

LUGAR EN DONDE SE REALIZÓ LA TESIS:

INSTITUTO MEXICANO DE TECNOLOGÍA DEL AGUA (IMTA)

TUTOR:

Dr. EDSON BALTAZAR ESTRADA ARRIAGA

AGRADECIMIENTOS

Al INSTITUTO MEXICANO DE TECNOLOGÍA DEL AGUA por haberme aceptado como estudiante en Ciencias y Tecnología del agua y a los profesores quienes me impartieron clases y me compartieron conocimientos a lo largo del curso del posgrado.

Esta investigación fue financiada a través del proyecto de Ciencia Básica CB-2013/221433 del Fondo SEP-CONACYT.

Al Dr. Edson Baltazar Estrada Arriaga, por haberme aceptado como estudiante de Maestría y por haberme asignado un proyecto para trabajar. Agradezco su apoyo brindado a lo largo de la realización del proyecto. Le agradezco el haberme facilitado todo el material y los medios suficientes para la realización de la experimentación y redacción de la tesis. También le agradezco que me haya compartido su conocimiento a lo largo del desarrollo de la tesis, agradezco su amistad y atención prestada.

A la Dra. Petia Mijaylova Nacheva, por otorgarme de su tiempo para la revisión de la tesis y por sus sabias correcciones a lo largo del desarrollo de este trabajo y por todas sus aportaciones para la realización del presente escrito los cuales permitieron mejorar la calidad de esta tesis.

Al Dr. Jesús Hernández Romano, por permitirme trabajar en los laboratorios de UPEMOR y por enriquecer este documento con sus valiosos comentarios y observaciones.

A la Dra. Gabriela E. Moeller Chávez y la Dra. Maricarmen Espinosa Bouchot, por sus aportes, conocimientos y correcciones en la revisión de esta tesis, así como el apoyo brindado.

Al Posgrado IMTA por el apoyo económico que me brindó, tanto la beca que me otorgó, como los apoyos para la presentación de congresos.

A mis compañeros de laboratorio del IMTA, por compartir amablemente de su conocimiento conmigo, conocimiento que me ayudó a resolver la etapa experimental.

DEDICATORIAS

A MIS PADRES ARISTEO Y MICAELA, por haberme dado una buena educación a lo largo de toda mi vida, por apoyarme y darme la posibilidad de estudiar una carrera profesional, además por todo el apoyo moral obsequiado por parte de ellos, es importante para mí saber que puedo contar con ellos en cualquier momento.

A MIS HERMANOS HUGO, JOSÉ Y YULENI, por haberme ayudado en muchas ocasiones, igualmente por todo el apoyo que he recibido por parte de ellos. Por todas las experiencias que he compartido con ellos, por ayudarme día a día a ser de mí una mejor persona.

A MIS AMIGOS, que me apoyaron a lo largo de todo el curso con los que compartí momentos inolvidables de trabajo y diversión.

RESUMEN

En este estudio se realizó la caracterización de un sistema híbrido, conformado por una celda de combustible microbiana productora de hidrógeno (CCM-H₂) acoplado a una celda de combustible de hidrógeno (CCH) para la producción de electricidad. Para determinar el mejor consorcio microbiano en la producción simultánea de bio-hidrógeno y electricidad, se probaron tres inóculos de forma conjunta, los cuales fueron: el crecimiento de una biopelícula formada por la alimentación de aguas residuales municipales crudas (I1), bacterias aisladas y purificadas provenientes de una mezcla de lodo granular anaerobio y sedimento anaerobio bajo un pretratamiento de choque térmico y ácido (I2) y una mezcla de lodo granular anaerobio y sedimentos pretratados térmicamente (I3). La celda utilizada, fue una celda combustible microbiana tipo aire-cátodo, modificada en la parte del cátodo y ánodo, con el objetivo de incrementar el área de contacto y la producción de bio-hidrógeno y electricidad en un solo paso. El sistema bio-electroquímico trabajó con tiempos de retención hidráulico (TRH) de 8, 4 y 1 d (días) bajo condiciones de pH ácidas (5.5-6.5) a una temperatura de 32°C y fue alimentado con agua sintética con una DQO de 1000 mg/L. El máximo voltaje producido a circuito cerrado (resistencia externa de 1000 Ω) fue de 671 mV con un TRH de 8 d. La máxima densidad de potencia obtenida fue de 46 mW/m² con una densidad de potencia volumétrica de 6.5 W/m³. La velocidad máxima de producción de bio-hidrógeno fue 5 L H₂/L·d. Respecto al rendimiento, la máxima producción de hidrógeno obtenida fue de 2.4 ±0.1 mol H₂/mol sacarosa. Cuando el reactor se operó en lote, la acumulación de bio-hidrógeno fue de 1527 mL y 3.2 mmol de hidrógeno, además alcanzó una máxima producción de 314 mV de electricidad, con una máxima densidad de potencia de 9.8 mW/m² y una potencia volumétrica de 1.4 W/m³. Tanto la producción de bio-hidrógeno como el voltaje y densidad de potencia, fueron evaluados con el modelo ajustado de Gompertz. El bio-hidrógeno generado por la CCM-H₂ se alimentó a la CCH, el máximo voltaje obtenido por la CCH fue de 459 mV, cuando la CCM-H₂ fue operada con un TRH de 8 d. Se realizó la identificación de la población microbiana implicada en la producción de bio-hidrógeno y electricidad utilizando la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) acoplada a la técnica de electroforesis en gel con gradiente desnaturizante y por secuenciación de ADN genómico. Los microorganismos identificados sobre el ánodo del sistema bio-electroquímico fueron: *Bacillus*, *Enterococcus*, *Lysinibacillus*, *Citrobacter*, *Chryseobacterium*, *Azotobacter* y *Providencia*.

Palabras clave: Celda de combustible microbiana; celda de combustible de hidrógeno; electricidad; bio-hidrógeno

ABSTRACT

In this study was carried out the characterization of a hybrid system, conformed of a hydrogen-producing microbial fuel cell (MFC-H₂) coupled to a hydrogen fuel cell (HFC) for the production of electricity. In order to determine the best microbial consortium in the simultaneous production of bio-hydrogen and electricity, three inoculums were tested jointly, which were: the growth of a biofilm formed by the feeding of municipal wastewater (I1), isolated bacteria and purified from a mixture of anaerobic granular sludge and anaerobic sediment under a heat and acid shock pretreatment (I2) and a mixture of anaerobic granular sludge and sediments thermally pretreated (I3). The cell used was an air-cathode microbial fuel cell, modified at the cathode and anode sides, with the objective of increasing the contact area and the production of bio-hydrogen and electricity in a single step. The bio-electrochemical system worked with hydraulic retention times (HRT) of 8, 4 and 1 d (days) under acidic pH conditions (5.5-6.5) at a temperature of 32°C and was fed with synthetic water with a COD of 1000 mg L⁻¹. The maximum voltage produced in closed circuit (external resistance of 1000 Ω) was 671 mV with a HRT of 8 d. The maximum power density obtained was 46 mW/m² with a volumetric power density of 6.5 W/m³. The maximum bio-hydrogen production rate was 5 L H₂/L·d. Regarding the yield, the maximum hydrogen production obtained was 2.4 ±0.1 mol H₂/mol sucrose. When the reactor was operated in batch, the accumulation of bio-hydrogen was 1527 mL and 3.2 mmol of hydrogen, also reached a maximum production of 314 mV of electricity, with a maximum power density of 9.8 mW/m² and a volumetric power of 1.4 W/m³. The bio-hydrogen production, the voltage and power density were evaluated with the adjusted Gompertz model. The bio-hydrogen generated by the MFC-H₂ was fed to the HFC, the maximum voltage obtained by the HFC was 459 mV, when the MFC-H₂ was operated with a HRT of 8 d. Identification of the microbial population involved in the production of bio-hydrogen and electricity was carried out using the polymerase chain reaction (PCR) technique coupled to the technique of denaturing gradient gel electrophoresis and genomic DNA sequencing. The microorganisms identified on the anode of the bio-electrochemical system were: *Bacillus*, *Enterococcus*, *Lysinibacillus*, *Citrobacter*, *Chryseobacterium*, *Azotobacter* and *Providencia*.

Keywords

Microbial fuel cell; hydrogen fuel cell; electricity; bio-hydrogen

ÍNDICE DE CONTENIDO	Página
INTRODUCCIÓN	1
CAPÍTULO 1. ANTECEDENTES	
1.1. Tecnologías de celdas de combustible	3
1.1.2. Tipos de celdas de combustible	3
1.1.3. Sistema de celdas bio-electroquímicas	4
1.2. Celdas de combustible microbianas (CCM)	4
1.2.1. Celdas de electrólisis microbiana	5
1.3. Transferencia de electrones	8
1.4. Funcionamiento y principios de operación de una CCM	8
1.5. Partes de las CCM	9
1.5.1. Membranas de intercambio protónico (PEM)	9
1.5.2. Cátodo	10
1.5.3. Ánodo	11
1.6. Sustratos utilizados en una CCM	11
1.7. Celdas de combustible de hidrógeno (CCH)	14
1.8. Métodos para la producción de hidrógeno	14
1.8.1. Generación química	14
1.8.2. Generación electrolítica	15
1.8.3. Producción biológica	16
1.9. Reacciones en la producción y consumo de hidrógeno	18
1.10. Inhibición de bacterias metanogénicas	19
1.11. Bacterias productoras de hidrógeno y rutas metabólicas	19
1.12. Factores que afectan a la producción de hidrógeno por fermentación	23
CAPÍTULO 2. OBJETIVOS, HIPÓTESIS Y JUSTIFICACIÓN	
2.1. Objetivo general	24
2.2. Objetivos particulares	24
2.3. Hipótesis	24
2.4. Justificación	24
CAPÍTULO 3. METODOLOGÍA	
3.1. Estructura del sistema híbrido	26
3.1.1. CCM-H ₂	26
3.1.1.1. Acondicionamiento del cátodo	27
3.1.2. CCH	28
3.2. Procedimiento experimental	29
3.2.1. Configuración del sistema híbrido y operación	29
3.2.2. Parámetros operacionales	32
3.2.2.1. Temperatura	32
3.2.2.2. Sustrato	32
3.2.2.3. pH	32
3.2.2.4. Inóculo	32
3.2.3. Parámetros analíticos	34
3.2.3.1. Determinación de hidrógeno por cromatografía de gases	35
3.3. Caracterización bio-electroquímica	36
3.3.1. Voltaje	36
3.3.2. Intensidad de corriente	36
3.3.3. Potencia	36

3.3.4. Densidad de corriente	36
3.3.5. Densidad de potencia	36
3.3.6. Potencia volumétrica	37
3.4. Curvas de polarización	37
3.5. Producción de hidrógeno-Cinética en lote	37
3.6. Tinciones de Gram y esporas	38
3.6.1. Tinción de Gram	38
3.6.2. Tinción de Esporas	39
3.7. Extracción de ADN genómico	39
3.8. Amplificación por PCR del gen 16S	40
3.9. Confirmación de la amplificación del producto de PCR (Electroforesis)	41
3.10. Purificación del producto de PCR y preparación de la reacción de secuenciación	42
3.11. Análisis de secuencias	42
CAPÍTULO 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	
4.1. Caracterización físico-química de agua de alimentación	43
4.2. Producción de electricidad de la CCM-H ₂ operado en continuo	44
4.2.1 Producción de electricidad de la CCM-H ₂ a circuito abierto	44
4.2.2. Producción de electricidad de la CCM-H ₂ a circuito cerrado en continuo	45
4.2.3. Densidad de potencia producida en la CCM-H ₂	47
4.2.4. Potencia volumétrica producida en la CCM-H ₂	49
4.2.5. Curvas de polarización de la CCM-H ₂ con diferentes tiempos de retención	50
4.3. Producción de biogás en la CCM-H ₂ operado en continuo	53
4.4. Producción simultánea de electricidad y bio-hidrógeno en la CCM-H ₂	56
4.4.1. Rendimiento de electricidad y bio-hidrógeno con diferentes inóculos	56
4.4.2. Rendimiento molar en la producción bio-hidrógeno con diferentes inóculos	58
4.5. Producción de electricidad con la CCH acoplado a la CCM-H ₂	61
4.6. Cinética de producción de bio-hidrógeno operado en lote	65
4.7. Producción de electricidad de la CCM-H ₂ operado en lote	69
4.8. Producción total de electricidad en el sistema híbrido CCM-H ₂ -CCH	73
4.9. Comportamiento de pH, potencial redox y remoción de DQO operado en continuo	74
4.9.1. pH	74
4.9.2. Potencial redox	74
4.9.3. DQO	75
4.10. Análisis microbiológico	76
CAPÍTULO 5. CONCLUSIONES	83
CAPÍTULO 6. PERSPECTIVAS Y RECOMENDACIONES	85
CAPÍTULO 7. ANEXO	86
7.1. Análisis estadístico	86
CAPÍTULO 8. REFERENCIAS	89

ÍNDICE DE TABLAS

	Página	
Tabla 1.1	Características y tipos de celdas de combustible	3
Tabla 1.2	Estudios realizados con celdas de combustible microbianas	13
Tabla 1.3	Estudios de producción de hidrógeno por celdas MEC	15
Tabla 1.4	Producción de hidrógeno por fermentación oscura	17
Tabla 1.5	Reacciones de producción y consumo de hidrógeno por fermentación oscura	18
Tabla 1.6	Microorganismos productores de hidrógeno	20
Tabla 1.7	Bacterias <i>Clostridium</i> que participan en la fermentación	22
Tabla 3.1	Procedimiento experimental	30
Tabla 3.2	Componentes de la solución sintética	32
Tabla 3.3	Parámetros analíticos medidos en la CCM-H ₂	34
Tabla 3.4	Condiciones del cromatógrafo de gases	35
Tabla 3.5	Reactivos utilizados en la prueba de PCR	40
Tabla 4.1	Caracterización del agua residual municipal/agua sintética	43
Tabla 4.2	Producción máxima de electricidad y bio-hidrógeno en la CCM-H ₂	58
Tabla 4.3	Producción de bio-hidrógeno por diferentes procesos	59
Tabla 4.4	Resultados de la cinética de producción de bio-hidrógeno	67
Tabla 4.5	Producción total de electricidad del sistema híbrido	74
Tabla 4.6	Resultados de la secuenciación correspondiente a las bandas obtenidas de la amplificación por PCR	78
Tabla 7.1	ANOVA de producción de voltaje en la CCM-H ₂	86
Tabla 7.2	ANOVA de producción de bio-hidrógeno en la CCM-H ₂	86
Tabla 7.3	ANOVA de producción de voltaje en la CCH	87

ÍNDICE DE FIGURAS

		Página
Figura 1.1	Celda de combustible microbiana	5
Figura 1.2	Representación de la producción de electricidad en una CCM (A) y la producción de hidrógeno en una MEC (B).	7
Figura 1.3	Generación de hidrógeno con producción de acetato (A) y butirato (B) a través de la ruta de la glucólisis	22
Figura 3.1	Estructura de la CCM-H ₂	27
Figura 3.2	Electrodeposición con PbO ₂	28
Figura 3.3	Partes de una CCH (A), y la CCH real (B)	29
Figura 3.4	Diagrama del sistema híbrido CCM-H ₂ -CCH (A), Sistema híbrido CCM-H ₂ -CCH real (B)	31
Figura 3.5	a) Pretratamiento térmico-ácido de la mezcla de lodo, b) Bacterias puras en medio NBY, c) Inoculación de bacterias sobre las paredes del ánodo	33
Figura 3.6	Cromatógrafo de gases SRI 8610	36
Figura 3.7	Esquema del programa PCR utilizado para amplificar el gen ribosomal 16S	41
Figura 4.1	Producción de voltaje en la CCM-H ₂ a circuito abierto	45
Figura 4.2.	Producción de voltaje en la CCM-H ₂ a circuito cerrado con diferentes tiempos de retención hidráulica	46
Figura 4.3	Densidad de potencia producida en la CCM-H ₂ con diferentes tiempos de retención hidráulica	48
Figura 4.4	Potencia volumétrica producida en la CCM-H ₂ con diferentes tiempos de retención hidráulica	50
Figura 4.5	Curvas de polarización	51
Figura 4.6	Producción total de biogás en la CCM-H ₂	53
Figura 4.7	Producción de gases en la CCM-H ₂	54
Figura 4.8	Producción porcentual de biogás en la CCM-H ₂	54
Figura 4.9	Producción simultánea de electricidad y bio-hidrógeno con diferentes inóculos y TRH	56
Figura 4.10	Producción de electricidad con la CCH	61
Figura 4.11	Tiempo de agotamiento de voltaje en la CCH a partir de bio-hidrógeno e hidrógeno puro	62
Figura 4.12	Cinética de acumulación de bio-hidrógeno en la CCM-H ₂	65
Figura 4.13	Cinética de producción de bio-hidrógeno en mmol en la CCM-H ₂	66
Figura 4.14	Velocidad volumétrica de producción de bio-hidrógeno en lote	67
Figura 4.15	Producción de voltaje con la CCM-H ₂ en lote	69
Figura 4.16	Producción de densidad de potencia con la CCM-H ₂ en lote	70
Figura 4.17	Producción de potencia volumétrica con la CCM-H ₂ en lote	68
Figura 4.18	Producción de voltaje con el modelo de Gompertz	72
Figura 4.19	Producción de densidad de potencia con el modelo de Gompertz	72
Figura 4.20	Resultados de la DQO en el efluente de cada fase	76
Figura 4.21	Aislamiento de bacterias tomadas del ánodo	77

Figura 4.22	Bacilos Gram positivos. Técnica tinción de Gram	78
Figura 4.23	Bacterias en estado de esporulación. Técnica tinción Wirtz Conklin	78
Figura 4.24	Perfiles de bandas obtenidos por PCR. A) Perfil de bandas de muestra 1. B) Perfil de bandas de muestra 2	79
Figura 4.25	Relación filogenética del consorcio bacteriano identificado en el reactor	81
Figura 7.1	Prueba de Tukey de producción de voltaje en la CCM-H ₂	87
Figura 7.2	Prueba de Tukey de producción de bio-hidrógeno en la CCM-H ₂	88
Figura 7.3	Prueba de Tukey de producción de voltaje en la CCH	88

GLOSARIO DE TÉRMINOS

Abreviatura

°C	Grados centígrados
cm	Centímetro
d	Día
DQO	Demanda Química de Oxígeno
g	Gramo
kg	Kilogramo
L	Litro
min	Minutos
mg	Miligramos
mL	Mililitros
mS	Milisiemens
mV	Milivoltios
N-NH ₄	Nitrógeno amoniacal
pH	Potencial de hidrógeno
PO ₄	Fosfatos
Q	Caudal
TRH	Tiempo de retención hidráulico
CCM	Celda de combustible microbiana
CCH	Celda de combustible de hidrógeno
MEC	Celda de electrólisis microbiana
SBE	Sistemas bio-electroquímicos
PEM	Membrana de intercambio protónico
ADN	Ácido desoxirribonucleico
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
SST	Sólidos suspendidos totales
R _{ext}	Resistencia externa
R _{int}	Resistencia interna
DC	Densidad de corriente
DP	Densidad de potencia
PV	Potencia volumétrica
SBR	Reactor biológico secuencial
NTPs	Deoxidonucleótidos trifosfatos
pb	Pares de bases
mW	Miliwatts
mA	Miliampers
m ³	Metro cúbico
MIC	Membrana de intercambio catiónico
m ²	Metro cuadrado
h	Hora
VVPH	Velocidad volumétrica de producción de hidrógeno
+I2	Adición de inóculo 2
+I3	Adición de inóculo 3
c.b.p	Cuanto basta para
µL	Microlitros
NBY	Caldo nutritivo con extracto de levadura de las siglas en inglés "Nutrient Broth Yeast Extract"

1. INTRODUCCIÓN

Actualmente, la principal forma de producción de electricidad en todo el mundo es a través de la quema de combustibles fósiles, por lo que el consumo de petróleo crudo, gas natural y los biocombustibles se incrementarán en los próximos años, debido al rápido crecimiento económico y demográfico (Lewis y Nocera, 2006). Dada la creciente demanda energética en el mundo y la liberación de contaminantes al medio ambiente, es necesario implementar más tecnologías de energía renovable. El agua residual ha sido considerada como una fuente de recuperación de energía de alto potencial (Werner et al., 2013). El agua residual de tipo doméstica podría generar una cantidad de electricidad de hasta 2.2 kW/h·m³ (considerando una DQO de 500 mg/L y que la glucosa contiene 4.4 kW/h·kg de DQO) y si la energía fuera recuperada correctamente, la energía química a través de las aguas residuales podría cubrir hasta el 7% de la energía consumida por los hogares (Virdis et al., 2011). Es momento de pensar en optar por nuevas fuentes de energía, con el fin de producir electricidad dentro de un ambiente libre de contaminación, como lo ofrece la tecnología electroquímica de celdas de combustible (Behera et al., 2014). Varios investigadores consideran a las celdas de combustible como soluciones o tecnologías clave para una producción eficiente de energía limpia, que podría sustituir a las tecnologías convencionales. Esta tecnología tiene interesantes aplicaciones, incluyendo la producción de electricidad, producción de biogás (metano e hidrógeno) y tratamiento de aguas residuales (Giorgi y Leccese, 2013). En el campo de investigación de los sistemas bio-electroquímicos (SBE) incluye una amplia gama de tecnologías emergentes, ésta se caracteriza por utilizar microorganismos para la generación de electricidad mediante reacciones anódicas y catódicas dentro de una configuración electroquímica que utilizan sustratos orgánicos como fuente de combustible (McCormick et al., 2015). Los SBE pueden clasificarse en celdas de combustible microbianas (CCM), celdas de combustible de hidrógeno (CCH) y celdas de electrólisis microbiana (MEC), la clasificación dependerá del modo de operación y del producto final generado (Pant et al., 2011). De acuerdo con Revelo et al. (2013) en la última década, los sistemas bio-electroquímicos han atraído interés para realizar investigación, no sólo por la tendencia mundial en la producción de energía sostenible, sino también por realizar otro tipo de operaciones de forma simultánea para degradar materia orgánica y para la biorremediación de sitios contaminados. La producción biológica de hidrógeno también representa una tecnología prometedora del futuro ya que se considera una fuente limpia y renovable (Yasin et al., 2013), además posee el mayor contenido energético por unidad de peso, 122-142 KJ/g, comparado con cualquier combustible conocido (Blanco y Rodríguez, 2012).

Las celdas de combustible microbianas son sistemas bio-electroquímicos que generan electricidad directamente con poca producción de hidrógeno en forma de protones que se forma durante la degradación de la materia orgánica contenida en las aguas residuales (Logan et al., 2015; Li et al., 2014). Actualmente las celdas de combustible microbianas y de hidrógeno no se encuentran a la venta en el mercado como proceso de aplicación a gran escala, pero han demostrado ser una alternativa con alto potencial para la producción de bioelectricidad. El enfoque de este trabajo es acoplar una celda de combustible microbiana a una celda de combustible de hidrógeno en conjunto, formando un sistema híbrido para la producción de electricidad mediante un proceso electroquímico y biológico.

CAPÍTULO 1. ANTECEDENTES

1.1. Tecnologías de celdas de combustible

Muchos investigadores consideran a las celdas de combustible como soluciones o tecnologías clave para una producción eficiente de energía limpia, que podrían sustituir a las tecnologías convencionales generadoras de electricidad. Esta tecnología tiene interesantes aplicaciones, incluyendo la producción de electricidad, producción de biogás y tratamiento de aguas residuales (Giorgi y Leccese, 2013). Con el aumento de la demanda energética de la actualidad, es necesario implementar nuevas fuentes de energías alternativas, con el objetivo de producir electricidad dentro de un ambiente libre de contaminación como lo ofrece la tecnología electroquímica de celdas de combustible (Behera et al., 2014).

1.1.2. Tipos de celdas de combustible

En la actualidad existen diferentes tipos de celdas de combustible disponibles en el mercado, cada tipo se caracteriza por diferentes factores, tales como: el rango de temperatura en que se opera, el tipo de combustible o sustrato que se utiliza, el tipo de catalizador empleado y por la eficiencia de la relación de la conversión de energía. Los tipos de celdas de combustible existentes para realizar investigación científica se muestran en la Tabla 1.1, además se pueden observar algunas características de operación como: la temperatura, el combustible, el electrólito y el ion móvil, estos parámetros describen cada tipo de celda.

- Celdas de membrana de intercambio protónico (PEMFC)
- Celdas de combustible alcalinas (AFC)
- Celdas de combustible de ácido fosfórico (PAFC)
- Celdas de combustible carbonato fundido (MCFC)
- Celdas de combustible de óxido sólido (SOFC)

Tabla 1.1. Características y tipos de celdas de combustible (Haile, 2003)

Tipo de celda	Temperatura (°C)	Combustible	Electrólito	Ion móvil
PEMFC	20-110	H ₂ , CH ₃ COO	Polímeros sulfonados	H ⁺
AFC	100-250	H ₂	KOH	OH ⁻
PAFC	150-250	H ₂	H ₃ PO ₄	H ⁺
MCFC	500-700	CO	(Na,K) ₂ CO ₃	CO ₃ ²⁻
SOFC	700-1000	CO	(Zr,Y)O ₂	O ²⁻

FC por sus siglas en inglés (Fuel cells)

1.1.3. Sistema de celdas bio-electroquímicas

El campo de investigación de los sistemas bio-electroquímicos (SBE) incluye una amplia gama de tecnologías emergentes, ésta se caracteriza por utilizar microorganismos para la generación de electricidad mediante reacciones anódicas y catódicas dentro de una configuración electroquímica, el cual utiliza sustratos orgánicos como fuente de combustible (McCormick et al., 2015).

Los SBE pueden clasificarse en celdas de combustible microbianas (CCM), celdas de combustible de hidrógeno por hidrólisis (CCH) y celdas de electrólisis microbiana (MEC, por sus siglas en inglés (Microbial electrolysis Cells)), la clasificación dependerá del modo de operación y del producto final generado (Pant et al., 2011). De acuerdo con Revelo et al. (2013) los sistemas bio-electroquímicos tienen un interés para realizar investigación, no sólo por la tendencia mundial en la producción de energía sostenible, sino también por realizar otro tipo de operaciones de forma simultánea para degradar materia orgánica y para la biorremediación.

1.2. Celdas de combustible microbianas (CCM)

Las celdas de combustible microbianas de intercambio protónico (tipo PEM) se definen como dispositivos electroquímicos (Shen et al., 2014), que convierten energía bioquímica en energía eléctrica como resultado de la oxidación de sustratos orgánicos utilizando microorganismos electroactivos (Goto et al., 2015). Esta tecnología está relacionada con el tratamiento de aguas residuales, generalmente los microorganismos utilizan la materia orgánica como sustrato, donde a través de su metabolismo se genera una fuente de electrones y protones. Las celdas de combustible microbianas aprovechan los electrones y protones de la oxidación bacteriana para la generación de electricidad mediante un ánodo, un cátodo, una membrana y un material conductor externo (Vishwanathan et al., 2015).

En la Figura 1.1 se muestra el diseño general de una celda de combustible microbiana tipo de membrana de intercambio protónico tipo PEM (Membrane Exchange Proton) de dos cámaras.

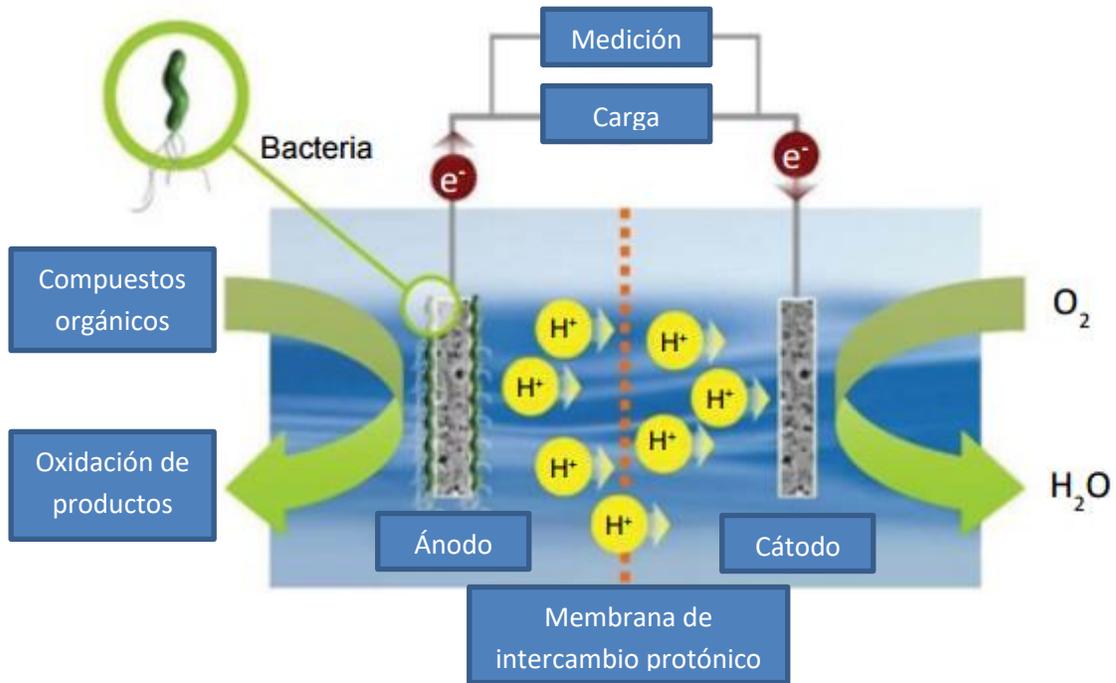


Figura 1.1. Celda de combustible microbiana (Modificado de: Du et al., 2016).

De acuerdo con Danish et al. (2015) los electrones y protones generados por la acción catalítica bacteriana son conducidos por diferentes mecanismos de transporte hacia los electrodos de la celda. Algunos factores como la temperatura, pH, el tipo de electrodos, la distancia entre ellos, la toxicidad del sustrato, así como la resistencia del circuito, tienen un efecto significativo en tasas de remoción de contaminantes y la densidad de potencia eléctrica de las CCM (Sevda et al., 2013). La elección del sustrato tiene un profundo efecto en el perfil de desarrollo de la comunidad microbiana y en la potencia eléctrica, particularmente se utilizan sustratos con alto contenido orgánico derivados de residuos sólidos en condiciones anaerobias (Rozsenberszki et al., 2015).

Dentro de la investigación con CCM existen diferentes enfoques, algunos autores realizan investigación con el diseño arquitectónico de la celda, estudios sobre bacterias electroactivas y transporte de electrones, efecto de los inóculos etc. Por ejemplo Passos et al. (2015) utilizaron las CCM como tratamiento de lodo secundario proveniente de una PTAR el cual sirvió como inóculo de un consorcio bacteriano mixto, el reactor fue alimentado con medio de cultivo alcanzando una densidad de potencia de $13.5 \mu W cm^2$. Aelterman et al. (2016) utilizaron una gran variedad de materiales, como electrodos usaron gránulos de carbón y barras de grafito, una membrana de intercambio protónico ULTREX 7000, operaron la celda

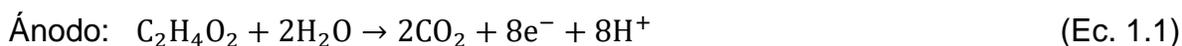
de forma continua e inocularon una mezcla de lodos anaerobios-aerobios proveniente de un digestor de procesamiento de papa alcanzando una potencia volumétrica de 14 W/m³. Merino et al. (2016) observaron el efecto de variar diferentes tipos de electrodos dentro de la celda, utilizaron una tela de carbón, fieltro de carbón una placa de acero inoxidable, alcanzando eficiencias de 65, 54 y 44 mW/m². Así como estos ejemplos descritos existe una gran variedad de reportes con diferentes enfoques de investigación.

1.2.1. Celdas de electrólisis microbiana

Dentro de los SBE también se encuentran las celdas de electrólisis microbianas, estas tienen un principio de funcionamiento similar a un CCM, incluso se utilizan materiales del mismo tipo tanto en el caparazón de la celda como en los electrodos, membranas etc. De igual forma son dispositivos electroquímicos que utilizan microorganismos para la degradación de materia orgánica, siendo el objetivo principal la producción de hidrógeno, donde la materia orgánica es degradada mediante el metabolismo de microorganismos electroquímicamente activos en CO₂, protones y electrones (Jeremiasse et al., 2010). Las bacterias transfieren los electrones al ánodo y los protones son liberados a la solución, los electrones entonces viajan a través de un circuito externo a un cátodo y se combinan con los protones libres en la solución (Kadier et al., 2015). En una MEC se requiere una fuente de energía externa para iniciar la reacción en los electrodos ya que no se permite ningún oxidante en el cátodo y es necesaria para llevar a cabo la electrólisis bajo condiciones biológicas determinadas (Escapa et al., 2015).

Kadier et al. (2015) menciona que se requiere un voltaje ≥ 0.2 V bajo condiciones de pH=7, T=30 °C, P=1 atm, la irradiación de energía se hace mediante una fuente de poder, en celdas tipo MEC se utilizan voltajes con valores relativamente bajos (0.2-0.8 V), en comparación con la electrólisis típica del agua (1.23-1.8 V). El hidrógeno se produce a través de la reducción de protones en el cátodo, el flujo de carga negativa fuera de la celda se compensa mediante el transporte de protones desde el ánodo hasta el cátodo dentro de la celda (Jeremiasse et al., 2010).

En caso de utilizar acetato como sustrato las reacciones en ambas cámaras son las siguientes:



En la Figura 1.2 se observa la comparación y la similitud entre una celda MEC y una CCM.

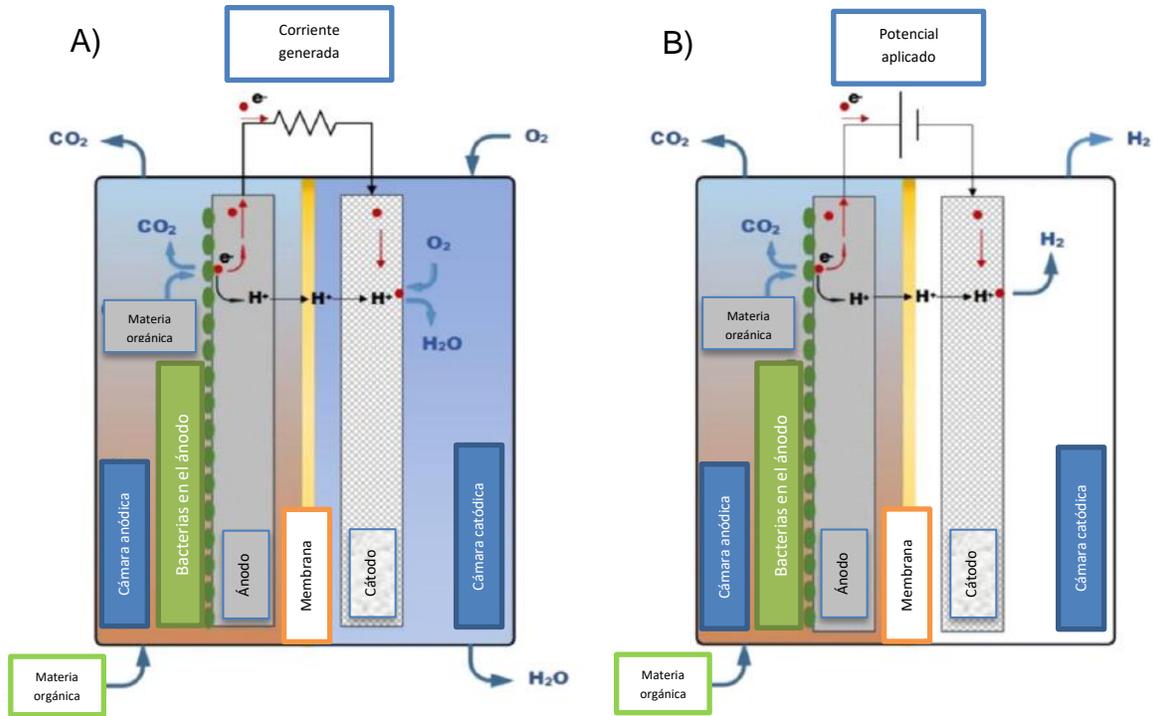


Figura 1.2. Representación de la producción de electricidad en una CCM (A), y la producción de hidrógeno en una MEC (B). (Modificado de: Escapa et al., 2015)

Entre los autores que han estudiado las celdas tipo MEC están [Jafary et al. \(2015\)](#) quienes realizaron un trabajo en el que utilizaron cátodos de carbón (fieltro de carbón) bajo condiciones biológicas diferentes, en el biocátodo 1 (cátodo sobre medio biológico parcial con dos cámaras) aplicaron un voltaje de 0.65 V, en el biocátodo 2 (cátodo sobre medio biológico completo con dos cámaras) aplicaron 0.8 V y en el biocátodo 3 (biocátodo 1 y 2 juntos) aplicaron 0.7 V. Dentro de los resultados alcanzaron un rendimiento de $0.63 \text{ m}^3 \text{ H}_2/\text{m}^3 \cdot \text{d}$ correspondiente a un 49 % de producción de hidrógeno. [Hou et al. \(2014\)](#) realizaron un estudio en el que su objetivo principal fue incrementar la producción de hidrógeno en una MEC mediante la inhibición de bacterias metanogénicas con irradiación de luz UV, como ánodo utilizaron fibra de carbón y el cátodo fue un paño de carbón impregnado con $0.5 \text{ mg}/\text{cm}^2$ de Pt como catalizador. El voltaje aplicado en la celda de electrólisis fue de 0.8 V, teniendo un rendimiento de 2.87 a $3.70 \text{ mol H}_2/\text{mol}$ acetato con irradiación UV.

1.3. Transferencia de electrones

En el bioánodo de una CCM se desarrollan bacterias electroquímicamente activas (exoelectrógenas) (Song et al., 2015), se han planteado diferentes mecanismos para explicar cómo los microorganismos liberan los electrones al electrodo: algunas bacterias transfieren los electrones directamente al ánodo a través de proteínas membranales como los citocromos tipo c, o de conductos proteicos denominados pili, los cuales sirven como nanoconductores; otras bacterias que no pueden hacerlo debido a la naturaleza no conductiva de su membrana celular requieren de mediadores de electrones exógenos o endógenos (Falcón et al., 2009). Los mecanismos de transferencia de electrones en los biocátodos son similares a los del bioánodo, en este proceso algunos microorganismos pueden llevar a cabo reacciones de transferencia directa de electrones hacia los electrodos (Revelo et al., 2013; Rossi et al., 2015). Debido a su alto potencial de óxido-reducción (1.229 V) y por su bajo costo para suministro, el oxígeno es el aceptor final de electrones más popular. Los microorganismos transfieren directamente los electrones desde el ánodo y es el oxígeno el que reacciona con los electrones para la producción de agua creando un diferencial de potencial (electricidad). Las bacterias se colonizan en la superficie de los electrodos formando lodos (biopelícula), éstos catalizan la reducción de oxígeno aumentando la actividad catalítica del cátodo, por lo que resulta en un incremento en el voltaje de la celda. En el sistema de una CCM se obtiene un inóculo en el área anódica en la que se encuentra una alta diversidad microbiana sobre la suficiente del electrodo. La CCM convierte la energía disponible en un sustrato bioconvertible en electricidad. Esto se puede lograr cuando las bacterias liberan electrones y utilizan el oxígeno como aceptor final (Song et al., 2015).

1.4. Funcionamiento y principios de operación de una CCM

El funcionamiento de una CCM depende directamente de las reacciones bioelectroquímicas realizadas por los microorganismos en la oxidación de materiales orgánicos biodegradables (Calignano et al., 2015). En la última década la investigación con microorganismos electroactivos ha aumentado con diferentes aplicaciones (Li et al., 2014), los microorganismos son capaces de convertir una amplia variedad de compuestos orgánicos biodegradables en CO₂, agua y energía (Pant et al., 2013). Dentro de la cámara de la CCM se proporcionan las condiciones necesarias para mantener un hábitat adecuado para el crecimiento y las actividades metabólicas de los microorganismos electroactivos. Un esquema general de una CCM de dos cámaras es tal que en el compartimiento anódico, los microorganismos pueden llevar a cabo conversiones oxidativas y simultáneas, por lo que el rendimiento de una CCM también depende del tipo de sustrato que se

utiliza (Elmekawy et al., 2015). Las CCM tienen varias ventajas únicas sobre las tecnologías convencionales de producción de bioenergía, tales como: la utilización de la electricidad y las oportunidades de aplicación para desarrollar nuevas infraestructuras eléctricas para áreas remotas (Pandey et al., 2016). Existen diferentes formas de operar las CCM, el diseño correcto de las celdas es fundamental para disminuir los costos de materiales o de operación (Kasemi et al., 2016). Los procesos de operación pueden clasificarse en operación continua y operación por lote (batch). Se han construido CCM en muchas escalas diferentes, que van desde volúmenes de microlitros a decenas y cientos de litros, con diferentes condiciones de operación y materiales. La necesidad de una membrana, incrementa los costos de material, es probable que las CCM sean más útiles en la producción de electricidad a corto plazo (Logan et al., 2015). De acuerdo con Revelo et al. (2013), en muchas publicaciones se observan diferencias respecto al desempeño de las CCMs, algunos de los factores que afectan son: la arquitectura (Rismani-Yazdy et al., 2011), el tipo de membrana (Sharma y Li, 2010), los electrodos utilizados (Hou et al., 2012), el tipo sustrato (Choi et al., 2003) y los microorganismos utilizados como inóculo (Rabaey y Verstraete, 2005).

1.5. Partes de las CCM

Las partes tradicionales que componen un celda de combustible microbiana son una cámara anaeróbica y una aeróbica, dentro de éstas se encuentran los dos electrodos (ánodo y cátodo), como divisor de ambas cámaras se encuentra una membrana de intercambio protónico y en el exterior cuenta con un circuito externo (Rahimnejad et al., 2015).

1.5.1. Membranas de intercambio protónico (PEM)

En una CCM la membrana es un componente esencial del sistema, de este factor depende el rendimiento de la misma (Kim y Yang, 2012), existen dos tipos de membranas, las membranas de intercambio de protones porosas y no porosas (Mayahi et al., 2013). Las membranas de intercambio de protones son utilizadas como separador del electrolito entre la cámara anódica y la catódica de la celda, permitiendo el flujo de protones de una cámara a otra (Leong et al., 2013). En esta tecnología se utilizan membranas de intercambio catiónico y aniónico, membranas como la Nafion, Hyflon y Ultrex han sido utilizadas durante mucho tiempo debido a que pueden transferir fácilmente los protones generados en la cámara del ánodo hacia la cámara del cátodo (Leong et al., 2013). La membrana más usada en una CCM tipo PEM es la Nafion, debido a su alta conductividad protónica en su estado

hidratado, esto porque cuenta con un grupo sulfonado cargado negativamente unido a la cadena principal del fluorocarbonos, por lo cual promueve el transporte de protones a través de la membrana. Los productos Nafion no solo están diseñados para transferir protones, sino también algunas especies catiónicas presentes en la solución, tales como Ca^{2+} Na^+ K^+ y Mg^+ , que son rápidamente transportadas a través de la membrana ocupando las cargas negativas de los grupos sulfonados (Rahimnejad et al., 2014). Se han realizado numerosos estudios con diferentes membranas en el estudio de CCM. Rahimnejad et al. (2014) sintetizaron membranas de Nafion 117 (membrana catiónica) con nanocompuestos que generaban más energía debido a la mayor conductividad y más baja rugosidad de la membrana. Ghasemi et al. (2012) desarrollaron una membrana de nanocompuestos y lo comparó con la membrana de Nafion 117, esta membrana está compuesta con nanofibras de carbón activado sobre Nafion 117 de forma que disminuían el tamaño del poro y bajaban la rugosidad, consiguiendo un bloqueo en la transferencia de oxígeno del cátodo al ánodo y una disminución de la migración de microorganismos y otros elementos del ánodo al cátodo, de acuerdo con los resultados mostraron que esta membrana compuesta puede producir alrededor de 1.5 veces más potencia que el Nafion 117.

1.5.2. Cátodo

El material catódico es un componente importante en el diseño de una CCM, tanto en el aspecto de rendimiento como en el económico. Como electrodos son muy utilizados los materiales de carbón. En muchos estudios se han usado papel de carbón, tela de grafito, fieltro de carbón, placas de carbón, escobillones etc. (López, 2013). Los cátodos de carbón generalmente son impregnados con catalizadores de Pt o Pb para acelerar las velocidades de reducción del oxígeno, haciendo más eficiente la transferencia de electrones (Ahn et al., 2013). Los protones producidos en la cámara del ánodo migran hacia el cátodo a través de la membrana y los electrones generados viajan hacia el cátodo donde se completa el circuito. El oxígeno y los iones positivos producidos en el ánodo participan en la siguiente reacción para la formación de agua (Rahimnejad et al., 2015).



Cuando se cierra el circuito, es decir, se realizan todas las conexiones entre ambos electrodos se produce una corriente constante. Durante este proceso la concentración de especies del oxidante (aceptor de electrones), la disponibilidad de protones, el rendimiento del catalizador y la estructura de electrodo afecta al

rendimiento de la reacción en el cátodo (Zhou et al., 2012 y 2013). Existen muchas formas de acondicionar los cátodos; Buitrón y Pérez (2011) utilizaron un cátodo de grafito con un alambre de Pt. Yuan et al. (2014) impregnaron cloruro de mercurio como catalizador sobre un electrodo de carbón vítreo. Haoranet et al. (2014) realizaron una síntesis hidrotermal con MnO_2 para acondicionar el cátodo además de ser impregnado con titanio.

1.5.3. Ánodo

El material anódico de una CCM es crucial para su alto rendimiento y escalabilidad. El ánodo no funciona sólo como un conductor de electrones, sino también como un portador de bacterias (biopelícula), por lo tanto, la rugosidad de la superficie y una buena biocompatibilidad hace eficiente la transferencia de electrones entre las bacterias y la superficie del electrodo. Estos factores son claves esenciales para promover la actividad biocatalítica. Parte de la investigación con CCM está relacionada con la modificación del ánodo utilizando diferentes materiales, que permiten la adhesión bacteriana y la transferencia de electrones a la superficie del ánodo. Estos métodos de modificación incluyen tratamientos de superficie físicos o químicos. Los materiales comúnmente utilizados y que reúnen estas características son electrodos de carbón (grafito) (Calignano et al., 2015; Rahimnejad et al., 2015). Los microorganismos desempeñan un papel muy importante en el material anódico (Park et al., 2014), el ánodo debe cumplir con los siguientes requisitos: alta conductividad, no corrosividad, alta área de contacto, alta porosidad, económico y de fácil manufactura. Al igual que con los electrodos catódicos, los materiales de carbón son los más utilizados, tales como: papel de carbón, fieltro de carbón y tela de grafito (López, 2013).

1.6. Sustratos utilizados en una CCM

El tipo de sustrato es un parámetro fundamental en el rendimiento de una CCM, ya que su contenido orgánico puede mejorar o inhibir producción de electricidad. Las aguas residuales son uno de los sustratos que se utilizan comúnmente (Omeroglu y Sanin, 2015). Los principales combustibles metabólicos son los carbohidratos, ácidos grasos y los aminoácidos, estos últimos son los monómeros de alta complejidad contenidos en las aguas residuales. Algunas fuentes de combustible para la generación de electricidad se obtienen a partir de la biomasa lignocelulósica, como residuos agrícolas y biomasa leñosa, las cuales tienen una alta consideración debido a su fácil disponibilidad para ser utilizados como sustrato (Pandey et al., 2016). Los sustratos simples como la glucosa y el acetato

eran de uso general, pero en los últimos años las investigaciones se han centralizado en la utilización de sustratos menos convencionales, con el fin de aprovechar la biomasa presente en aguas residuales de diferentes fuentes para su depuración (Revelo et al., 2013). Hay que tener en cuenta diversos factores para optar por el sustrato a utilizar, así como también el costo, los sustratos puros son más costosos por los procesos de producción, mientras que los sustratos complejos (residuos) son obtenidos de desecho industriales o domésticos que están disponibles en grandes cantidades, además de ser de fácil obtención y económicamente accesibles. La concentración del sustrato es otro factor, pues es responsable de las reacciones enzimáticas que suceden en el interior de la celda. Algunos autores han observado que el incremento de la concentración del sustrato aumenta la velocidad de reacción, el resultado es una mayor generación de energía, pero otros autores han identificado efectos contrarios y elevadas densidades de potencia a pequeñas concentraciones (Sharma, 2010; Guambo y Allauca, 2015).

De acuerdo con Cervantes (2011) y López (2013) algunos de los sustratos que se han utilizado en el estudio de celdas de combustible microbianas son:

- Acetato
- Glucosa
- Biomasa lignocelulósica
- Agua residual sintética
- Aguas residuales de la industria cervecera
- Aguas residuales para la producción de almidón

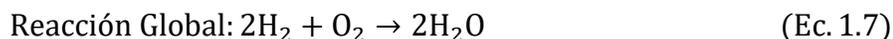
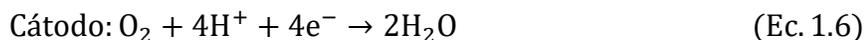
En la Tabla 1.2 se presentan algunos estudios realizados por investigadores, en los que experimentaron con celdas de combustible microbianas con diferentes enfoques, en algunos casos el material de estudio fue el sustrato utilizado, el tipo de membrana, diferentes materiales como cátodo y ánodo, diferentes inóculos, entre otros factores. Se puede observar que los resultados de generación de voltajes y remociones de DQO son variados, esto es debido a las diferentes formas de operación además de los diferentes diseños de las celdas. Dong et al. (2015), realizó un estudio con CCM tipo PEM de una cámara, en las que la alimentación fue continua y en lote, usando agua residual municipal y agua sintética. Reportaron una remoción de materia orgánica de 93 y 91 %. Yamashita et al. (2006), alcanzaron una alta generación de electricidad de 1063 mW/m² utilizando una membrana de intercambio catiónico SELEMION. Tran et al. (2016), realizó un estudio con inóculos de suelo natural, lodos activados y lodos de aguas residuales.

Tabla 1.2. Estudios realizados con celdas de combustible microbianas

Tipo de celda	Sustrato	Alimentación	Materiales	Resultados		Referencia
				Electricidad producida	Remoción de DQO	
CCM tipo PEM	Agua residual sintética	Lote	Utilizaron una celda de una sola cámara, cátodo de tela de carbón con aireación, el cual fue impregnado con 0.5 mg/cm ² de catalizador de Pt, membrana de intercambio catiónico (SELEMION) e inóculo de lodo de semillas.	Electricidad producida	1063 mW/m ²	Yamashita et al., (2016)
				Remoción de DQO	- - -	
	Agua residual sintética	Lote	Ellos utilizaron una celda de dos cámaras, cepillos de fibra de carbón como ánodo y cátodo, una membrana de intercambio catiónico (CMI-7000), como inóculo utilizaron lodo mezclado de una PTAR.	Electricidad producida	350 mW/m ²	Tursun et al., (2016)
				Remoción de DQO	91.2 %	
	Agua residual	Lote	Utilizaron una celda de dos cámaras, ánodo y cátodo de fibra de carbón, como inóculo utilizaron un consorcio microbiano mixto a partir de suelos, en este estudio no se utilizó una membrana de intercambio protónico.	Electricidad producida	179 mV	Logroño et al., (2016)
				Remoción de DQO	- - -	
	Agua residual	Lote	Como ánodo utilizaron una placa rígida de grafito, como cátodo utilizaron fieltro de carbón aunado a un alambre de platino como catalizador, como inóculo utilizaron diferentes sedimentos de embalses.	Electricidad producida	69.14 mW/m ²	Lee et al., (2016)
				Remoción de DQO	- - -	
	Agua residual- Agua residual sintética	Continuo-Lote	Como electrodo utilizaron cepillos de fibra de carbón, el cátodo fue impregnado con titanio, el inóculo utilizado fue el efluente de otra CCM, la celda usada fue de una sola cámara.	Electricidad producida	518-427 mW/m ²	Dong et al., (2015)
				Remoción de DQO	93.9%	
	Agua residual sintética	Continuo	Como inóculo utilizaron diferentes tipos de lodos (suelo natural, lodos activados, lodos de aguas residuales, y una mezcla de todos los anteriores), la membrana utilizada fue una de Nafión 117, en este estudio la celda fue de dos cámaras (aeróbica y anaeróbica) y como electrodos utilizaron fieltro de carbón aunado a una varilla de grafito.	Electricidad producida	0.53±0.03 mA	Tran et al., (2016)
				Remoción de DQO	- - -	
	Agua residual sintética	Lote	Utilizaron una membrana de intercambio catiónico SELEMION, impregnaron 0.6 mg/cm ² de Pt sobre el cátodo de carbón, el ánodo fue un cepillo de fibra de grafito y como inóculo tomaron el lodo producido de otra CCM alimentada con agua residual municipal.	Electricidad producida	7.8 mA/cm ²	Kim y Logan, (2013)
				Remoción de DQO	94 %	

1.7. Celdas de combustible de hidrógeno (CCH)

Las celdas de combustible de hidrógeno (CCH) siguen el mismo principio de funcionamiento que una CCM, por lo que una CCH generalmente está constituida por electrodos de carbón y membranas de intercambio de protones. En ésta se utiliza el hidrógeno como combustible, este es una sistema electroquímico que permite, con la ayuda de electrocatalizadores, la recombinación del hidrógeno con el oxígeno para la generación de electricidad (Valverde, 2012). Los iones de oxígeno emigran al ánodo y los iones positivos, o sea el hidrógeno, son atraídos por el cátodo, donde se recombinan en un reacción que completa el circuito produciendo agua creando un diferencial de potencia (voltaje). En muchos casos para la producción de electricidad, la CCH esta acoplada a un electrolizador para la producción de hidrógeno de forma electroquímica, donde éste requiere de alguna entrada de corriente eléctrica para disociar la molécula del agua en oxígeno e hidrógeno. De acuerdo con Logan y Kim, (2011) para lograr electrolizar agua para la producción de hidrógeno se requiere 1.8 V, una vez producido el hidrógeno es alimentado a la CCH para la producción de electricidad. En las Ecuaciones 1.5, 1.6 y 1.7 se muestran las reacciones generales de una CCH.



1.8. Métodos para la producción de hidrógeno

De acuerdo con Dincer y Acar, (2015) existen diferentes métodos para la generación de hidrógeno, algunos son de acuerdo con el tipo de energía que se utiliza y a la materia prima, dentro de esta clasificación existen los métodos de producción de hidrógeno renovables y no renovables, debido a esto, surge la oportunidad de integrar la producción de hidrógeno como un mecanismo sustentable (Lache, 2015).

Valdez y Poggi (2009) mencionan que el hidrógeno puede ser producido de forma química, electrolítica y biológica.

1.8.1. Generación química

El 95% del hidrógeno que se produce mundialmente se obtiene a partir de combustibles fósiles (gas natural, petróleo etc.), principalmente por procesos químicos. En la combustión de estos procesos se forma como subproducto el CO₂,

el cual afecta la problemática del cambio climático, por lo que es necesario optar por procesos con cero emisiones para promover una química sostenible (Riis et al., 2006). Algunos de los procesos químicos para la producción de hidrógeno son mediante la descomposición de gas natural por arco de plasma y el reformado de vapor.

1.8.2. Generación electrolítica

En la tierra existe el hidrógeno en muchas formas moleculares, tales como el agua y sólo el 4% del hidrógeno generado en el mundo proviene de la electrólisis del agua, pero este es un proceso que ha llamado el interés en la investigación debido a su sustentabilidad y flexibilidad para producir energía, además que permite la obtención de hidrógeno en estado puro (Koponen, 2015) no emite SO_x , NO_x y CO_2 por lo que es una fuente de energía renovable (Rashid et al., 2015). La electrólisis consiste en la disociación de la molécula del agua en moléculas de gas de hidrógeno y oxígeno por medio de una corriente eléctrica que se hace pasar a través del agua (Kwasi et al., 2015). Esta técnica produce energía limpia, sin emisiones, ni contaminación mediante la utilización de la electricidad (Rashid et al., 2015).

En la Tabla 1.3 se muestran estudios reportados en la producción de hidrógeno mediante procesos con celdas de electrólisis microbianas, en estos estudios se utilizaron diferentes sustratos como combustible, se observa una variación de volúmenes en los reactores, diferentes materiales como electrodos (fieltro de carbón, papel de grafito entre otros), también utilizaron diferentes membranas y fuentes de inóculos y aplicaron diferentes voltajes para la obtención de hidrógeno mediante la electrólisis del agua.

Tabla 1.3. Estudios de producción de hidrógeno por celdas de electrólisis microbiana (MEC)

Materiales	Inóculo	Volumen del reactor (L)	Voltaje aplicado (V)	Producción de hidrógeno ($\text{mLH}_2/\text{L}\cdot\text{d}$)	Referencia
Papel de carbón, Papel de carbón impregnado con Pt, Membrana de intercambio protónico	Biopelícula	0.18	0.4	18	(Zhang y Angelidaki, 2014)
Fieltro de grafito, Papel de carbón impregnado con Ni, Papel de celulosa	Lodo anaerobio mesofílico	2	0.2-1.4	45	(Gil-Carrera et al., 2013)
Fieltro de grafito, Membrana de polietileno	biopelícula	120	0.6	15	(Heidrich et al., 2013)
Papel de carbón, Acero inoxidable, Membrana de intercambio catiónico	Lodo anaerobio	0.700	0.418	14	(Sun et al., 2009)

Materiales	Inóculo	Volumen del reactor (L)	Voltaje aplicado (V)	Producción de hidrógeno (mLH ₂ /L·d)	Referencia
Cepillo de fibra de grafito, Tela de carbón impregnado con Pt Membrana de intercambio catiónico	Lodo de un sedimentador primario de una PTAR	0.26	0.6	68	(Lu et al., 2009)
Filtro de grafito, Malla de titanio Nafion	Lodo proveniente de otra MEC	0.66	0.6	20	(Rozendal et al., 2006)
Tela de grafito, Papel de carbón impregnado con Pt Membrana de intercambio catiónico	Biopelícula	0.320	0.55	81	(Rivera et al., 2015)

MEC: celda de electrólisis microbiana

Dentro de estos estudios, [Rivera et al. \(2015\)](#), produjeron 81 mLH₂/L·d con un reactor de 0.320 L, utilizaron un cátodo de papel de carbón impregnado con Pt como catalizador y un ánodo de tela de grafito, la cantidad de hidrógeno es baja en comparación con [Sun et al. \(2009\)](#), quienes alcanzaron una producción máxima de 14 mLH₂/L·d utilizando materiales similares, la diferencia puede radicar en las diferentes cantidades de voltaje aplicado. [Gil-Carrera et al., \(2013\)](#), aplicaron una mayor cantidad de electricidad de 1.4 V, alcanzaron una cantidad máxima de 45 mLH₂/L·d, considerando que no utilizaron una membrana de intercambio protónico.

1.8.3. Producción biológica

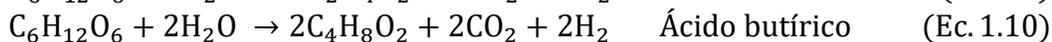
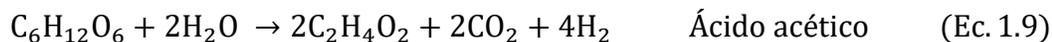
Los procesos anaerobios de tratamientos de aguas residuales ofrecen una posibilidad para la generación de energía de alto rendimiento, además del tratamiento de contaminantes en el agua, por lo que los procesos de fermentación son de sumo interés ([Liu et al., 2016](#)). La producción de hidrógeno de forma biológica se lleva a cabo en la presencia de una enzima que cataliza la reacción entre los electrones y los protones para generar hidrógeno gaseoso. Las enzimas capaces de catalizar esta reacción son las *hidrogenasas* (*Fe-hidrogenasa*, *NiFe-hidrogenasa*). La presencia de estas enzimas depende del tipo de microorganismo inoculado y del proceso utilizado para su producción ([Redondas, 2013](#); [Hallenbeck y Benemann, 2002](#)). La producción biológica de hidrógeno se realiza mediante la fermentación, donde las bacterias a través de su metabolismo producen el biohidrógeno en condiciones anaerobias, ésta se clasifica en fotofermentación y fermentación oscura ([Carvajal, 2009](#)). Existen varios procesos en los cuales ocurren reacciones donde es liberado el hidrógeno o producido como un producto intermedio.

La fotofermentación utiliza microorganismos sensibles a la luz, los cuales producen hidrógeno a través de la digestión de la materia orgánica (ácidos orgánicos) (Reedwood et al., 2012).

En la siguiente reacción se observa la producción de hidrógeno.



La fermentación oscura es la conversión de energía bioquímica almacenada en la materia orgánica a otras formas de energía en la ausencia de luz por parte de bacterias anaerobias. Tiene varias ventajas tales como: la capacidad de producir hidrógeno a partir de residuos orgánicos y por lo tanto controlar y estabilizar residuos biológicos que tienen un peligro potencial de contaminación, este proceso tiene altas tasas de producción de hidrógeno, por lo que al digerir los desechos orgánicos se genera una fuente de energía (Dincer y Acar, 2015). Los ácidos acético y butírico son los subproductos que se forman en la fermentación oscura como se puede observar en las Ecuaciones 1.9 y 1.10.



En la Tabla 1.4 se muestra una serie de experimentos realizados por proceso de fermentación oscura para la producción de hidrógeno, se muestran diferentes condiciones de operación, con las cuales se realizaron los experimentos y los principales resultados obtenidos por diferentes autores.

Tabla 1.4. Producción de hidrógeno por fermentación oscura

Experimentación	Resultados	Referencia
Se utilizó un reactor con alimentación continua. El sustrato que utilizaron fue glucosa, minerales y nutrientes. El reactor se operó por 366 días en 7 fases experimentales. Las 2 iniciales tenían un TRH de 2 h, la tercera varió de 2.5 h y las otras tenían un TRH constante de 0.5 h. Las bacterias se obtuvieron por fermentación natural de agua residual sintética.	La producción de hidrógeno fue de 2.48, 2.15 y 1.81 mol H ₂ /mol de glucosa para concentraciones de 0, 1000 y 2000 mg/L de NaHCO ₃ . El aumento del pH por el NaHCO ₃ afectó la producción de ácidos orgánicos e hidrógeno.	(Leite et al., 2008)
El reactor se alimentó por lote. El inóculo se tomó de un reactor de lecho empacado empleado para producir hidrógeno, el sustrato fue mediante agua sintética basado en sacarosa. Se emplearon tres clases de efluentes: agua residual doméstica, vinaza y glicerina y un control con sacarosa como sustrato, se adicionaron nutrientes a una temperatura de 25°C y un pH 5.5.	La máxima producción hidrógeno fue obtenida de la vinaza equivalente a 25 mmol H ₂ /g DQO. La menor producción se obtuvo con glicerina con 6 mmol H ₂ /g DQO. De acuerdo con evaluación microbiológica encontraron <i>Klebsiella sp</i> consumidora de oxígeno y <i>Bacteroides sp</i> productora de hidrógeno.	(Soares et al., 2010)

Experimentación	Resultados	Referencia
El reactor se operó en lote. El inóculo se obtuvo de un reactor UASB, realizaron un pretratamiento a 90°C por 15 min. Emplearon cuatro sustratos que contenían xilosa en triplicado con concentraciones de 630, 1341, 1848 y 3588 mg/L respectivamente, urea, peptona y solución de vitamina y suplemento de nutrientes a una temperatura de 37°C, a un pH de 5.5.	La adición de peptona favoreció el crecimiento de bacterias productoras de hidrógeno. El análisis genético mostró que el 57% de los microorganismos pertenecían al género <i>Clostridium</i> , 30% al <i>Burkholderia</i> , 8% a <i>Klebsiella</i> y 5% bacterias no cultivadas. La concentración de xilosa de 3588 mg/L generó los mejores resultados en producción de hidrógeno con 12882.9 $\mu\text{mol H}_2/\text{L}$ y rendimiento 0.8 mol H_2/mol de xilosa.	(Maintinguer et al., 2011)
El reactor se operó en lote. El inóculo fue tomado de estiércol de elefante. El sustrato fue de agua sintética con 10 g/L de glucosa y nutrientes: NH_4HCO_3 , KH_2PO_4 , $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, NaCl , $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ y FeCl_2 a una temperatura de 37°C.	La máxima producción de hidrógeno en términos de rendimiento fue 0.84 mol H_2/mol de azúcar total y 109.55 mL $\text{H}_2/\text{L} \cdot \text{d}$, respectivamente, obtenido con un pH inicial de 6.5 y concentración de sustrato de 10 g/L.	(Fangkum y Reungsang, 2011)
El reactor se operó en lote. El inóculo fue proveniente de PTAR. El sustrato se basó en 11.700 g de Glucosa. Los nutrientes fueron extracto de levadura, NaHCO_3 , NH_4Cl , Na_2HPO_4 , KH_2PO_4 , $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, $\text{MnSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ a una temperatura 36°C.	El valor del pH en el efluente varió desde 5.7 a 6.3. La cantidad de bacterias anaerobias en general aumentó (formadoras de esporas del género <i>Clostridium</i>), las reductoras de sulfatos disminuyeron. Cuando se incrementó de 2 a 10 h el TRH el contenido de hidrógeno disminuyó de 12 a 9%.	(Nakamura et al., 2003)

1.9. Reacciones en la producción y consumo de hidrógeno

En la Tabla 1.5 se observan las reacciones donde participan diferentes reactivos para la producción y consumo de hidrógeno por fermentación oscura. En el tipo de reacción se incluye la fermentación y la oxidación anaerobia (etapa metanogénica y acetogénica). Los productos generados además del hidrógeno son el butirato y el acetato. En el consumo del hidrógeno participan las bacterias metanogénicas, acetogénicas y sulfurreductoras. El valor de la energía libre de Gibbs muestra que las reacciones ocurren de forma espontánea (-) y natural (+).

Tabla 1.5. Reacciones de producción y consumo de hidrógeno por fermentación oscura (Valdez y Poggi, 2009)

Tipo de reacción	Reacción	Energía libre de Gibbs (KJ/reacción)
Fermentación	$\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6 + 2\text{H}_2\text{O} \rightarrow 2\text{H}_2 + \text{butirato} + 2\text{HCO}_3^- + 3\text{H}^+$	-135
Fermentación	$\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6 + 4\text{H}_2\text{O} \rightarrow 4\text{H}_2 + 2\text{acetato} + 2\text{HCO}_3^- + 4\text{H}^+$	-207
Oxidación anaerobia (sintropía)	$\text{Butirato} + 2\text{H}_2\text{O} \rightarrow 2\text{H}_2 + 2\text{acetato} + \text{H}^+$	+48.2
Oxidación anaerobia (sintropía)	$\text{Propionato} + 3\text{H}_2\text{O} \rightarrow 3\text{H}_2 + \text{acetato} + \text{HCO}_3^- + \text{H}^+$	+76.2
Metanogénesis	$4\text{H}_2 + \text{HCO}_3^- + \text{H}^+ \rightarrow \text{CH}_4 + 3\text{H}_2\text{O}$	-135

Tipo de reacción	Reacción	Energía libre de Gibbs (KJ/reacción)
Acetogénesis a partir del CO ₂ y H ₂	$4\text{H}_2 + 2\text{HCO}_3^- + \text{H}^+ \rightarrow \text{acetato} + 4\text{H}_2\text{O}$	-105
Sulfato-reducción	$4\text{H}_2 + \text{SO}_4^{2-} \rightarrow \text{HS}^- + 3\text{H}_2\text{O} + \text{OH}^-$	NA
NA: no aplica		

1.10. Inhibición de bacterias metanogénicas

En la producción de hidrógeno en sistemas de fermentación oscura y digestión anaerobia, el hidrógeno puede ser consumido por las bacterias metanogénicas, por lo que es indispensable inhibir específicamente los metanógenos sin afectar adversamente las bacterias exoelectrógenas (Liu et al., 2011). Por lo que es necesario disminuir la actividad de este tipo de bacterias (Reyes-Contreras y Vidal, 2015). Existen pretratamientos para seleccionar a las bacterias productoras de hidrógeno, algunos de los métodos son: choque térmico, ácido, base, aireación, cloroformo entre otros (Wang y Wan, 2008). Estos tratamientos se realizan para someter a los microorganismos a condiciones de estrés que permiten seleccionar bacterias que puedan adaptarse a las nuevas condiciones.

1.11. Bacterias productoras de hidrógeno y rutas metabólicas

Bacterias termofílicas como las del género *Clostridium* y *Enterobacter* pueden llevar a cabo la producción de hidrógeno por fermentación oscura. En la generación de hidrógeno son muy utilizadas este tipo de bacterias como inóculo de cultivo puro o mixto (Arslan et al., 2015). Las bacterias del género *Clostridium* son Gram positivas, baciloformes (forma de bastón), se desarrollan en un ambiente estrictamente anaerobio y son formadoras de esporas cuando se someten a condiciones de estrés (altas temperaturas y pH bajo) (Bastidas-Oyanedel et al., 2015). Sin embargo, las especies del género *Enterobacter* son Gram negativas, baciloformes, anaerobias facultativas y no formadoras de esporas. La mayoría de los estudios que emplean cultivos puros de bacterias para la producción fermentativa de hidrógeno utilizan glucosa como sustrato (Wang y Wan, 2009). Se ha encontrado que un buen cultivo mixto de bacterias productoras de hidrógeno habitan en ambientes como suelo, aguas residuales, compostas y lodo anaerobio (Redondas, 2013). Estas fuentes de cultivo mixto de bacterias provenientes de estos ambientes pueden ser utilizadas como inóculo para los procesos de producción de hidrógeno (Wang y Wan, 2009). La producción de hidrógeno por fermentación oscura se puede llevar a cabo tanto con cultivos puros y mixtos, con gran variedad de cepas.

En la Tabla 1.6 se muestran algunos géneros de los microorganismos productores de hidrógeno. Con respecto a los cultivos con cepas puras de microorganismos, se tienen referenciados algunos géneros y especies de bacterias muy estudiadas. Dentro de los microorganismos anaerobios estrictos, los cuales son muy sensibles a la presencia de oxígeno, se encuentra el género *Clostridium*, además de bacterias del rumen, termófilos y metanógenos. El género *Clostridium* ha sido uno de los más estudiados, tanto en cultivo por lotes como en continuo (Bedoya et al., 2007).

Tabla 1.6. Microorganismos productores de hidrógeno

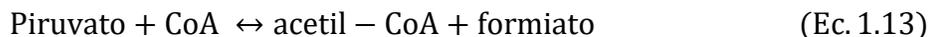
Tipo de inóculo	Microorganismos
Cultivo puro	<i>Clostridium</i>
	<i>Enterobacter</i>
	<i>Bacillus</i>
	<i>Escheriquia coli</i>
	<i>Rhodobacter sphaeroides</i>
Cultivo mixto	<i>Clostridium</i>
	<i>Ruminococcus albus</i>
	<i>Spirocheta</i>
	<i>Anaerocellum</i>
	<i>Caldicellulosiruptor</i>
	<i>Dictyoglomus</i>
	<i>Fervidobacterium</i>
	<i>Thermoanaerobacter</i>
	<i>Thermotoga</i>

En ambientes anaerobios, los protones se recombinan con los electrones mediante la catálisis de la enzima *hidrogenasa* (Argun y Kargi, 2011). Las bacterias anaerobias no necesitan la energía luminosa para fermentar sustratos orgánicos. La degradación de estos compuestos se realiza mediante diferentes rutas metabólicas presentes en distintos microorganismos, cada uno con un comportamiento fisiológico distinto. La primera etapa en la formación de hidrógeno es la hidrólisis de materiales particulados complejos en materiales disueltos más simples, en este punto la glucosa es utilizada como sustrato por bacterias fermentativas hidrolíticas. Durante este proceso se desarrollan reacciones enzimáticas donde la glucosa es convertida en ácido pirúvico mediante la vía

metabólica de glucólisis (vía Embden-Meyerhof-Parnas). En la Ecuación 1.11 se muestra la reacción donde se producen moles de hidrógeno a partir del dinucleótido de nicotinamida adenina reducido (NADH) (Ntaikou et al., 2010).



Posteriormente el ácido pirúvico es transformado por el proceso de descarboxilación oxidativa a través de la coenzima acetil-CoA que dependiendo del sistema catalítico que tengan los microorganismos puede ser metabolizada en acetato, butirato o formiato de los cuales se generan entre 2 o 4 moles de H_2 /mol de glucosa consumida (Valentine et al., 2000; Blanco y Rodríguez, 2012), por lo tanto de esta forma el acetil-CoA se puede generar mediante la siguiente reacción (Ecuación 13).



El acetil-CoA también puede ser metabolizado en otro subproducto como el acetato, o a butirato y en ambos procesos de la reoxidación de los moles de ferredoxin se genera un mol de hidrógeno mediante la catálisis enzimática. En el caso de que el acetato sea el producto final, se genera un mol extra de H_2 de la reducción de cada mol de NADH a NAD^+ formando una producción de H_2 total de 4 moles/mol de glucosa. En el caso de que el butirato sea el producto final, el NADH es utilizado para la oxidación del acetil-CoA a butirato, la producción de H_2 será de 2 moles/mol de glucosa. La producción simultánea de acetato y butirato dependerá de las condiciones del cultivo y del tipo de microorganismo para la producción de H_2 , (Blanco y Rodríguez, 2012). De acuerdo con Chen et al. (2006), la vía del ácido acético permite una mayor producción de hidrógeno que la del ácido butírico. La producción de hidrógeno por mol de glucosa es 2-3 moles de hidrógeno por mol de hexosa (Hallenbeck y Benemann, 2002; Redondas, 2013). Para lograr mayores rendimientos de hidrógeno debe ser evitada la producción de etanol, ácido propiónico y ácido láctico ya que consumen intermedios bioquímicos hidrogenados como el NADH (Venkata et al., 2008; Aceves-Lara et al., 2008; Redondas, 2013).

La Figura 1.3 muestra las rutas metabólicas para la producción de hidrógeno con la formación de acetato y butirato como productos finales de la fermentación oscura partir de la glucosa.

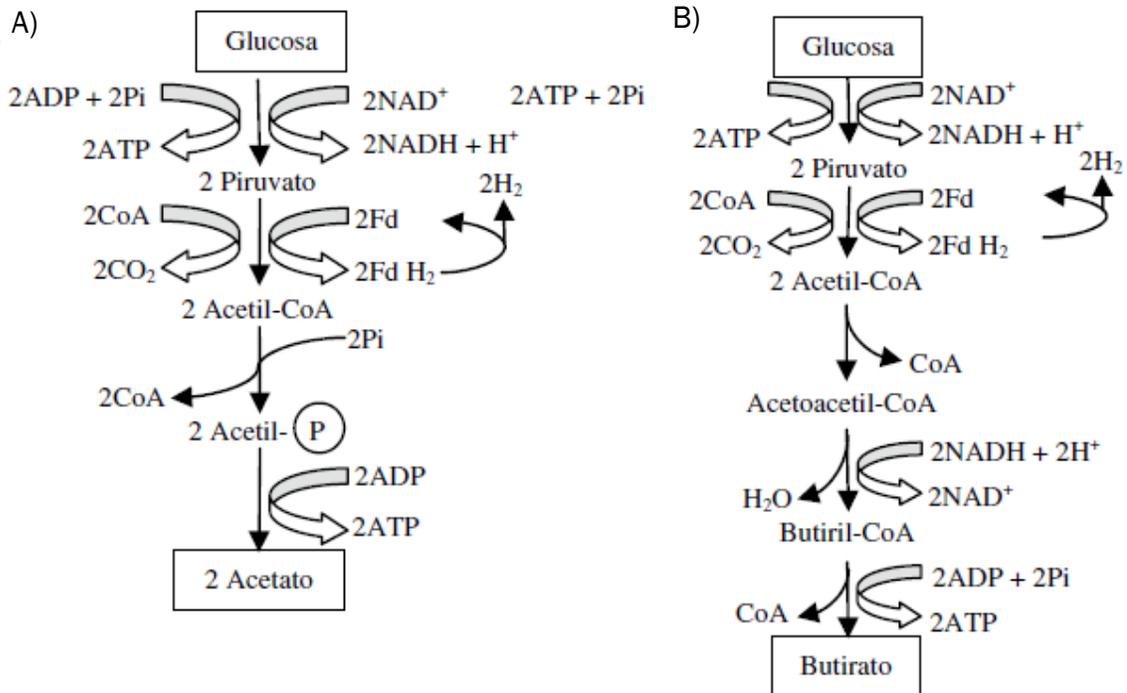


Figura 1.3. Generación de hidrógeno con producción de acetato (A) y butirato (B) a través de la ruta de la glucólisis (Ntaikou et al., 2010)

En la Tabla 1.7 se muestran las especies de las bacterias *Clostridium* que participan en la digestión anaerobia a partir de diferentes sustratos. Los productos de la fermentación en general son: butirato, acetato, CO₂, H₂, butanol, etanol, acetona, acetoína, propionato y 2-propanol.

Tabla 1.7. Bacterias *Clostridium* que participan en la fermentación

Especie de <i>Clostridium</i>	Sustrato	Productos de la fermentación
Producción de ácido butírico. <i>C. butyricum</i> <i>C. tyrobutyricum</i> <i>C. pasteurianum</i> <i>C. pectinovorum</i>	Glucosa, almidón, dextrina Glucosa, lactato Glucosa, almidón, manitol Pectina, almidón glucógeno	Butirato, acetato, CO ₂ , H ₂ Butirato, acetato, CO ₂ , H ₂ Butirato, acetato, CO ₂ , H ₂ Butirato, acetato
Producción de butanol <i>C. butylicum</i> <i>C. acetobutylicum</i>	Glucosa Glucosa, glicerina, piruvato	Butirato, acetato, butanol, 2-propanol, CO ₂ , H ₂ Butirato, acetato, butanol, acetona, etanol, CO ₂ , H ₂
Producción de ácido propiónico <i>C. propionicum</i>	Alanita, piruvato	Acetato, propionato, CO ₂

1.12. Factores que afectan a la producción de hidrógeno por fermentación

En la producción de hidrógeno existen factores que afectan el rendimiento, entre ellos están el sustrato, el pH, la temperatura, el tiempo de retención hidráulico (TRH), la carga orgánica (CO) y la presión parcial de hidrógeno (Ghimire et al., 2016; Redondas, 2013). Los siguientes factores son considerados importantes en este estudio.

- Sustrato: El tipo de sustrato es vital en el estudio de las condiciones de producción de hidrógeno. Muchos estudios de digestión anaerobia por fermentación oscura han utilizado carbohidratos, tales como: la glucosa, sacarosa, almidón y celulosa. Otros sustratos también han sido utilizados como la maltosa, lactosa y galactosa. El sustrato más adecuado para la producción de hidrógeno son los carbohidratos, seguidos de las proteínas, las aguas residuales son ricas en carbohidratos y también contienen proteínas, por lo tanto pueden ser utilizadas para la producción de hidrógeno (Ghimire et al., 2016; Redondas, 2013).
- pH: De acuerdo con Liu (2008) el nivel de pH afecta la actividad enzimática en los microorganismos, esto debido a que las enzimas son activas sólo en un determinado rango de pH y tienen una actividad máxima a su pH óptimo. El correcto pH es un parámetro fundamental para altos rendimientos en la producción de hidrógeno por fermentación. (Bastidas-Oyanedel et al., 2012 y 2015). Liu et al. (2006) reportó que el pH óptimo para la generación de hidrógeno por fermentación es alrededor de 5 o 5.5. Con valores de pH inferiores a 5.5 se induce a que la enzima *formatodeshidrogenasa* catalice la descomposición de ciertos productos en hidrógeno (Bastidas-Oyanedel et al., 2012).
- Temperatura: La producción de hidrógeno mediante digestión anaerobia se puede llevar a cabo con la presencia de bacterias mesófilas (*Clostridium*, *Enterobacter*) a una temperatura alrededor de 35°C, las temperaturas inferiores a 35°C puede disminuir la velocidad de la fermentación. Se ha demostrado tener un buen rendimiento en la conversión de sustrato y producción de hidrógeno en un rango de temperatura de 33 a 41°C (Bastidas-Oyanedel et al., 2015).
- El tiempo de retención hidráulico (TRH): El TRH es un factor importante en la selección de microorganismos. Un tiempo prolongado de fermentación es desfavorable para la producción de hidrógeno cuando se utiliza agua residual real como sustrato, ya que el aporte de bacterias presentes en el agua residual real favorece el crecimiento y desarrollo de metanógenos. Cuando se trabaja con agua sintética es permisible manejar altos tiempos de retención (Chandrasekhar y Lee, 2015).

CAPÍTULO 2. OBJETIVOS, HIPÓTESIS Y JUSTIFICACIÓN

2.1. Objetivo general

- Evaluar el desempeño de un sistema híbrido constituido por una CCM productora de hidrógeno (CCM-H₂) acoplado a una CCH para la producción de electricidad

2.2. Objetivos particulares

- Determinar los perfiles de voltaje, corriente y potencia eléctrica en una CCM-H₂ y la producción de voltaje en una CCH
- Comparar la producción de electricidad de la CCM-H₂ y CCH
- Evaluar la producción de hidrógeno en la CCM-H₂ con diferentes TRH
- Determinar las comunidades microbianas soportadas sobre el ánodo de la CCM-H₂

2.3. Hipótesis

- El sistema CCM-H₂ generará simultáneamente bio-electricidad y bio-hidrógeno. El bio-hidrógeno generado por el sistema CCM-H₂ será suficiente para ser utilizado como combustible en una CCH para la producción de electricidad

2.4. Justificación

El estudio con celdas de combustible microbianas y con reactores productores de hidrógeno es de interés en la producción de electricidad, debido a la elevada potencialidad de producción de energía. Tanto la CCM como la CCH son tecnologías emergentes e innovadoras, existe una gran variedad de reportes enfocados al uso e investigación de éstas, pero no se han determinado las condiciones óptimas de operación y construcción. Investigadores explican que el desempeño de las celdas de combustible depende mucho de su arquitectura, son pocos los estudios que revelan formas o características de optimización y perspectivas para mejorar el desempeño de generación de electricidad de las celdas de combustible.

Otro punto a favor de las celdas de combustible microbianas y en reactores productores de hidrógeno, es que también son tecnologías prometedoras para el tratamiento de aguas residuales ya sea de tipo domésticas o industriales, con las que se han obtenido altas remociones de materia orgánica, de hasta un 90%.

Una de las limitantes es la baja producción de electricidad en este tipo de sistemas electroquímicos, por lo que este tipo de dispositivos se pretende utilizar para satisfacer demandas energéticas de baja magnitud, especialmente en áreas remotas que incluso no cuentan con sistema de tratamiento de aguas residuales.

El fin de realizar investigaciones con tecnologías renovables es evitar el uso de las energías convencionales que provocan daños al ambiente. Por ello es importante diseñar e implementar nuevas formas para la obtención de electricidad a partir de diferentes mecanismos. Este trabajo evaluó la producción simultánea de electricidad y bio-hidrógeno en un solo reactor bio-electroquímico sin la necesidad de utilizar una corriente externa para la producción del bio-combustible. El bio-hidrógeno generado por el reactor bio-electroquímico sirvió como combustible para una CCH en el cual se obtuvo electricidad a partir del bio-hidrógeno.

CAPÍTULO 3. METODOLOGÍA

3.1. Estructura del sistema híbrido

3.1.1. CCM-H₂

En esta investigación se utilizó una CCM tipo PEM de material de acrílico con un volumen de 10 L (19 cm de largo x 17 cm de ancho x 30 cm de alto), en la parte inferior de la celda se encuentra la entrada de agua de alimentación, en la parte superior frontal, se encuentra la salida del efluente de agua residual/sintética. La salida de biogás producido en la cámara de la celda, fluyó en la parte superior mediante un tubo de salida conectado a una campana de acrílico, donde fue captado y conducido a una bolsa para biogás atravesando un sensor de biogás de una microturbina Flo-Sensor McMillan100, donde su función fue registrar la producción de biogás en el sistema en mL/min, también se midió el flujo de biogás por el método de desplazamiento de agua. Para la captación de bio-hidrógeno se utilizó una bolsa para biogás en la que fue almacenado. En los extremos transversales la celda cuenta con cubiertas de acrílico para los electrodos catódicos, estas cubiertas tienen 4 orificios de 3 cm de diámetro, los cuales permiten la entrada de oxígeno (aire) por contacto natural del ambiente al cátodo donde reacciona con los protones y electrones cerrando el circuito. Los dos cátodos están ubicados en parte externa de la celda, ambos están constituidos por tres materiales, una tela de grafito (Brunssen Inc. México) de 0.0135 m² de área superficial, una membrana de intercambio catiónico (CMI-7000, Membrane International Inc. USA) de 0.0135 m² de área superficial y una placa de cobre con un área de 0.003 m² el cual funciona como recolector de electrones y protones, los cátodos fueron contactados entre sí con cable de cobre para formar solo uno. Como ánodo se utilizaron 3 fieltros de carbón (Brunssen Inc. México), apilados y conectados entre sí, todos con un área superficial de 0.0098 m², además se conectó un alambre de cobre que comunicó a los tres fieltros de carbón formando uno solo recolector de electrones. El ánodo se colocó de forma horizontal en la parte central inferior dentro de la celda. La distancia entre los electrodos es de 8 centímetros.

Tanto el cátodo como el ánodo se conectaron a una tarjeta de adquisición de datos Arduino y un banco de resistencia a una computadora donde se registraron los voltajes. La microturbina que midió el flujo de biogás también se conectó a la tarjeta de Arduino del circuito externo. El voltaje a circuito cerrado (1000 Ω) y el flujo de biogás fueron monitoreados en tiempo-real registrando muestras cada 5 h a través del sistema de adquisición de datos en el programa Labview.

En la Figura 3.1 se muestra la estructura de la CCM-H₂, así como la composición de los electrodos y el sistema de adquisición de datos.

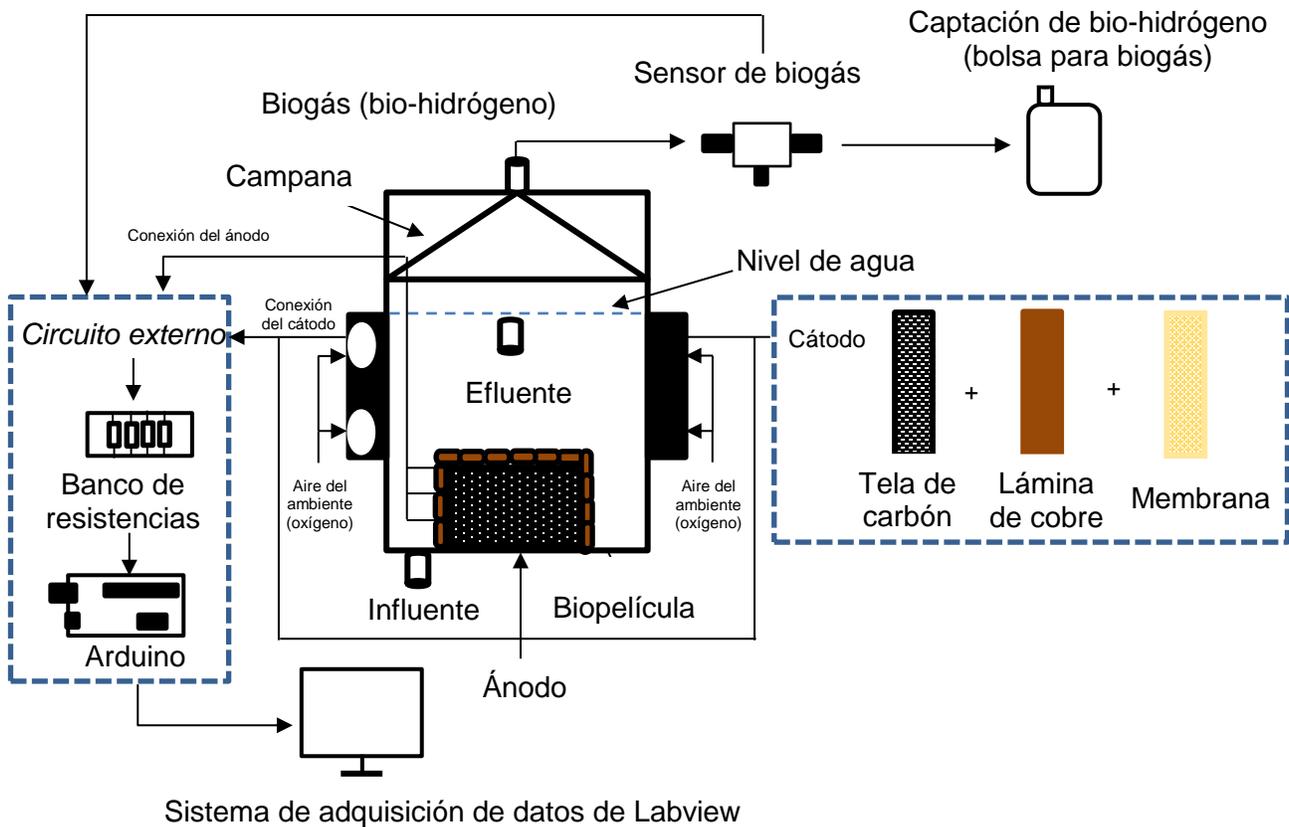


Figura 3.1. Estructura de la CCM-H₂

3.1.1.1. Acondicionamiento del cátodo

Para el acondicionamiento del cátodo es necesario eliminar las posibles impurezas que pudieran tener los materiales, para ello las telas de grafito fueron sumergidas en una solución 1 N de HCl y una solución 1N de NaOH durante 2 h, finalmente fueron lavadas con agua desionizada y secadas en una estufa RedLINE durante 2 h. Una vez limpias las telas de grafito se realizó la técnica de electrodeposición del catalizador, mediante prueba se impregnó Pb sobre la superficie de las telas de grafito, este proceso se realizó para acelerar las velocidades de reacción que ocurren en el cátodo. Esta técnica consistió en la preparación de una solución electrolítica en la cual se disolvió 68 mg de PbO₂, donde se impregnó 0.5 mg/cm², por lo que 68 mg corresponde a la cantidad necesaria para impregnar una tela de grafito con un área de 135 cm² (0.0135 m²), también se agregó 2 g/L de NaCl, el pH se ajustó a 2.7 con ácido sulfúrico al 98 %, la solución se agitó en una parrilla marca CORNING durante 30 min. La solución electrolítica se colocó en un

recipiente de acrílico que cuenta con aperturas para colocar electrodos, como ánodo se utilizó una placa de aluminio y el cátodo una tela de grafito. Se conectaron los electrodos en forma paralela a una fuente de poder marca SORENSEN con una distancia de 2 cm entre ambos siendo el cátodo el material a recubrir. La energía para llevar a cabo este proceso fue de 0.3 Volts y 0.6 amperes durante 20 min. Finalmente se introdujo la solución con la tela de grafito a la estufa a una temperatura de 110°C para secar el electrodo durante un tiempo de 72 horas. En la Figura 3.2 se observa el proceso de la electrodeposición.

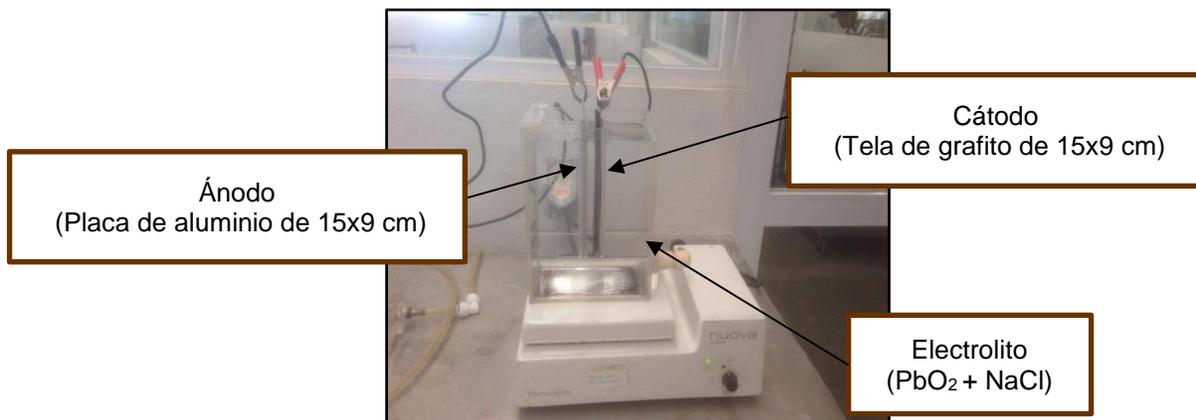


Figura 3.2. Electrodeposición con PbO₂

3.1.2. CCH

Se utilizó una CCH tipo PEM marca H-TEC, modelo PEMFC kit Item No. F107. En los extremos esta celda cuenta con tubos y conectores para la entrada y salida de hidrógeno y oxígeno, las cubiertas son de material acrílico las cuales están perforadas con tornillos que sujetan la celda, en el interior tiene dos electrodos; un cátodo laminado de carbón con catalizador de platino y un ánodo laminado de carbón y una membrana de intercambio protónico, todos con un área superficial de 0.0016 m², los electrodos son dirigidos hacia la parte superior, donde se mide la electricidad. Esta celda tiene una potencia nominal de 600 mW (H₂/O₂) y 200 mW (H₂/aire), el voltaje máximo que puede generar la CCH es de 1 V. Como fuente de alimentación se utilizó el hidrógeno producido biológicamente por la CCM-H₂ y como fuente de oxígeno se utilizó aire controlado con un medidor de flujo a 500 mL/min. Los voltajes producidos fueron medidos con un multímetro, inyectando volúmenes de muestra de 50 mL con una jeringa después de cada fase de experimentación de TRH. En la Figura 3.3A se observa la celda de combustible de hidrógeno y su estructura, en la Figura 3.3B se observa la CCH real que se utilizó en este trabajo, donde el puerto de color rojo corresponde al ánodo, el cual cuenta

con un tubo de entrada de oxígeno y del lado opuesto se encuentra un puerto color azul que corresponde al cátodo, donde también cuenta con un tubo de entrada de hidrógeno.

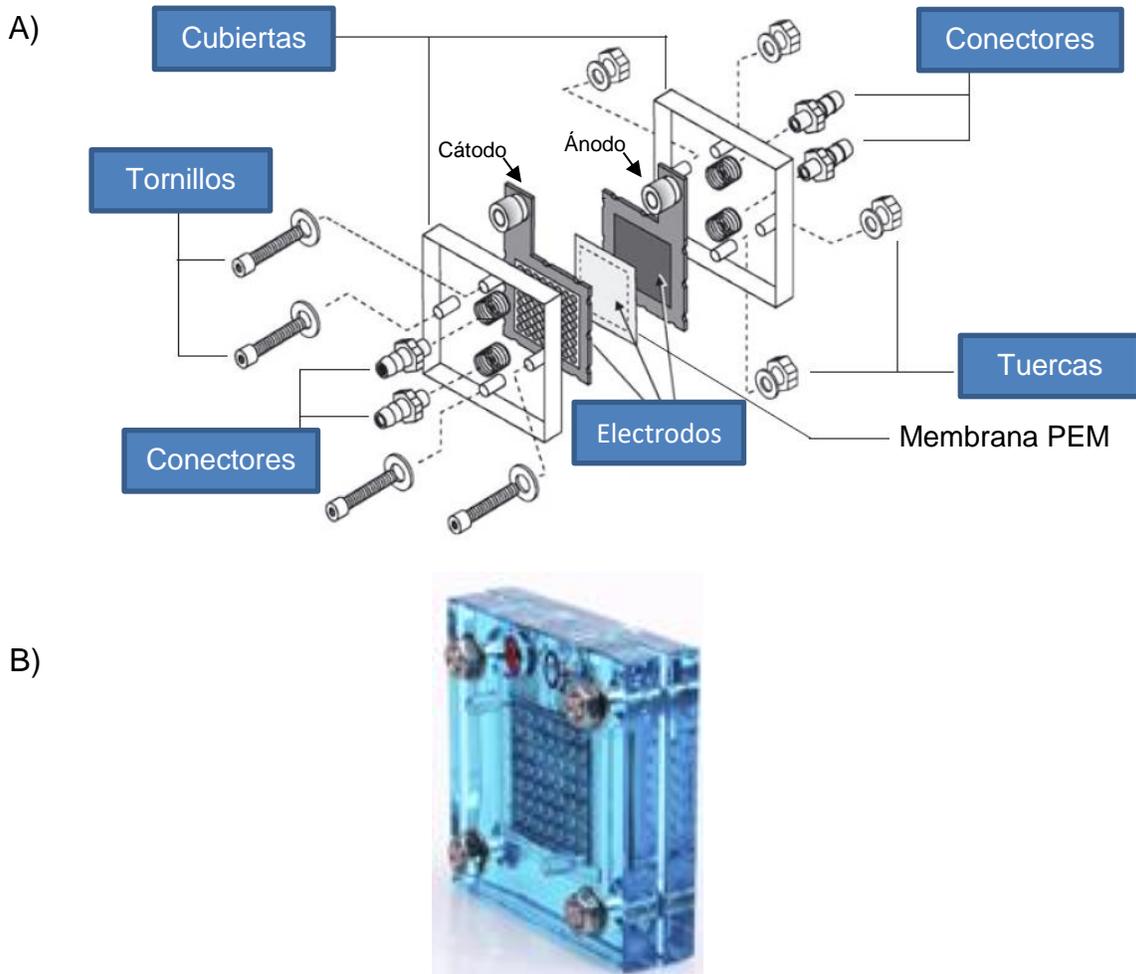


Figura 3.3. Partes de una CCH (A), y la CCH real (B)

3.2. Procedimiento experimental

3.2.1. Configuración del sistema híbrido y operación

La operación de la CCM-H₂ se divide en tres etapas, las primeras dos fueron operadas en modo continuo y la tercera se operó en lote. La primera etapa fue el arranque y acondicionamiento, donde el reactor operó con agua residual municipal durante 38 d, en este tiempo se observó el crecimiento de la biopelícula sobre las paredes del ánodo, la cual se consideró como el primer inóculo (I1). El pH se ajustó a 5.5, con una temperatura de 32°C y un TRH de 8 d. Durante la operación se midieron los parámetros de voltaje y DQO hasta llegar a una estabilización.

Posteriormente se realizó un pretratamiento térmico-ácido para la preparación de dos inóculos adicionales.

La segunda etapa es la evaluación del sistema operado en continuo, esta tuvo una duración de 110 d, en este caso la CCM-H₂ se operó con agua sintética. Se adicionaron dos nuevos inóculos: bacterias puras (+I2) y una mezcla de lodos anaerobios pretratados térmicamente (+I3), ambos fueron adicionados en forma de bioaumentación, por lo que fueron estudiados de forma conjunta. Inmediatamente después de haber inoculados las bacterias puras, inició la alimentación con agua sintética. En esta etapa el reactor se operó con un pH de 6.5 y una temperatura de 32°C. Después de que los inóculos se aclimataron al nuevo sustrato y a las condiciones de operación se evaluaron tres fases con diferentes TRH de 8 4 y 1 d. En las etapas 1 y 2 se dio seguimiento a las mediciones de bio-hidrógeno, voltaje y parámetros analíticos.

Al finalizar la evaluación de la CCM-H₂ con los diferentes TRH, el agua sintética contenida en la celda fue remplazada al 100 % por nueva agua. Cuando el reactor fue llenado nuevamente comenzó la evaluación de la tercera etapa, esta fue operada en modo lote, tuvo una duración de 14 d, donde solo se monitoreo el voltaje y la producción de bio-hidrógeno. En la Tabla 3.1 se muestra el procedimiento experimental que comprende la operación de la CCM-H₂, donde se pueden observar las etapas, el tipo de agua de alimentación, los parámetros operacionales y de evaluación, los tiempos de operación y los inóculos utilizados en el reactor, donde +I2 y +I3 representa la adición de los inóculos al anodo

Tabla 3.1. Procedimiento experimental

Etapa experimental	Tipo de agua	Tipo de inóculo	TRH (d)	Caudal (mL/min)	pH	Temperatura (°C)	Días de operación	Parámetros de evaluación o monitoreo
Arranque y desarrollo de biopelícula alimentando con agua residual real operado en continuo (Etapa 1)	Agua residual municipal	I1	8	0.6	5.5	32	0-38	Voltaje, bio-hidrógeno y parámetros analíticos
Evaluación del sistema alimentando con agua sintética operado en continuo (Etapa 2)	Agua sintética	+I2	8	0.6	6.5	32	39-56	Voltaje, bio-hidrógeno y parámetros analíticos
	Agua sintética	+I3	8	0.6	6.5	32	57-92	
	Agua sintética	Mezcla de inóculos	4	1.2	6.5	32	93-129	
	Agua sintética	Mezcla de inóculos	1	4.8	6.5	32	130-149	
Evaluación del sistema alimentando con agua sintética operado en lote (Etapa 3)	Agua sintética	Mezcla de inóculos	---	---	6.5	32	150-164	Voltaje y bio-hidrógeno
I1: Inóculo 1 (Biopelícula desarrollada con la alimentación de agua residual municipal) I2: Inóculo 2 (Bacterias puras) I3: Inóculo 3 (Mezcla de lodos anaerobios pretratados)								

Al finalizar la evaluación de la CCM-H₂, el bio-hidrógeno almacenado en las bolsas para biogás de cada fase (TRH de 8, 4 y 1 d) fue inyectado en el cátodo de la CCH. En el ánodo se inyectó oxígeno (aire) mediante un medidor de flujo de aire. Al aplicar ambos gases simultáneamente sobre los electrodos de la CCH se produjo electricidad, donde se midió el voltaje con un multímetro. En la Figura 3.4 se observa el diagrama general que compone todo el sistema híbrido de este estudio.

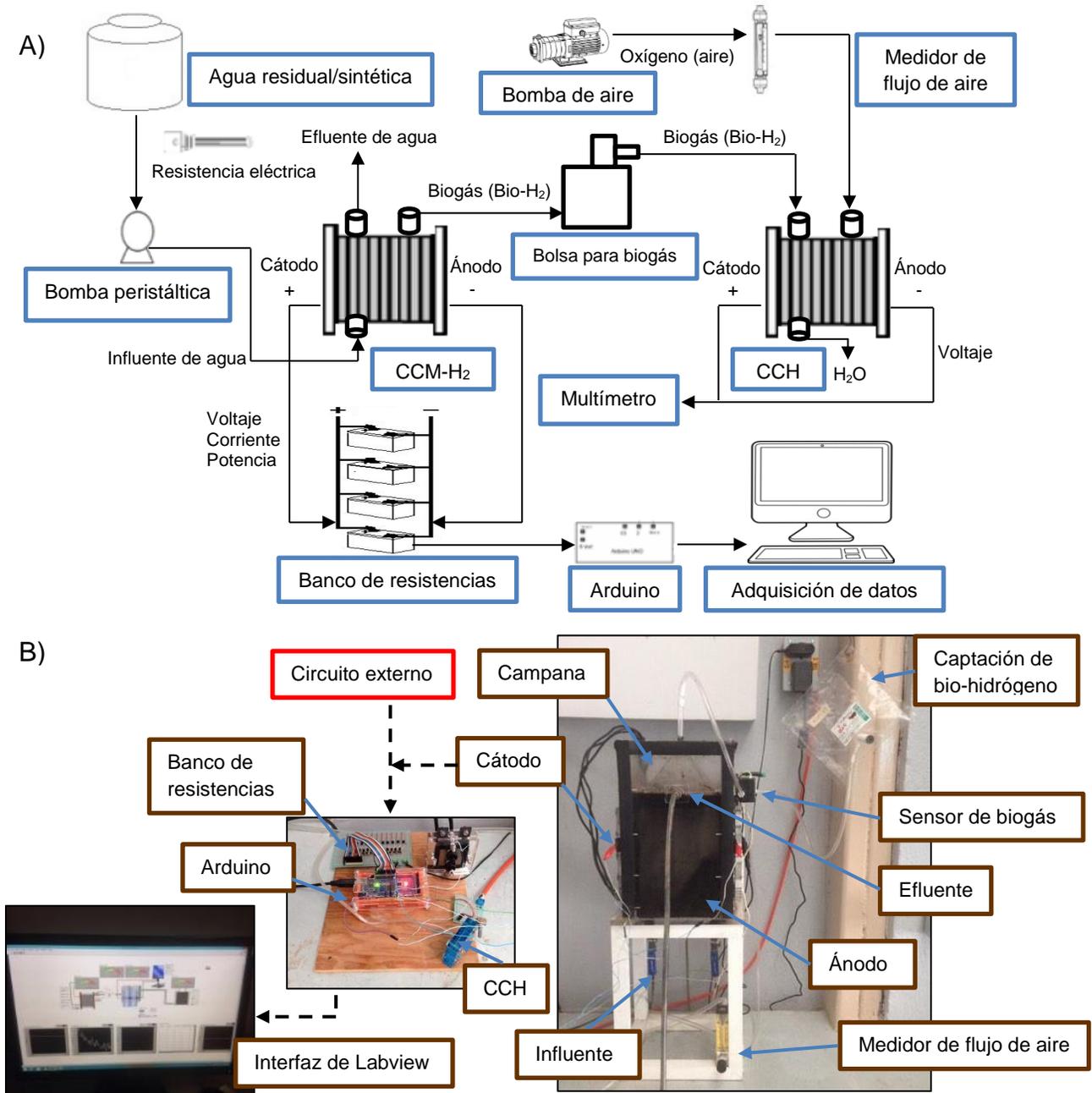


Figura 3.4. Diagrama del sistema híbrido CCM-H₂-CCH (A), Sistema híbrido CCM-H₂-CCH real (B)

3.2.2. Parámetros operacionales

3.2.2.1. Temperatura

La temperatura fue controlada a 32°C en todas las etapas de operación, para elevar la misma se utilizó una resistencia eléctrica marca Heet-O-matic modelo 306 y para medir la temperatura se utilizó un termómetro de mercurio que se introdujo al interior del reactor.

3.2.2.2. Sustrato

En la etapa experimental 1 la CCM-H₂ se alimentó con agua residual municipal cruda y el agua sintética se alimentó en las etapas 2 y 3, la que contenía sacarosa como sustrato, macro y micronutrientes de acuerdo con los siguientes autores Ghimire et al. (2016); Redondas, (2013); Wen et al. (2004); Zhang et al. (2006) y Masset et al. (2012). La solución sintética se preparó en lotes de 20 L. En la Tabla 3.2 se muestra el contenido de la solución sintética.

Tabla 3.2. Componentes de la solución sintética

Macronutrientes	Concentración (g/L)	Micronutrientes	Concentración (g/L)
NH ₄ Cl	1.3	H ₃ BO ₃	0.0005
KH ₂ PO ₄	0.25	CoCl ₂ ·6H ₂ O	0.0005
MgCl ₂ ·6H ₂ O	0.125	FeSO ₄ ·7H ₂ O	0.0001
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0.0025	KI	0.0025
K ₂ HPO ₄	0.025	Na ₂ HPO ₄	0.0001

3.2.2.3. pH

Cuando el reactor fue alimentado con agua residual (etapa 1), el pH se controló a 5.5 y cuando se utilizó la solución sintética se controló a 6.5 (etapas 2 y 3). Para acidificar el agua se utilizó ácido sulfúrico concentrado.

3.2.2.4. Inóculo

Se probaron tres diferentes tipos de inóculos dentro del reactor bio-electroquímico. El primer inóculo se obtuvo mediante el desarrollo y formación de una biopelícula a través de agua residual municipal (I1), dado que no se observó un incremento en el voltaje, ni en el bio-hidrógeno con este inóculo, se adicionaron dos inóculos más al reactor. El segundo inóculo consistió de bacterias aisladas de una mezcla de lodo granular anaerobio, éste fue obtenido de un reactor UASB de aguas residuales de la industria papelera y de sedimentos recogidos de un lago artificial en proporción 50/50 (V/V). En este caso se calentó la mezcla de lodos en un baño

maría a una temperatura de 35°C durante 7 d con un pH de 5.5, después, la mezcla se trató con un choque térmico a 105°C durante 15 min. Finalmente se tomaron muestras de la mezcla de lodos secos (Figura 3.5a) y fueron inoculadas de forma aséptica en cajas Petri con medio de cultivo NBY bajo condiciones anaerobias, una vez crecidas y purificadas (Figura 3.5b) las bacterias fueron raspadas con una cucharilla extrayéndolas de las cajas Petri de medio de cultivo y fueron adheridas directamente a las paredes internas del ánodo (I2) (Figura 3.5c). El tercer inóculo, fue la mezcla de lodo granular anaeróbico y sedimento sometido al pretratamiento térmico (I3), en un volumen de 500 mL, este inóculo fue vertido directamente a las paredes del ánodo. Se realizó un proceso de bioaumentación donde el fieltro de carbón fue el soporte de todos inóculos. El primer inóculo se desarrolló hasta el día 38 de operación del reactor, el segundo se adicionó en el día 39 y el tercer inóculo fue adicionado en el día 57, por lo que I1, +I2 e +I3 representa una mezcla de inóculos diferentes, cabe mencionar que el ánodo no fue limpiado antes de adicionar los nuevos inóculos. Las colonias que crecieron en el medio NBY fueron aisladas y caracterizadas a través de la respuesta a la técnica de Wirtz-Conklin y tinción de Gram para la determinación principalmente de Bacilos Gram positivos esporulados (*Bacillus* y *Clostridium*).

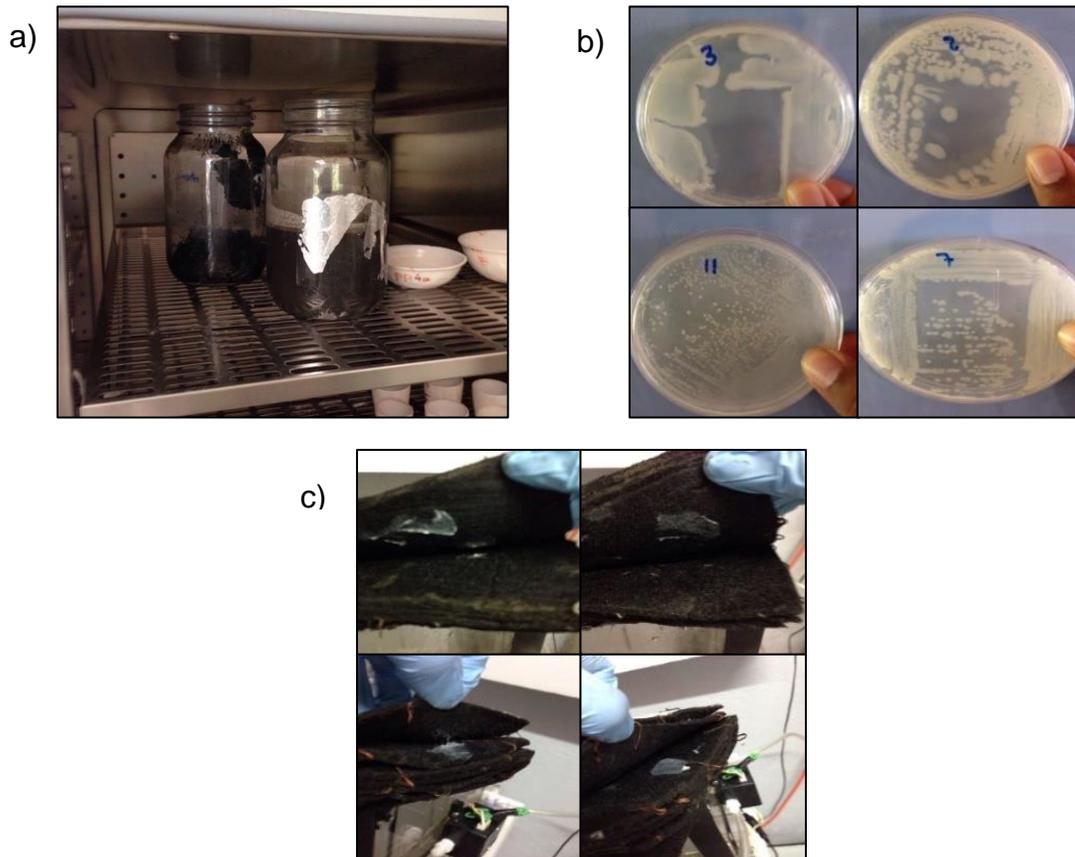


Figura 3.5. a) Pretratamiento térmico-ácido de la mezcla de lodo, b) Bacterias puras en medio NBY, c) Inoculación de bacterias sobre las paredes del ánodo

3.2.3. Parámetros analíticos

Durante la producción de electricidad y de bio-hidrógeno de la primera y segunda etapa, se determinaron periódicamente los parámetros analíticos en el reactor que se mencionan en la Tabla 3.3.

Tabla 3.3. Parámetros analíticos medidos en la CCM-H₂

Parámetro	Frecuencia	Punto de muestreo	Técnica
DQO	Tres veces por semana	Influente, Efluente	APHA, 2012
SST	Tres veces por semana	Influente, Efluente	APHA, 2012
Nitrógeno amoniacal (N-NH ₄)	Tres veces por semana	Influente, Efluente	APHA, 2012
Fosfatos (PO ₄)	Tres veces por semana	Influente, Efluente	APHA, 2012
pH	Tres veces por semana	Influente, Efluente	Potenciométrico
Conductividad eléctrica	Tres veces por semana	Influente, Efluente	Potenciométrico
Potencial redox	Tres veces por semana	Influente, Efluente	Potenciométrico
Turbiedad	Tres veces por semana	Influente, Efluente	APHA, 2012
Determinación de bio-hidrógeno	Tres veces por semana	Efluente de biogás	Cromatografía de gases
Biogás	Tres veces por semana	Efluente de biogás	Sensor de biogás y por desplazamiento

La determinación de DQO, SST, nitrógeno amoniacal, fosfatos, pH, conductividad y potencial redox se llevaron a cabo de acuerdo con los métodos del Standard Methods for Examination of Water and Wastewater (APHA, 2012). Para ello, se utilizó un espectrofotómetro marca HACH modelo DR 2400. Para medir la turbiedad se utilizó un turbidímetro portátil HI 93703 C marca HANNA. La determinación cuantitativa de biogás se realizó mediante almacenaje en bolsas herméticas para muestreo de gases (Tedlar de 1 L), donde posteriormente fueron analizadas por cromatografía de gases. El flujo de biogás se midió con el sensor de biogás de microturbina y por método de desplazamiento de agua en el que se utilizaron frascos serológicos de 50 mL.

3.2.3.1. Determinación de hidrógeno por cromatografía de gases

La medición de la cantidad de hidrógeno producido se midió a través de la determinación de su concentración en muestras de biogás usando un cromatógrafo de gases SRI 8610C. La cromatografía de gases abarca todos los métodos cromatográficos en los que la fase móvil es un gas. En el cromatógrafo de gases, la muestra es vaporizada en un puerto de inyección en la cabeza de la columna. La muestra es transportada a través de la columna por un gas inerte (fase móvil). La columna en sí misma contiene un líquido como fase estacionaria, el cual está adsorbido sobre la superficie de un sólido inerte. Para llevar a cabo estas pruebas se utilizó un detector de conductividad térmica, la columna utilizada fue la Molecular Sieve 13X de 2.1 mm de diámetro interno, 1.82 m de largo y malla 80/100. Se inyectó 0.1 mL de muestra del biogás al cromatógrafo de gases mediante una microjeringa de 1 mL. El gas acarreador fue helio de grado cromatográfico a una presión de 60-80 psi. Las condiciones óptimas de operación del cromatógrafo de gases en la detección de hidrógeno se muestran en la Tabla 3.4.

Tabla 3.4. Condiciones del cromatógrafo de gases

Parámetro	Valor
Tiempo de corrida	5.5 min
Flujo del gas acarreador	20 mL/min
Pico de hidrógeno	1.1 min
Rampa de temperatura	Inicia en 50°C por 2 min Incrementa 20°C por un min hasta 120°C

Se realizó una curva de calibración con las condiciones óptimas del equipo en la detección de hidrógeno y metano, para ello se inyectaron volúmenes de 0.1 mL hasta 1 mL, para esta prueba se utilizó hidrógeno 99.98% puro. Para realizar esta curva se requirió calcular el número de moles de hidrógeno mediante la Ecuación 3.1.

$$n = \frac{PV}{RT} \quad (\text{Ec. 3.1})$$

Donde $R = 0.082 \text{ atm/mol} \cdot \text{K}$, se tomó en cuenta la presión del lugar en el laboratorio ($P = 0.85 \text{ atm (IMTA)}$), V es el volumen inyectado de la muestra en L y T es la temperatura del laboratorio ($^{\circ}\text{K}$). El resultado del análisis del cromatógrafo puede expresarse en %, mg/mL o mL/L. Para determinar la cantidad volumétrica de hidrógeno se multiplicó el porcentaje contenido en una muestra de biogás por el flujo de biogás convertido en unidades de L/d dando como resultado la

expresión $L H_2/L \cdot d$. En la Figura 3.6 se muestra el equipo que se utilizó en este trabajo.



Figura 3.6. Cromatógrafo de gases SRI 8610

3.3. Caracterización bio-electroquímica

3.3.1. Voltaje

Los voltajes expresados en mV fueron registrados con el software de adquisición de datos de Labview.

3.3.2. Intensidad de corriente

Para el cálculo de la intensidad de corriente (I) se utilizó la fórmula $I=V/ R_{ext}$, donde R_{ext} es la resistencia externa del en el circuito externo y V es el voltaje (Logan et al., 2006), expresado en mA (miliamperes).

3.3.3. Potencia

La potencia (P) se calculó con la fórmula $P=IV$ (Logan et al., 2006) expresado en mW (miliwatt).

3.3.4. Densidad de corriente

La densidad de corriente (DC) es el resultado de la división de la intensidad de corriente entre el área del ánodo (Logan et al., 2006) expresado en mA/m^2 .

3.3.5. Densidad de potencia

La densidad de potencia (DP) es el resultado de la división de la potencia entre el área del ánodo (Logan et al., 2006) expresado en mW/m^2 .

3.3.6. Potencia volumétrica

La potencia volumétrica (PV) es el resultado de la división de la potencia entre el volumen del reactor (Logan et al., 2006) expresado en mW/m^3 .

3.4. Curvas de polarización

Las curvas de polarización se obtuvieron al término de operación de cada fase de TRH de la CCM- H_2 . Para realizar esta prueba se midieron los voltajes a circuito abierto, después se realizaron mediciones de voltajes con una serie de resistencias de diferentes valores (ohms) de forma creciente, para ello se utilizó el banco de resistencias programables que se encuentra acoplado al sistema de adquisición de datos de Labview. Los valores de las resistencias fueron 10Ω , 50Ω , 100Ω , 200Ω , 300Ω , 500 , 800 , $1\text{K} \Omega$, $2\text{K} \Omega$, $5\text{K} \Omega$, $10\text{K} \Omega$, $15\text{K} \Omega$, $20\text{K} \Omega$, $25\text{K} \Omega$ y $30\text{K} \Omega$.

3.5. Producción de hidrógeno-Cinética en lote

Para evaluar la cinética del proceso de producción de hidrógeno en la CCM- H_2 se utilizó el modelo ajustado de Gompertz, esta prueba se realizó durante la tercera etapa experimental. La cantidad de hidrógeno obtenido por procesos fermentativos se puede cuantificar en términos de rendimiento y tasa. El rendimiento se define como la cantidad de H_2 producido por cantidad de sustrato consumido y se expresa en unidades de mol H_2 $\text{mol}/\text{sacarosa}$ (o algún otro sustrato). La tasa de producción de hidrógeno (TPH) se refiere a la cantidad de hidrógeno producido (mL) en un tiempo determinado y por unidad de volumen del reactor (tasa volumétrica) o por unidad de biomasa (tasa específica) (Argun y Kargi, 2011). Es importante mencionar que es posible ajustar matemáticamente la producción de hidrógeno por digestión anaerobia mediante la ecuación modificada de Gompertz. En la Ecuación 3.2 se muestra la expresión matemática la cual es un modelo adaptado para describir el progreso acumulativo de producción de hidrógeno en un experimento lote, tal como se evaluó en este trabajo.

$$H = H_{\max} \cdot \exp \left\{ -\exp \left[\frac{R \cdot e}{H_{\max}} (\lambda - t) + 1 \right] \right\} \quad (\text{EC. 3.2})$$

Donde: H corresponde a la producción acumulada de hidrógeno (mL ó mmol), H_{\max} a la producción acumulada máxima de hidrógeno (mL ó mmol), R es la tasa de producción máxima de hidrógeno (mL/h ó mmol/h), t es el tiempo de la corrida (h), λ es la fase de latencia (h) requerido para comenzar la producción de hidrógeno y e es el valor exponencial (2.71). Esta ecuación ha sido empleada por diferentes autores (Zhang et al., 2003; Lay et al., 1999; Chen et al., 2008, Gadhamshetty et al., 2010 y Buitrón y Carvajal, 2010) con altos ajustes de $r^2 > 0.90$, donde se ha querido correlacionar resultados experimentales con este modelo

matemático de tipo predictivo. Para la resolución de este modelo se utilizó la función Solver de Microsoft Excel versión 2013.

3.6. Tinciones de Gram y esporas

Se realizó la identificación microbiológica de las bacterias presentes en el material anódico. Para ello se tomaron dos muestras, la primera se tomó a partir de la mezcla de lodos anaerobios pretratados en la fase de obtención de bacterias puras para el I2 en el día 30 de operación de la CCM-H₂ de la etapa de arranque y acondicionamiento, ésta se tomó después de haber realizado el pretratamiento térmico-ácido. La segunda muestra se tomó tres días después de haber finalizado la tercera etapa de operación a partir de las paredes del fieltro de carbón para identificar las bacterias que quedaron en la biopelícula anódica.

El procedimiento para llevar a cabo la preparación de medios de cultivo NBY y el sembrado de bacterias fue el siguiente.

1. Se pesó 5 g de Peptona, 3 g de extracto de carne, 2 g de extracto de levadura, 2 g de K₂HPO₄, 0.5 g de KH₂PO₄, 25 g de sacarosa, 0.247 g de MgSO₄·7H₂O y 15 g de Agar bacteriológico y se disolvió en un 1 L con agua desionizada en un matraz Erlenmeyer.
2. Se selló la tapa del matraz con un tapón de algodón y papel aluminio.
3. Se esterilizó la solución en autoclave a 121°C durante 15 min y 18 lb/in² de presión.
4. Se vertió el medio de cultivo en cajas Petri dentro de una campana de flujo laminar en condiciones asépticas.
5. Después se sembraron las bacterias en las cajas con medio de cultivo a partir de una muestra de la mezcla de lodos pretratados, para mantener condiciones estériles se utilizó un mechero bunsen, al inocular sobre las cajas se realizó un estriado por método de dilución.
6. Se colocaron las cajas Petri en un desecador en estado anaerobio, para ello se agotó el oxígeno con el uso del fuego de una vela, se selló el desecador herméticamente y se colocó en una incubadora a 32°C durante alrededor de 72 h.

Una vez crecidas las colonias bacterianas se tomó muestra de cada colonia individual con un asa bacteriológica en condiciones estériles y se repitió el proceso de sembrado. Finalmente se realizó la técnica de tinción de Gram y la tinción de esporas. El procedimiento se describe a continuación.

3.6.1. Tinción de Gram

1. Se depositó una colonia bacteriana con un asa bacteriológica sobre la superficie de un cubreobjetos.
2. Se agregó una gota de agua destilada y se fijó la muestra con flameos en un mechero.

3. Se añadió una gota de cristal violeta a la preparación, se dejó actuar el colorante durante un min, se lavó con abundante agua y se eliminó el exceso de agua sacudiendo el portaobjetos.
4. Después se agregó una gota de la solución lugol a la muestra, se dejó actuar un minuto, se lavó y se eliminó el exceso de agua.
5. Se vertió gota a gota alcohol-acetona lavando la preparación durante 10 segundos.
6. Se añadió la safranina y se dejó actuar durante 30 segundos, transcurrido el tiempo se lavó la muestra y se eliminó el exceso de agua.
7. Se dejó secar la muestra al aire durante 24 h y finalmente se observó al microscopio óptico.

3.6.2. Tinción de Esporas

Algunos géneros bacterianos producen en su interior formas de resistencia denominadas endoesporas, que se forman cuando las condiciones ambientales son desfavorables. Esta prueba se realizó para verificar que durante el pretratamiento de la mezcla de lodos las bacterias hayan desarrollado un estado de esporulación, ya que muchas de estas son consideradas productoras de hidrógeno (Montes, 2008). Para la tinción se llevaron a cabo el siguiente procedimiento:

1. Se depositó una colonia bacteriana con un asa bacteriológica sobre la superficie de un cubreobjetos.
2. Se añadió a la muestra gota a gota colorante verde malaquita, con unas pinzas se colocó la muestra encima de la llama del mechero de forma que el colorante humee.
3. Se lavó con abundante agua el exceso de colorante.
4. Se agregó gota a gota safranina por un min.
5. Se lavó con abundante agua el exceso de colorante.
6. Se dejó secar la muestra al aire durante 24 h y se observó al microscopio óptico.

3.7. Extracción de ADN genómico

La extracción y purificación de ADN fue realizada utilizando el kit *Wizard Genomic DNA Purification Kit* de marca *Promega*, específico para la extracción de ADN de Bacterias Gram negativas, el procedimiento de extracción se realizó de acuerdo a las especificaciones del fabricante, siguiendo el protocolo *Quick PROTOCOL Isolation of Genomic DNA from Gram Positive and Gram Negative Bacteria*. Posteriormente se cuantificó por espectrofotometría la concentración de las muestras de ADN bacteriano, para ello se midió la densidad óptica (DO) a 260 nm expresando la concentración en ng/ μ L, buscando que la relación 260/280 fuera mayor a 1.8-2).

3.8. Amplificación por PCR del gen 16S

Redonde (2013) explica que la técnica de PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) nos permite replicar un fragmento de ADN de interés, es decir, obtener un gran número de copias de un fragmento. En esta técnica son necesarios los “primers” o cebadores, los cuales son pequeñas secuencias de alrededor de 20 nucleótidos que complementan los fragmento extremos del ADN que son necesarios amplificar, otros componentes en este proceso son los deoxinucleótidos trifosfatados (dNTPs), el buffer adecuado, una enzima de polimerización de ADN (Taq Polimerasa) y un cofactor de la enzima ($MgCl_2$). Esta enzima sintetiza una nueva hebra de ADN a partir de los “primers” y utiliza como molde el ADN de interés. El fundamento de la PCR consiste básicamente en la repetición cíclica de tres pasos:

1. Desnaturalización: Es la separación de las dos hebras que forman la molécula de ADN que hay que amplificar.
2. Hibridación: Es la unión de los “primers” a su secuencia complementaria en el molde de ADN.
3. Extensión: La enzima Taq Polimerasa usando el ADN en forma de cadena sencilla puede empezar a incorporar dNTPs en el extremo 3' del cebador y sintetizar así una nueva cadena de ADN.

Cada paso está definido por un periodo de tiempo y rampeos de temperatura determinados, formando ciclos. La repetición sucesiva de estos ciclos permite obtener un gran número de copias del fragmento de ADN.

En este trabajo, la población bacteriana fue estudiada amplificando por PCR la región variable 3 (V3) del gen 16S del ARNr, los “primers” utilizados fueron fD1 (5' AGAGTTTGATCCTGGCTCAG 3') y rP2 (5' ACGGCTACCTTGTTACGACTT 3'), ambos son “primers” universales para el dominio Bacteria y permiten la amplificación del gen 16S ARNr. La corrida de PCR fue realizada en un termociclador marca Perkin-Elmer 9700. Se corrieron dos reacciones, una en 10 μ L para observar si se obtuvo un amplicón, después se corrió la reacción en 50 μ L para el proceso de secuenciación. En la Tabla 3.5 se muestran los reactivos utilizados y sus concentraciones en reacciones de 50 μ L.

Tabla 3.5. Reactivos utilizados en la prueba de PCR

Reactivos	Concentración
Master Mix 2X	1X
dNTPs 400mM	200 μ M de cada uno
Taq ADN polimerasa	50 U
$MgCl_2$	1.5 mM
Oligo rP2	0.5 μ M

Reactivos	Concentración
Oligo fD1	0.5 μ M
ADN molde	100-120 ng
H ₂ O inyectable	c.b.p. 50 μ L

El programa de PCR utilizado fue un programa de amplificación con rampa decreciente de temperaturas. Está basado en comenzar la reacción de PCR a temperaturas altas, evitando así amplificaciones inespecíficas, para ir bajando progresivamente la temperatura de hibridación una vez copiadas las primeras secuencias. Un esquema del programa del termociclador está representado en la Figura 3.7. El programa consta de una etapa de pre-incubación a 94°C durante 2 minutos, después sigue la etapa de amplificación que consiste en 35 ciclos, comenzando a 94°C durante 15 s, 55°C durante 15 s y 72°C por 1 min 30 s, para finalizar con una etapa de elongación final a 72°C por 5 min.

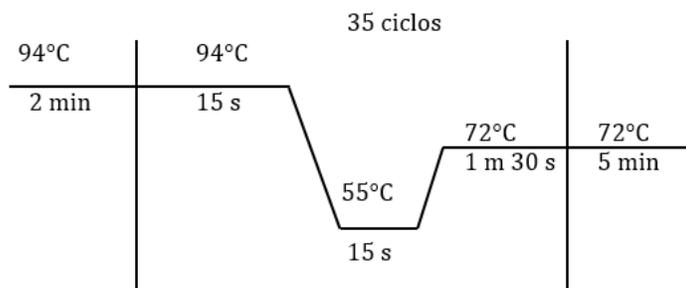


Figura 3.7. Esquema del programa PCR utilizado para amplificar el gen ribosomal 16S

3.9. Confirmación de la amplificación del producto de PCR (Electroforesis)

El resultado del proceso de PCR en 50 μ L fue analizado mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% (p/v) y teñido con bromuro de etidio para poder ser observado en una lámpara de luz ultravioleta (Transiluminador). En este proceso se utilizó un marcador de peso molecular de 1500 pb. A continuación se muestra la metodología para llevar a cabo la prueba de electroforesis.

1. Para preparar el gel de agarosa se pesó 0.3 g de agarosa y se mezcló con 30 mL de solución TAE 0.5 X (0.242 g/L de Tris (Tris-hidroximetil-aminometano, 0.057 mL/L de ácido acético y 0.1 mL/L de EDTA 0.5 M)) y 10 mL de agua para reponer las pérdidas por evaporación.
2. Se vertió la solución de agarosa en la cámara de electroforesis y se colocaron los peines.

3. Una vez solidificado el gel, se retiró el peine y se colocó 3 μL de buffer de carga 5X *Green Go Taq Flexi DNA Polymerase* en la charola.
4. Se adicionó 5 μL de muestra (producto de PCR) y se mezcló con el buffer de carga.
5. En el primer carril del gel se cargaron 3 μL de marcador de peso molecular de 1500 pb y 8 μL de muestra en el resto de los carriles
6. Se corrió la reacción a 90 V durante 45 min.
7. Después se sacó el gel y se tiñó con bromuro de etidio durante 5 min en agitación orbital.
8. El gel se enjuagó con agua durante 10 min en agitación orbital.
9. Se colocó el gel en la cámara del transiluminador para observar las bandas de amplificación.

3.10. Purificación del producto de PCR y preparación de la reacción de secuenciación

Para la purificación de los productos de PCR se utilizó el kit DNA Clean and Concentrator, marca Zymo. El procedimiento se realizó de acuerdo con las especificaciones del fabricante, siguiendo el protocolo *Instruction Manual DNA Clean & Concentrator™-5*. Las reacciones de secuenciación se prepararon en tubos de PCR de 200 μL . Los componentes y cantidades de la reacción de secuenciación fueron los siguientes:

- Producto de PCR (100-120 ng)
- Oligo FD1 (10 pmoles (1 μL de una solución 10 μM [equivalente a $\text{pmol}/\mu\text{L}$]))
- Agua (Hasta completar 16 μL)

3.11. Análisis de secuencias

Posteriormente se realizó la secuenciación de los fragmentos de ADN amplificados por PCR. Los métodos de secuenciación permiten conocer el código genético de un microorganismo, es decir, determinar la secuencia de bases de un determinado fragmento de ADN previamente amplificado. En este trabajo la secuenciación fue realizada por el servicio de secuenciación del INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA DE UNAM. Una vez recibidas, las secuencias fueron alineadas y preparadas utilizando el software Chromas (versión 2.6). Finalmente, para la identificación de las especies bacterianas, fueron buscadas las similitudes de las secuencias con otras secuencias disponibles en la base de datos de ADN microbiano GenBank del NCBI (National Center for Biotechnology Information) mediante el programa NucleotideBLASTsearch. Las secuencias obtenidas fueron depositadas en la base de datos GenBank del NCBI bajo los siguientes números de acceso: MF599339-MF599350.

CAPÍTULO 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Caracterización físico-química de agua de alimentación

En la Tabla 4.1 se presentan los resultados de la caracterización físico-química de las aguas residuales utilizadas como influente en las etapas 1 y 2 de operación. Recordando que el reactor CCM-H₂ se alimentó con agua residual municipal (ARM) durante la primera etapa, una vez desarrollada y establecida la biopelícula sobre el ánodo, el reactor fue alimentado con la solución sintética (SS) hasta el término de la experimentación. El pH del agua residual municipal fue controlado a 5.5 con H₂SO₄ para la inhibición de bacterias metanogénicas, esto sucedió cuando la celda fue alimentada con agua residual municipal. Cuando la celda fue alimentada con la solución sintética el pH se controló a 6.5, ya que las bacterias electroactivas y productoras de bio-hidrógeno se desempeñan en pH cercano a 7 (Mckormik et al., 2015). La DQO del agua municipal fue de 282.3 ±62.2 mg/L y la DQO de la solución sintética fue de ~1,000 mg/L (999.7 ±41.1 mg/L) utilizando la sacarosa como fuente de carbono fácilmente biodegradable. El influente presentó valores entre un rango de 18-136 mg/L de nitrógeno amoniacal y 15-136 mg/L de fosfatos en todas las pruebas, tanto con el agua municipal como en la solución sintética. Los SST de ambas aguas presentaron resultados en un rango de 80-120 mg/L, los sólidos presentes en el agua sintética se atribuyen a la formación de una lama sobre las paredes del contenedor de agua, por el alto contenido de sales que reaccionaron al calor de la resistencia eléctrica que calentó el agua. El ARM presentó una conductividad de 873.6 ±83.9 mg/L y la SS presentó un valor de 3614 ±178.5 mg/L, el incremento en la conductividad puede atribuirse a que la SS contenía una gran cantidad de sales disueltas por parte de los reactivos. El ARM se observó un poco más turbia (89.5 ±33.9 NTU) que la SS (50.6 ±16.7 NTU). Respecto al potencial redox, incrementó su negatividad a lo largo de la experimentación, debido a las condiciones ambientales reductoras presentes en el reactor.

Tabla 4.1. Caracterización del agua residual municipal/agua sintética

Parámetros	INFLUENTE	
	Agua residual municipal (ARM)	Solución sintética (SS)
pH	5.4 ±1.5	6.6 ±0.3
DQO (mg/L)	282.3 ±62.2	999.7 ±41.1
Potencial redox (mV)	78.5 ±19.8	-50.0 ±24.7
Conductividad (µs/cm)	873.6 ±83.9	3614 ±178.5
Nitrógeno amoniacal (mg/L)	27.3 ±3.0	120.0 ±16.1

Parámetros	INFLUENTE	
	Agua residual municipal (ARM)	Solución sintética (SS)
SST (mg/L)	86.8 \pm 43.4	112 \pm 3.9
Fosfatos (mg/L)	29.1 \pm 13.1	106.3 \pm 16.4
Turbiedad (NTU)	89.5 \pm 33.9	50.6 \pm 16.7

4.2. Producción de electricidad de la CCM-H₂ operado en continuo

4.2.1 Producción de electricidad de la CCM-H₂ a circuito abierto

El voltaje a circuito abierto se define como: el voltaje máximo que se produce bajo una resistencia infinita, donde los electrodos no son conectados entre sí a través de una resistencia externa, por lo que este parámetro mide las actividades de los reactantes en la superficie del ánodo y cátodo. En la Figura 4.1 se muestra la producción de voltaje en la CCM-H₂ medido a circuito abierto y operado con un TRH de 8 d. El monitoreo de electricidad en esta fase, se realizó desde el inicio de operación del reactor hasta los primeros 15 d (días) de operación. Al inicio del monitoreo el diferencial de potencial fue de 36 mV, esto podría deberse a la diferencia de potencial entre los electrodos basada en factores químicos y biológicos (Min et al., 2005).

El voltaje tuvo un comportamiento creciente dentro de los primeros 14 d, esto se debe al desarrollo de la biopelícula en el ánodo, por lo que a mayor área de contacto entre el fieltro de carbón (ánodo) y la biopelícula (bacterias exoelectrógenas) existe una mayor transferencia de electrones entre los microorganismos y el electrodo. Cuando una CCM se opera con una resistencia externa grande o infinita como en el caso de medir a circuito abierto, se afecta el potencial del ánodo, haciéndolo más negativo, lo que provoca que las bacterias de la cámara anódica ganen menos energía para formación de biomasa y se registren valores altos de voltajes (Logan et al., 2006). El máximo voltaje generado fue de 814 mV, valor registrado en el día 14 de operación. Después del día 15 (ya establecida la biopelícula) el voltaje se mantuvo casi constante y cuando se observó una ligera disminución de energía, se concluyó la medición de voltaje a circuito abierto, por lo que se procedió a conectar la resistencia externa para medir el voltaje a circuito cerrado.

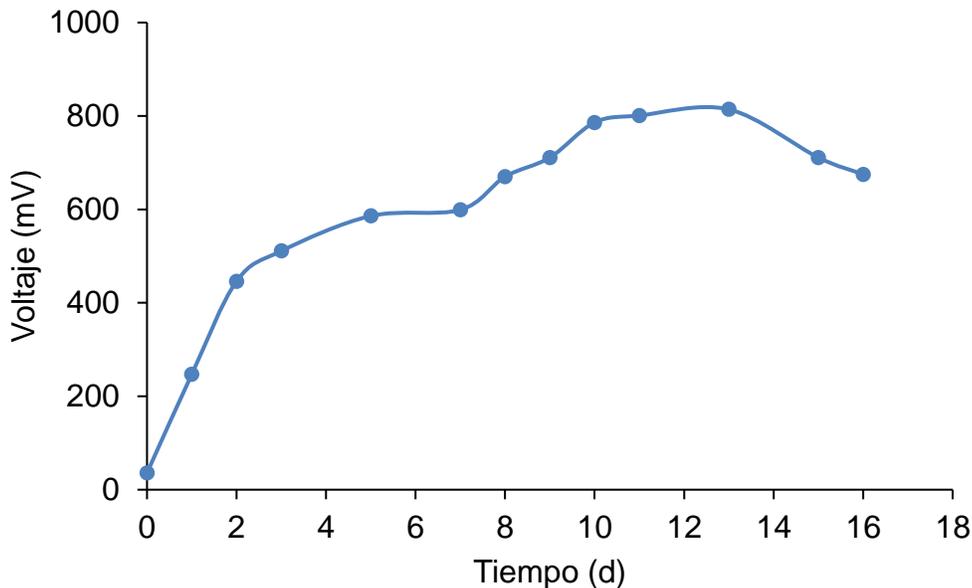


Figura 4.1. Producción de voltaje en la CCM-H₂ a circuito abierto

4.2.2. Producción de voltaje en la CCM-H₂ a circuito cerrado en continuo

En las Figuras 4.2, 4.3, 4.4 y 4.11 no se observan datos en los primeros 15 d debido a que en ese tiempo se midió el voltaje a circuito abierto para promover un mejor desarrollo de la biopelícula, entre los días 25 y 34, tampoco se observan datos debido a una desconexión el en sistema de adquisición de datos.

La Figura 4.2 muestra la producción de voltaje de las diferentes etapas y fases de operación en la CCM-H₂, también se puede observar las fases en que fueron adicionados los inóculos, I1 corresponde a la fase de arranque del reactor donde comprende el tiempo de desarrollo de la biopelícula, en la cual se alimentó con agua municipal. En esta misma fase se acidificó el agua de alimentación (pH de 5.5) con el fin de incrementar la selección de microorganismos productores de bio-hidrógeno y para la inhibición de los metanógenos. Sin embargo el pH ácido afectó negativamente las bacterias exoelectrógenas, ya que el voltaje disminuyó progresivamente hasta llegar a 0 mV. Dado que no se observó una importante diferencia en la producción de bio-hidrógeno, se adicionaron los dos inóculos más. En la siguiente Figura (4.2) “+I2” representa la fase en que se adicionó el segundo inóculo y “+I3” representa la adición del tercer inóculo, ambos se adicionaron operando con un TRH de 8 d. Con los TRH de 4 y 1 d no se adicionó otro inóculo, por lo que permanecieron los tres inóculos mezclados.

Considerando que parte de las bacterias metanogénicas fueron inhibidas, se controló el pH a 6.5 a partir de la adición de los inóculos 2 y 3 y se alimentó el

reactor con la solución sintética incrementando la concentración de materia orgánica, con el objetivo de aumentar la producción simultánea de electricidad y bio-hidrógeno, ya que tanto las bacterias electroactivas como las productoras de hidrógeno se desempeñan a un pH cercano a 7. Una vez que el tercer inóculo (mezcla de lodos anaerobios) fue introducido al reactor, se observó un importante crecimiento en la producción de electricidad y de bio-hidrógeno. El máximo voltaje fue de 671 mV, valor registrado en el día 60 de operación operando con un TRH de 8 d. Cuando la producción de voltaje se comportó de forma constante, se operó con un nuevo TRH de 4 d, donde el máximo voltaje registrado fue de 329 mV. En la última fase de la segunda etapa experimental se operó con un TRH de 1 d. En el cambio de TRH se observó una tendencia a disminución de voltaje y después se estabilizó, donde se registró un voltaje máximo de 284 mV. En los últimos 30 d de operación no se observó una diferencia importante en la variación de voltaje, por lo que se decidió finalizar la operación en continuo.

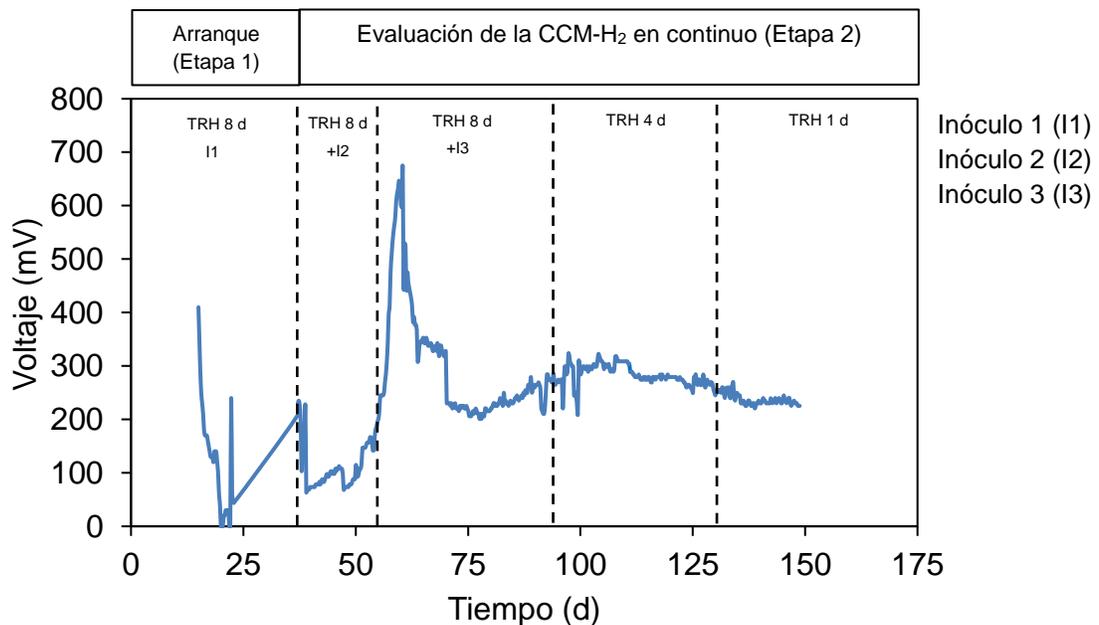


Figura 4.2. Producción de voltaje en la CCM-H₂ a circuito cerrado con diferentes tiempos de retención hidráulica

Adicionalmente se llevó a cabo un análisis estadístico de varianzas múltiples (ANOVA-Tukey), comparando la producción de voltaje de la CCM-H₂ entre los resultados obtenidos con los diferentes tiempos de retención hidráulica, los que mostraron que hay una diferencia significativa en la producción de voltaje con el TRH de 8 d, esto era de esperarse, ya que existe una diferencia de producción de voltaje del 49 % si lo comparamos con los voltajes generados con los TRH de 4 y

1 d. El análisis también demostró que no hay una diferencia significativa con los tratamientos de 4 y 1 d (Ver anexo 7.1). El análisis se realizó con los datos obtenidos de los voltajes máximos registrados para cada TRH.

En el proceso de la producción de voltaje se involucran factores como: el sustrato, el cual es un aspecto muy importantes en las CCM porque constituye el combustible a partir del cual se genera la electricidad, además del mecanismo de transferencia de electrones al ánodo y la capacidad de las bacterias de oxidar el sustrato orgánico (Lovley, 2008). Estos son factores considerados efectivos en la producción de electricidad cuando hay mayor tiempo de contacto entre el sustrato y el microorganismo (Revelo et al., 2013). Algunos factores que atribuyen a la disminución de voltaje son: una fase de decaimiento de bacterias productoras de electricidad, o por una sobreproducción de biomasa que puede afectar la transferencia de los reactantes y productos del electrolito hacia el electrodo adherido con la biopelícula, además de que los microorganismos requieren energía para su crecimiento y mantenimiento, por lo tanto, la biopelícula anódica debe tomar parte de la energía disponible por el sustrato orgánico disminuyendo el voltaje en la CCM. Los electrodos, el electrólito y la membrana de intercambio de protones saturada de biomasa también pueden limitar la transferencia de electrones causando pérdidas de voltaje (Finkelstein et al., 2006; Aelterman et al., 2008; Viridis et al., 2009).

4.2.3. Densidad de potencia producida en la CCM-H₂

La Figura 4.3 muestra la densidad de potencia producida en la CCM-H₂. Se observa que a medida que fueron adicionándose los inóculos, el voltaje y la densidad de potencia aumentaron, ya que los microorganismos exoelectrógenos se desarrollaron a medida que avanzó la aclimatación, produciendo cada vez más electricidad hasta llegar a una estabilización. Al igual que el voltaje, la máxima densidad de potencia se registró en el día 60 de operación (después de introducir el I3), cuyo valor medido fue de 45.9 mW/m² cuando el reactor se operó con un TRH de 8 d. Con los siguientes TRH (4 d y 1 d) los valores máximos fueron de 10.6 y 8.2 mW/m², generados en los días 97 y 127 de operación respectivamente, disminuyendo en 37.7 mW/m² con la disminución del tiempo de retención de 8 a 1 d, lo que corresponde a un 82 % de caída de energía. Probablemente se debe a que los procesos electroquímicos y biológicos presentan diferentes dinámicas en el metabolismo microbiano, de acuerdo con las condiciones de operación. Esto se puede explicar teniendo en cuenta el crecimiento microbiano a lo largo de la operación, donde los microorganismos exoelectrógenos se fueron adaptando y desarrollando, donde recibieron un nuevo sustrato lo que conllevó un incremento en la electricidad, en este caso en la densidad de potencia. Sin embargo, con el

tiempo del crecimiento de la biopelícula tanto por la adhesión de nuevos microorganismos, como por el crecimiento de los ya adheridos, provocó un aumento de la resistencia a la difusión. Además el aumento de la biomasa de la biopelícula pudo traer consigo un aumento de especies bacterianas no conductoras. A pesar de que el voltaje de la celda descienda, la densidad de potencia y la corriente generada aumenta, dado que el número de bacterias sobre el electrodo crece, por así decirlo, aumenta el número de sitios biocatalíticos, esta tendencia puede observarse en las curvas de polarización. Para incrementar la densidad de potencia de una CCM es necesario incrementar la densidad de corriente y disminuir las pérdidas de voltaje (sobrepotenciales) (Lee et al., 2009).

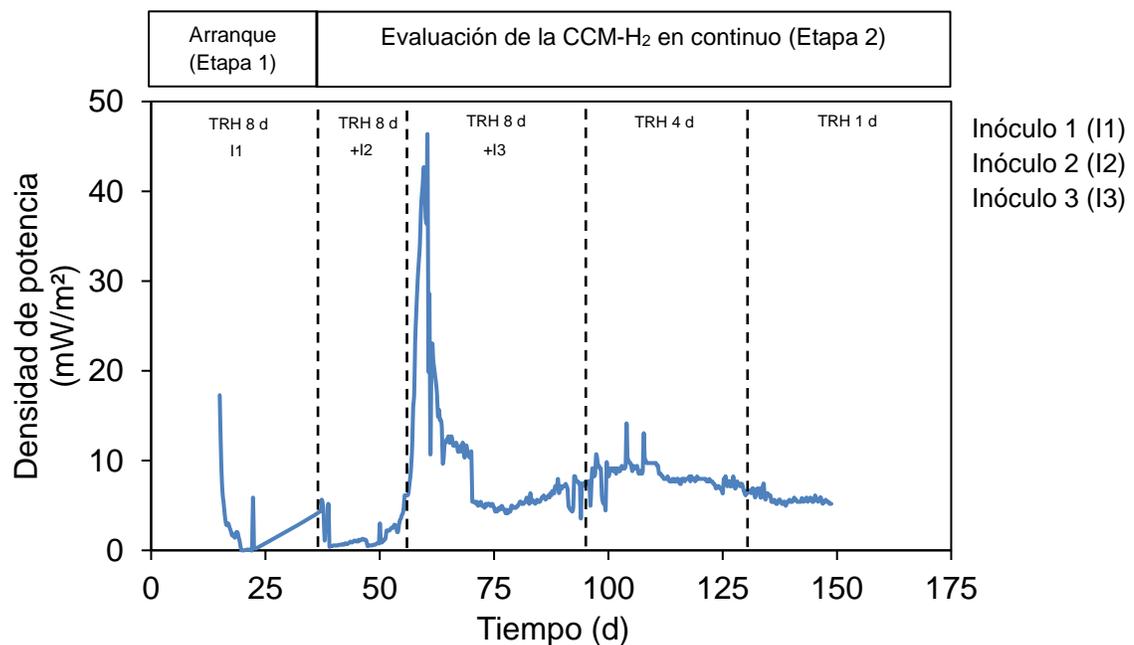


Figura 4.3. Densidad de potencia producida en la CCM-H₂ con diferentes tiempos de retención hidráulica

Si comparamos este estudio con el de [Fatemi et al. \(2012\)](#), quienes utilizaron una celda con tres inóculos evaluados de forma individual, operaron en modo continuo (TRH de 12 h) con un pH de 6.8, temperatura de 24 °C y alimentaron con agua sintética. El primer inóculo fue lodo producido en la fabricación de productos lácteos, el segundo fue con lodo anaerobio de una PTAR y en el tercer inóculo utilizaron *Saccharomyces cerevisiae* como bacteria pura, los valores máximos generados fueron 30.9, 25.9 y 10.0 mW/m² respectivamente, (vs 45.9 mW/m², valor de este estudio). Se puede observar que obtuvieron mayor densidad con el primer inóculo. En este estudio se produjo una mayor cantidad al evaluar los inóculos de forma conjunta.

Un ejemplo donde utilizaron una cepa pura, fue el trabajo de [Yi et al. \(2009\)](#) quienes lograron generar una densidad de potencia de 390 mW/m^2 con la bacteria *Geobacter sulfurreducens*, utilizaron una celda de una sola cámara operada en continuo, como electrodos usaron hojas de grafito y una membrana de Nafion.

En otro estudio ([Lee et al., 2016](#)) obtuvieron un valor de 69.1 mW/m^2 en el que utilizaron un inóculo similar al de este estudio (sedimentos anaerobios), como electrodos utilizaron fieltro de carbón y una membrana PEM colocados en una celda de una sola cámara. El beneficio de utilizar consorcios bacterianos mixtos es que se pueden obtener fácilmente en lodos o biopelículas y la ventaja de trabajar con bacterias puras es que es posible lograr un mayor rendimiento en la producción de electricidad con bacterias altamente conductivas, pero presentan el problema de ser contaminables con otro tipo de bacterias, además de los altos costes. Por ello es recomendable el uso de cultivos mixtos, ya que permiten utilizar una gran variedad de sustratos, entre ellos residuos.

4.2.4. Potencia volumétrica producida en la CCM-H₂

La Figura 4.4 muestra los resultados obtenidos de potencia volumétrica en la CCM-H₂ variando los TRH con los inóculos adicionados. La máxima potencia volumétrica fue de 6.4 W/m^3 , valor registrado cuando el reactor se operó con un TRH de 8 d después de la adición del I3. Con los tiempos de retención de 4 y 1 d este parámetro disminuyó, los valores son similares de 1.4 y 1.1 W/m^3 , respectivamente. Considerando el valor máximo y el mínimo durante el monitoreo de la celda, la caída de potencia volumétrica fue de 5.2 W/m^3 a lo que corresponde una caída del 80 %. Las pérdidas de potencia volumétrica son atribuidas a los mismos fenómenos que por pérdidas de voltaje y densidad de potencia las cuales se explicaron anteriormente.

Estos resultados son similares los obtenidos por [Buitrón y Pérez \(2011\)](#), quienes generaron un valor de 4.5 W/m^3 al evaluar el efecto de la distancia entre los electrodos (8.2 cm de distancia), siendo que en este estudio la distancia entre el ánodo y el cátodo es de 8 cm, se observan resultados similares (6.4 W/m^3 vs 4.5 W/m^3).

[Ren et al. \(2014\)](#) realizaron un estudio de CCM en el cual utilizaron un sustrato de agua residual municipal, alimentación continua y una membrana de fibra hueca de Polivinilideno, cabe mencionar que operaron un sistema de aireación, los ánodos que utilizaron fueron de fibra de grafito con titanio, el cátodo fue de una placa de carbón utilizando Pt como catalizador. Las condiciones son distintas a este estudio. En el estudio de comparación se generó una potencia volumétrica 19

W/m^3 , es un valor sumamente alto en comparación con el obtenido en este estudio, cabe destacar que su estudio utilizaron una serie de celdas conectadas entre sí, por lo que el voltaje fue sumado.

Otro estudio con resultados similares es el reportado por Wang et al. (2010) quienes diseñaron un tipo de CCM microbiológica de captura de carbono, este sistema consiste en una celda microbiológica fotosintética con un bioánodo de algas, en la que se utiliza el CO_2 producido en la cámara. Este sistema obtuvo una densidad de potencia máxima de $5.6 W/m^3$.

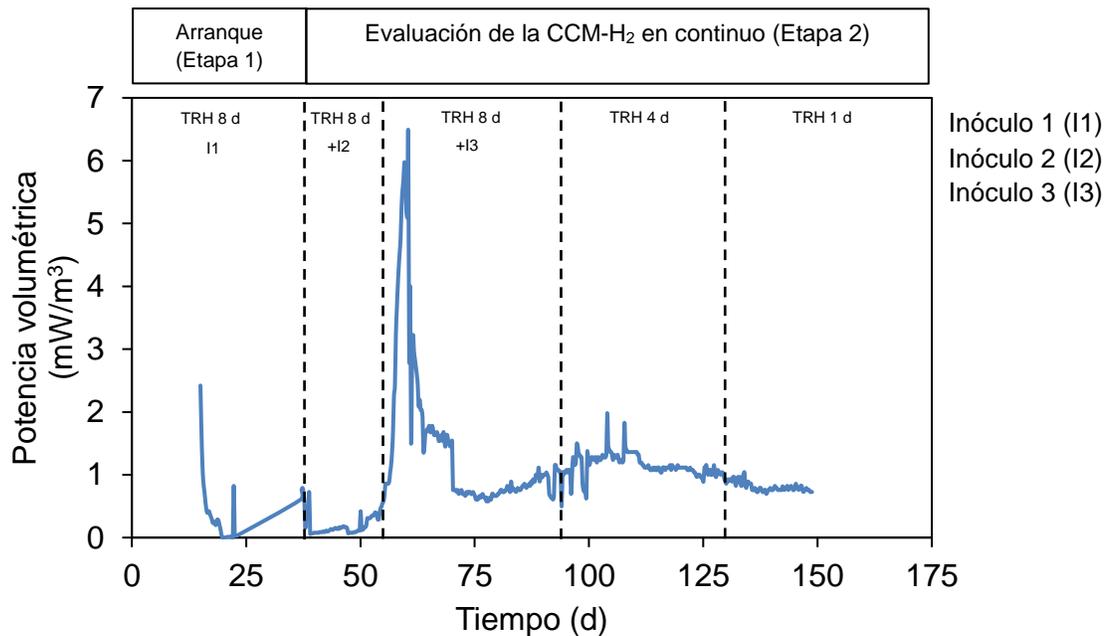


Figura 4.4. Potencia volumétrica producida en la CCM- H_2 con diferentes tiempos de retención hidráulica

4.2.5. Curvas de polarización de la CCM- H_2 con diferentes TRH

A partir de las curvas de polarización se puede obtener información sobre las pérdidas de voltaje de la CCH- H_2 . Estas curvas caracterizan la corriente eléctrica en función del voltaje y la densidad de potencia, para ello se varía la resistencia externa lo que proporciona valores diferentes, en las curvas se pueden apreciar tres regiones como se observa en la Figura 4.5. En la región 1 a bajas densidades de corriente existe una caída del potencial con la densidad de corriente, en esta zona el mecanismo dominante son las pérdidas por activación (región de polarización por activación), debido a la velocidad limitada de las reacciones electroquímicas. En la región 2 a valores intermedios donde la caída de voltaje con la intensidad de corriente es menor, las pérdidas son debidas a la resistencia

(región de polarización óhmica). Por último, en la región 3 a altas densidades de corriente se produce una caída brusca del potencial con la densidad de corriente, en este caso las pérdidas son atribuidas a la falta de reactivos que alcancen los centros activos del electrocatalizador en los electrodos (región de polarización por concentración). Una caída brusca de voltaje en esta región también se atribuye a las limitaciones en la transferencia de materia (García-Villarubia, 2015). La polarización por concentración ocurre cuando un reactivo es consumido rápidamente en la superficie del electrodo en las reacciones electroquímicas ocurrientes, por lo que se establece un gradiente de concentración. En los resultados de la curva de polarización operado con el TRH de 8 d, la máxima densidad de potencia fue de 100.0 mW/m² producido con una densidad de corriente de 340 mA/m², en las curvas con los TRH de 4 y 1 d las densidades máximas fueron 68.7 y 59.1 mW/m² con densidades de corriente de 295 y 256 mA/m² respectivamente. Los valores mínimos producidos de densidad de potencia con los diferentes tiempos de retención fueron 0.4, 0.3 y 0.2 mW/m² con sus correspondientes densidades de corriente de 1.1, 1.0 y 0.8 mA/m² (en orden de 8, 4 y 1 d de TRH).

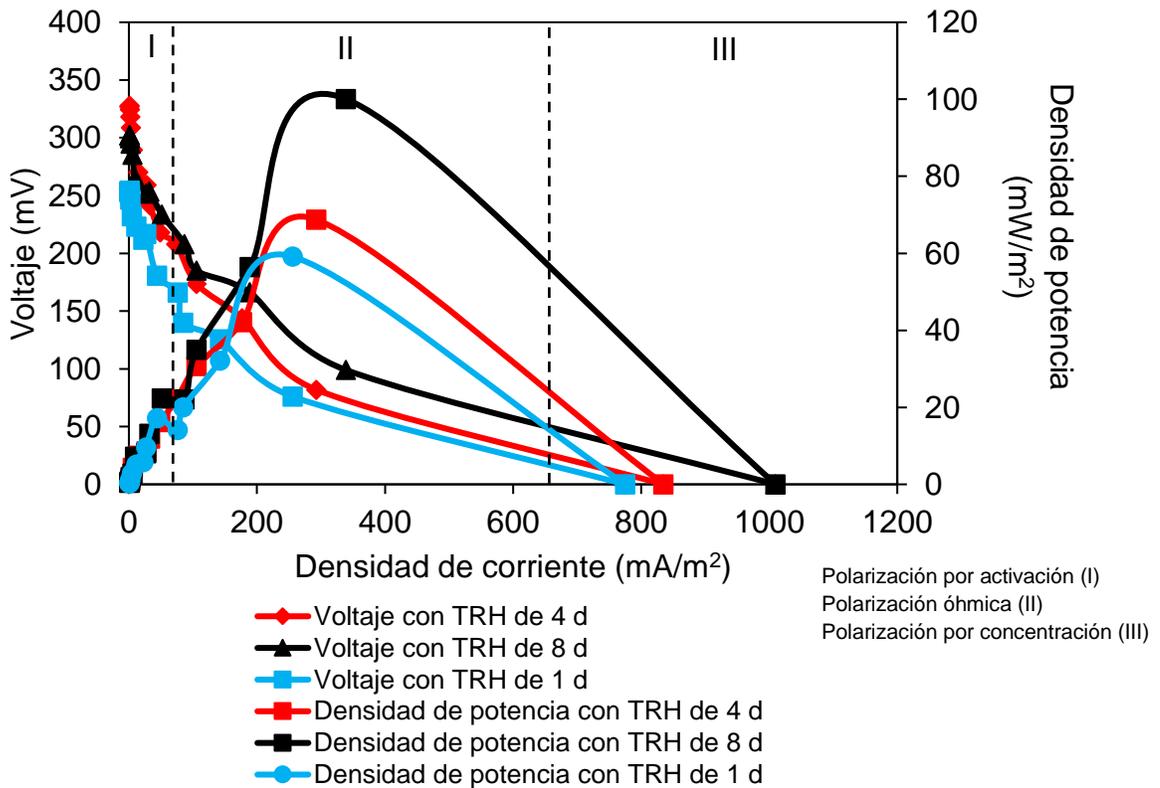


Figura 4.5. Curvas de polarización

En las curvas de polarización obtenidas en este estudio se identificaron claramente las tres regiones de pérdidas de voltajes. Se produjo un mayor voltaje cuando el reactor se operó con un TRH de 8 d y el voltaje menor fue registrado cuando se operó con un TRH de 1 d, lo que indica que la transferencia de materia aumentó a medida que decreció el tiempo de contacto entre el sustrato y las bacterias exoelectrógenas con la disminución del TRH, por lo que las pérdidas por transferencia de materia predominaron frente a las pérdidas óhmicas. Este fenómeno posiblemente se debe a que en la operación del reactor con el TRH de 8 d, los microorganismos incrementaron la producción de mediadores de electrones que se usan en la transferencia de electrones del microorganismo al electrodo, por lo que a medida que aumenta la densidad de potencia y la densidad de corriente se considera que existió un desarrollo de microorganismos que contribuyen a la producción de electricidad (Lobato et al., 2009).

De acuerdo con Logan et al. (2007) las curvas de polarización son una herramienta muy útil para el análisis y la caracterización de una CCM, en estas gráficas se puede observar que las curvas describen los puntos más altos y bajos de densidad de potencia y voltaje con respecto a la densidad de corriente y precisamente los valores máximos de densidad de potencia se encuentran en la región III y los valores mínimos aparecen en la región I.

Con el trazo de las curvas de polarización se determinó la resistencia interna del reactor, este es un parámetro importante para caracterizar un generador de corriente (Hoyos et al., 2007; Rismani-Yazdy et al., 2011) como lo es este sistema. Para este estudio las resistencias internas se calcularon mediante el método de la *pendiente del voltaje de curva de polarización* donde se calcula con la relación de la pendiente (m) entre el área electrodo anódico mediante una función lineal. Altos valores de resistencia interna causan una considerable caída de potencia debido a una pérdida óhmica, esta caída de potencia puede ser distribuida en la cámara anódica, la cámara catódica, la membrana de intercambio de protones y el electrolito. La resistencia interna de la CCM-H₂ disminuyó a lo largo de la experimentación, como era de esperar, ya que a medida que transcurrió el tiempo se fue formando mayor cantidad de biopelícula de microorganismos exoelectrógenos que se adaptaron en el ánodo, reduciéndose las pérdidas óhmicas. Los valores de la resistencia interna de este estudio fueron de 40.8, 31.0, 34.0 Ω con los tiempos de retención de 8, 4 y 1 d respectivamente. Cuando se presentan valores bajos de resistencia interna indica un buen funcionamiento del sistema, en el que la resistencia interna y la conductividad del electrolito contribuyen a un mejor flujo de electrones entre la solución y los electrodos incrementando la electricidad en la CCM-H₂.

4.3. Producción de biogás en la CCM-H₂ operado en continuo

La Figura 4.6 muestra la producción de biogás (hidrógeno, metano y dióxido de carbono) producido por la CCM-H₂ en cada fase experimental. Durante la operación del sistema con los tiempos de retención de 8, 4 y 1 d, la producción de biogás fue de 5.1 ± 0.5 , 4.7 ± 0.7 y 4.8 ± 0.6 L/d respectivamente. En la Figura 4.7 se observan las diferentes cantidades de biogás en forma de bio-hidrógeno y demás gases en L biogás/L-d producidos en el reactor, después de adicionar el I2 la producción de bio-hidrógeno incremento ligeramente y con la adición del I3 se observó un incremento inmediato, donde la tasa máxima de producción fue de 5.2 L H₂/L-d producido hasta el día 71 de operación con un TRH de 8 d. La tasa de producción de bio-hidrógeno con los TRH de 4 y 1 d fueron de 3.8 y 3.6 L H₂/L-d producidos en los días 100 y 131 de operación. El gas predominante fue el hidrógeno en todos los casos, debido a las condiciones ácidas que inhibieron en gran parte las bacterias metanogénicas, esto evitó en gran cantidad el consumo de bio-hidrógeno y la temperatura de 32°C favoreció el desarrollo de bacterias fermentativas. En la operación con el TRH de 4 y 1 d, la producción de bio-hidrógeno disminuyó, tomando en cuenta que el pH es un factor clave en la producción de bio-hidrógeno y recordando que en la fase de acondicionamiento el reactor se operó a pH de 5.5 y en las fases posteriores el pH fue controlado a 6.5. La producción de metano, se debe posiblemente a un desarrollo de pequeñas colonias de microorganismos metanogénicos sobre el ánodo, otra posible razón, es que la producción de metano se pudo haber generado por una competición por el donador de electrones, entre los microorganismos productores de bio-hidrógeno y otros microorganismos que pueden generar metano a estos rangos de pH.

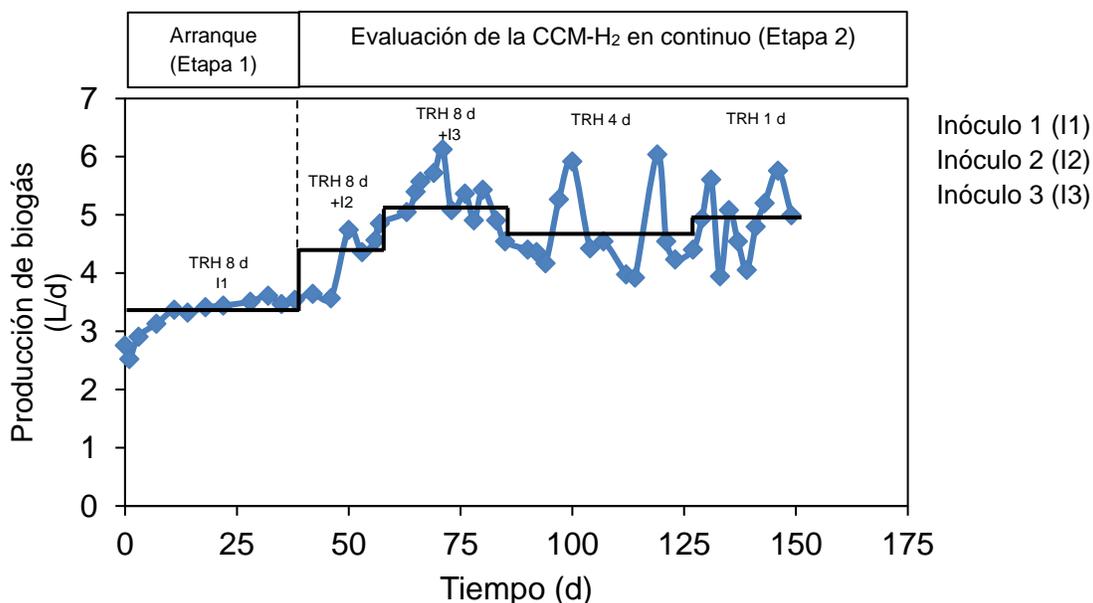


Figura 4.6. Producción total de biogás en la CCM-H₂

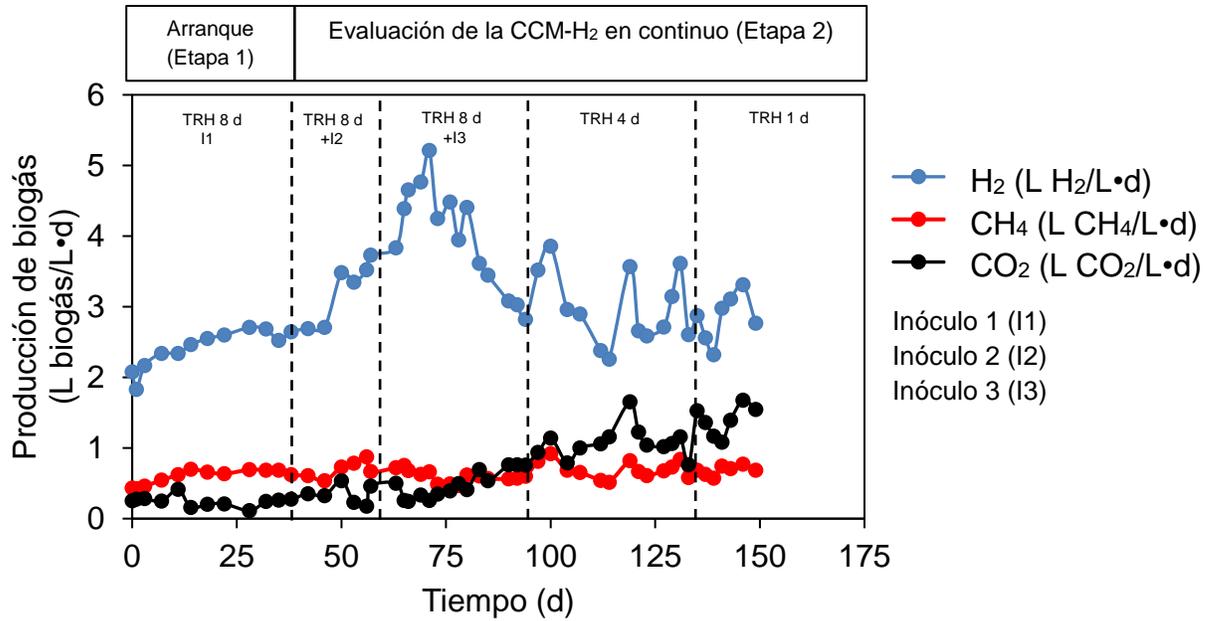


Figura 4.7. Producción de gases en la CCM-H₂

La Figura 4.8 muestra los porcentajes de producción de cada uno de los gases medidos en la CCH-H₂. Del biogás total generado cuando el reactor se operó con el TRH de 8 d, el 78.7 ± 5.2 % corresponde a bio-hidrógeno, el 11.8 ± 1.6 y 9.3 ± 4.4 % pertenecen a CH₄ y CO₂ respectivamente. Con el TRH de 4 d, la producción porcentual fue de 62.5 ± 3.5 , 22.8 ± 4.1 y 14.5 ± 0.8 % de bio-hidrógeno, CH₄ y CO₂ respectivamente y, con el TRH de 1 d, la producción porcentual fue de 59.4 ± 3.8 , 26.4 ± 4.4 y 14.1 ± 0.7 % respectivamente.

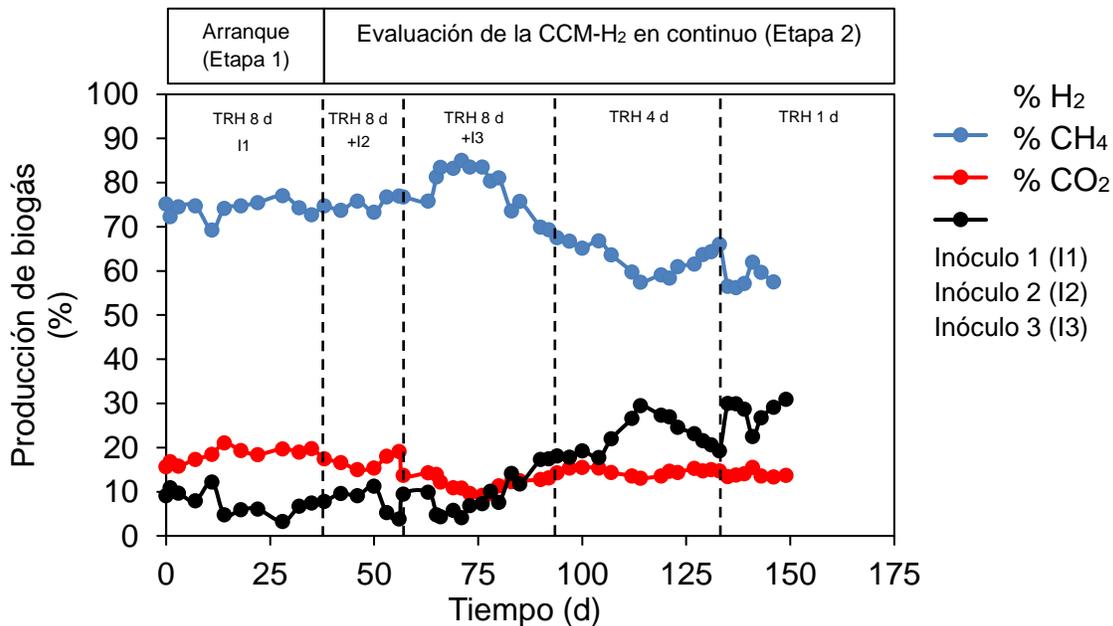


Figura 4.8. Producción porcentual de biogás en la CCM-H₂

Al igual que en el voltaje el incremento de bio-hidrógeno se observó después de la adición del I3 en la CCM-H₂, después del día 85 de operación la producción disminuyó significativamente. A través de un análisis ANOVA-Tukey se demostró que hay una diferencia significativa en la producción de bio-hidrógeno con el TRH de 8 d comparado con la producción con los TRH de 4 y 1 d, con una diferencia del 27 % de producción (Ver anexo 7.1). El análisis también demostró que no hay una diferencia significativa en la producción entre los tratamientos de 4 y 1 d.

En otros estudios se ha reportado la presencia de metano en reactores productores de bio-hidrógeno. [Yang et al. \(2007\)](#) estudiaron la producción de hidrógeno usando como inóculo un cultivo mixto de bacterias, en un reactor continuo a una temperatura de 35°C y un TRH de 1 d. Los autores obtuvieron una composición de bio-hidrógeno de 30 %, los resultados presenciaron metano en todas las pruebas, incluso cuando el pH fue inferior a 5. Los autores afirman que es posible que algunos de los microorganismos metanogénicos pueden resistir en la biopelícula formada en las paredes del reactor, o en los materiales floculentos en suspensión protegiéndose de los pH ácidos. También observaron que el contenido de bio-hidrógeno disminuyó, cuando aumentaba el contenido de metano y otros gases tal como se observó en este caso (Figura 4.9). Con el pretratamiento realizado y bajo estas condiciones de operación en la CCM-H₂, se produjo metano en toda la experimentación, aunque la producción de metano y CO₂ fue baja en cada fase. Un parámetro de control influyente sobre la producción de metano es el TRH, según estudios, los bajos tiempos de retención favorecen la producción de bio-hidrógeno cuando se utiliza agua residual real y un TRH largo favorece la producción de bio-hidrógeno con agua sintética, ya que no hay presencia de bacterias metanogénicas en el agua de alimentación, por lo que la tasa de producción de éstas es mucho más baja que las productoras de hidrógeno. Otro parámetro importante influyente es el pH, las bacterias metanogénicas tienen actividad en un rango de 6-8, algunas especies acidófilas crecen a pH de entre 5.6 y 6.2, por lo que algunas bacterias metanogénicas desarrolladas en el ánodo, pudieron haber producido metano en este pH. En la generación de bio-hidrógeno la selección de los inóculos también es un factor muy importante, generalmente son utilizadas las bacterias como inóculo en cultivo puro o mixto ([Arslan et al., 2015](#)). Se ha encontrado que un buen cultivo mixto de bacterias para la producción de bio-hidrógeno habitan en ambientes como suelo, aguas residuales, compostas y lodo anaerobio ([Bedoya et al., 2008](#)). Es por ello que en este estudio, se utilizó una mezcla de inóculo en medio puro y dos inóculos en medios mixtos, dado que en cultivos mixtos existen bacterias que utilizan al hidrógeno con un donador de electrones, se realizó un pretratamiento para inhibir aquellos microorganismos que utilizan al bio-hidrógeno como un sustrato.

4.4. Producción simultánea de electricidad y bio-hidrógeno en la CCM-H₂

4.4.1. Rendimiento de electricidad y bio-hidrógeno

En la Figura 4.9 se muestran la producción simultánea de electricidad y bio-hidrógeno obtenido durante las dos etapas en que fue operada la CCM-H₂. Se puede observar los registros de voltaje y los litros de bio-hidrógeno producidos por litro de biogás generado en un día para cada tiempo de retención y cada inóculo adicionado. La máxima producción de bio-hidrógeno en este estudio, sucedió cuando se adicionó la mezcla de lodos anaerobios al ánodo (I3), alcanzando una tasa máxima de 5.2 L H₂/L·d y un voltaje de 671 mV. Al igual que la electricidad, la producción de bio-hidrógeno incrementó con el I3, debido a que este inóculo contenía un amplio consorcio bacteriano mixto en cuyo pretratamiento fueron seleccionadas las bacterias productoras de bio-hidrógeno, lo que era de esperarse ya que fueron inhibidos parte de los metanógenos.

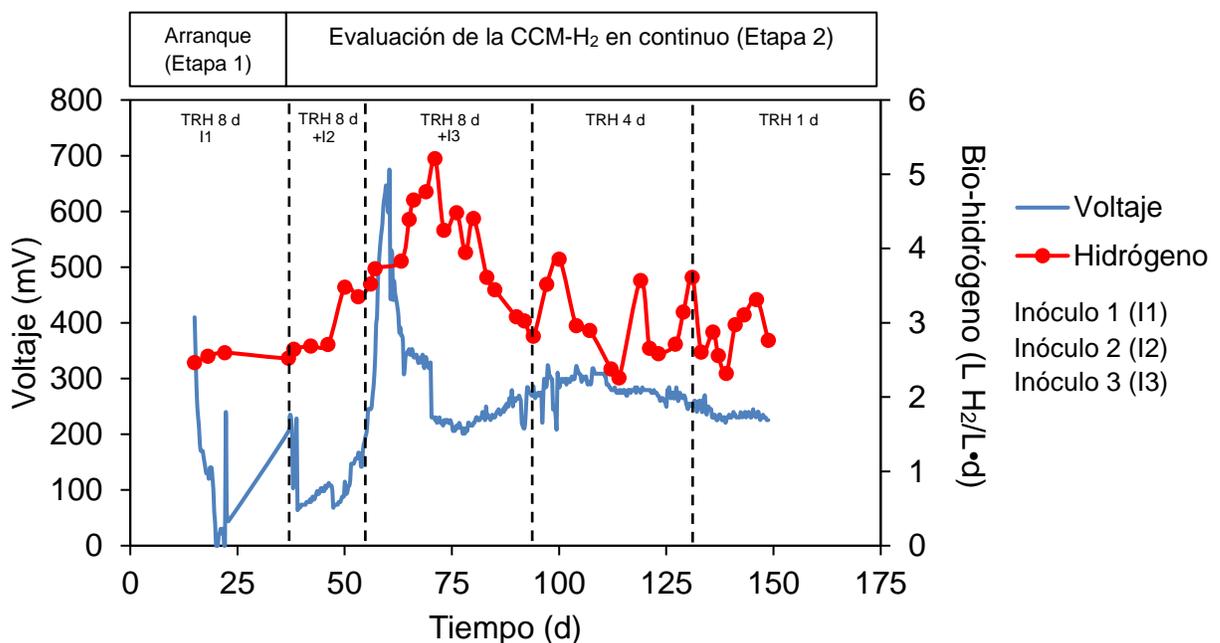


Figura 4.9. Producción simultánea de electricidad y bio-hidrógeno con diferentes inóculos y TRH

Después de haber inoculado puede inferirse que los microorganismos comenzaron a desarrollarse sobre la biopelícula, existiendo un período de adaptación al agua sintética. Asimismo con la resistencia que se trabajó, se desarrollaron microorganismos exoeletrógenos y productores de bio-hidrógeno, por lo que las actividades microbianas fueron diferentes. Una vez desarrollada la biopelícula

sobre el ánodo, tanto el voltaje como la producción de bio-hidrógeno se estabilizaron. El voltaje fue mayor con la adición del I3, tomando en cuenta que en el lodo, la cantidad de bacterias contenidas fue mayor, además de que la cantidad en volumen de este inóculo fue en mayor volumen en comparación con el I2 en una relación 5:1, por lo que a una mayor cantidad de bacterias, la energía química contenida dentro de las moléculas orgánicas solubles como la sacarosa son mayormente aprovechados por el metabolismo microbiano y se produce una mayor transferencia de electrones hacia el ánodo, incrementando la electricidad y bio-hidrógeno de forma exuberante hasta llegar a la estabilización de ambos parámetros. También debe considerarse que las bacterias puras observadas en el I2 (cocos y bacillos esporulados) estaban contenidas en de la mezcla de lodos (I3), las cuales pueden considerarse como productoras de electricidad y de bio-hidrógeno por su incremento simultáneo. En la Figura anterior (4.9) se observa que la producción de bio-hidrógeno incrementó durante la fase de +I3. La producción de bio-hidrógeno con el inóculo I1 fue de 2.4 ± 0.2 L H₂/L·d, con la adición de I2 e I3, la producción incrementó de forma continua hasta el día 71 de operación, alcanzando una producción de 3.1 ± 0.4 y 4.0 ± 0.6 L H₂/L·d respectivamente. A partir del día 72 la producción de bio-hidrógeno comenzó a disminuir, esta producción se observó durante la operación con un TRH de 8 d. Parte del hidrógeno generado en la CCM-H₂ fue utilizado en forma de protones, probablemente, se generaron altos potenciales catódicos, es decir que la pérdida de hidrógeno (H⁺) fue aprovechada para la producción de voltaje, por lo que el incremento de electricidad fue proporcional al incremento de bio-hidrógeno. La mayor eficiencia de producción simultánea de electricidad y bio-hidrógeno se observó la fase de la adición del I3 operado con un TRH de 8 d.

En la Tabla 4.2 se resumen las eficiencias producidas de voltaje, densidad de potencia, potencia volumétrica y producción de bio-hidrógeno para cada tiempo de retención hidráulico. Como se observa, los valores más altos de voltaje, densidades de potencia y producción de bio-hidrógeno máximo se obtuvieron cuando se adicionó la mezcla de lodos anaerobios (I3) al reactor (operando con TRH de 8 d), posiblemente se debe a que este inóculo recibió el pretratamiento de choque térmico, donde fueron seleccionadas las bacterias fermentativas productoras de hidrógeno, mismas que pueden considerarse como electroactivas por el incremento simultáneo en la producción de electricidad. El incremento de ambos parámetros se observó de manera inmediata, probablemente se debe a que los inóculos 2 y 3 se encontraban en desarrollo, por lo que incrementó la disposición de microorganismos en el compartimento anódico. Al disminuir el TRH de 8 a 1 d, se observó que la electricidad disminuyó en un 56 % y el bio-hidrógeno en un 28 %, esto puede atribuirse al envejecimiento de la mezcla de inóculos, o por sobrepotenciales anódicos y catódicos (pérdidas de voltaje). Respecto a la

producción de bio-hidrógeno, se observó que en la secuencia de adición de los inóculos la producción incrementó. Cuando se evaluó el reactor con el I1 se produjo 2.4 ± 0.2 L H₂/L·d, después de la adición del I3 se produjo 4.0 ± 0.6 L H₂/L·d, lo que corresponde a un 40 % de incremento en la producción. El voltaje incrementó en un 64 %.

Tabla 4.2. Producción máxima de electricidad y de bio-hidrógeno en la CCM-H₂

TRH	Inóculo	Voltaje (mV)	Densidad de potencia (mW/m ²)	Densidad de potencia volumétrica (W/m ³)	Producción de bio-hidrógeno (L H ₂ /L·d)
8d	I1	240	5.8	0.8	2.4 ± 0.2
	+I2	186	3.5	0.5	3.1 ± 0.4
	+I3	671	45.9	6.4	4.0 ± 0.6
4 d	Mezcla de inóculos	323	10.6	1.4	2.9 ± 0.4
1 d	Mezcla de inóculos	284	8.2	1.1	2.9 ± 0.4

4.4.2. Rendimiento molar en la producción hidrógeno con diferentes inóculos

Respecto a la cantidad de bio-hidrógeno producido por mol de sustrato, en la práctica la producción es alrededor de 2-3 moles de hidrógeno por mol de sustrato (Hallenbeck y Benemann, 2002). La producción que puede alcanzarse en el proceso de producción de hidrógeno mediante digestión anaerobia es sólo del 33% de la DQO, considerando que cada mol de sustrato es fermentada a dos moles de acetato, dos moles de dióxido de carbono y cuatro moles de hidrógeno (Kalogo y Bagley, 2008). Generalmente, la DQO transformada en bio-hidrógeno está por debajo del 20%, que corresponde a una media de 2.5 mol hidrógeno/mol de sustrato. En este estudio el rendimiento obtenido en la primera etapa (con I1, TRH de 8 d, alimentación con agua municipal y pH de 5.5) fue de 2.2 ± 0.1 mol H₂/mol sacarosa. Con la adición del I2 e I3 (con TRH de 8 d, alimentación con agua sintética y pH de 6.5) los rendimientos fueron 2.3 ± 0.1 y 2.4 ± 0.1 mol H₂/mol sacarosa y en la evaluación con los TRH de 4 y 1 d los resultados fueron de 1.83 y 1.73 mol H₂/mol sacarosa respectivamente.

Existen diferentes métodos para la producción de bio-hidrógeno (Dincer y Acar., 2015), una de las principales formas de obtención mediante procesos biológicos es por fermentación oscura con reactores SBR (Reactor biológico secuencial), este proceso tiene características similares a este estudio respecto a la operación (pH, temperatura, TRH e incluso en el pretratamiento térmico-ácido).

Cardoso et al. (2014) evaluaron la producción de bio-hidrógeno utilizando un reactor alimentado con lactosa, el inóculo que utilizaron fue un consorcio microbiano mixto obtenido de una PTAR de productos lácteos, operaron el reactor con una temperatura de 28-42°C. Dentro de sus resultados obtuvieron que la máxima producción de bio-hidrógeno fue con una temperatura de 30-35°C alcanzando un rendimiento de 4.8 mol H₂/mol de lactosa.

Otro estudio en el que utilizaron condiciones similares a este trabajo fue Sung et al. (2003) quienes evaluaron las condiciones de pH y temperatura y observaron la forma en que afectan la producción biológica de hidrógeno, como inóculo utilizaron lodo anaerobio pretratado con calor a 100°C durante 15 min, operaron el reactor en continuo con un pH de 5.5, un TRH de 1 d y sacarosa como sustrato, alcanzaron un máximo rendimiento de 2.2 mol H₂/mol sacarosa.

Otro tipo de proceso para la producción de hidrógeno es con celdas de electrolisis microbianas (MEC), este tipo de celdas requiere de una carga eléctrica externa para la producción del hidrógeno (Heidrich et al., 2013; Piciotta et al., 2012). Hou et al. (2014) realizaron un estudio en el que su objetivo principal fue incrementar la producción de hidrógeno mediante la inhibición de bacterias metanogénicas con irradiación de luz UV, como ánodo utilizaron fibra de carbón y el cátodo fue un paño de carbón impregnado con 0.5 mg/cm² de Pt. El voltaje aplicado en la celda de electrólisis fue de 0.8 V alcanzando un rendimiento máximo de 3.7 mol H₂/mol sacarosa.

En la Tabla 4.3 se muestran los resultados de diferentes procesos para la producción de bio-hidrógeno, entre ellos con reactores SBR por fermentación oscura y por reactores MEC, en la que se muestran los máximos rendimientos obtenidos por diferentes autores de cada sistema donde se comparan con los resultados de la CCM-H₂ de este estudio.

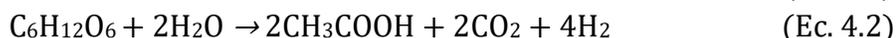
Tabla 4.3. Producción de hidrógeno por diferentes procesos

Reactor	Inóculo	Sustrato	Operación	Rendimiento (mol H ₂ /mol sustrato) ^a ó (L H ₂ /L·d) ^b	Referencia
SBR	Cultivo microbiano mixto	Sacarosa	Continuo	2.2 ^a	Sung et al. (2003)
Sistema respirométrico	Cultivo mixto con pretratamiento	Glucosa	Continuo	0.9 ^a	Oh et al. (2004)
Tanque con agitación	Clostridium butyricum	Sacarosa	Lote	2.7 ^a	Chen et al. (2005)
Tanque con agitación	Cultivo microbiano mixto	Remolacha de azúcar	Continuo	1.7 ^a	(Hussy et al., 2005)
SBR	Biopelícula	Glucosa	Continuo	2.4 ^a	(Leite et al., 2008)

Reactor	Inóculo	Sustrato	Operación	Rendimiento (mol H ₂ /mol sustrato) ^a ó (L H ₂ /L·d) ^b	Referencia
MEC	Biopelícula	Agua municipal	Continuo	0.1 ^b	(Gil-Carrera et al., 2013)
MEC	---	Patatas	Lote	0.7 ^b	(Kiely et al., 2011)
MEC	Biopelícula	Agua municipal	Lote	0.3 ^b	(Cusick et al., 2010)
MEC	Mezcla de lodos	Sacarosa	Continuo	3.7 ^a	(Hou et al., 2014)
SBR	Estiércol	Glucosa	Lote	0.8 ^a	(Fangkum y Reungsang, 2011)
CCM-H ₂	1) Biopelícula 2) Bacterias Puras 3) Mezcla de lodos anaerobios	Sacarosa	Continuo	2.3 ^a 5.2 ^b	Este estudio

SBR: reactor biológico secuencial
MEC: celda de electrólisis microbiana

Las condiciones de operación de la CCM-H₂ para la producción de bio-hidrógeno tiene características semejantes a los reactores de fermentación oscura (SBR), este reactor también tiene la funcionalidad de una MEC, la ventaja de este reactor es que no utilizó una fuente de electricidad externa para la producción de bio-hidrógeno, por lo que el diseño de esta CCM permitió la producción de electricidad y bio-hidrógeno en un solo proceso. Comparando los rendimientos, este trabajo tiene resultados semejantes a [Sung et al. \(2003\)](#), [Leite \(2008\)](#) y [Hussy et al. \(2005\)](#) (ver Tabla 4.3). Se sabe que los microorganismos anaerobios facultativos y obligados pueden convertir la sacarosa en bio-hidrógeno. Teóricamente, la sacarosa puede convertirse directamente en bio-hidrógeno por bacterias anaeróbicas a través de compuestos intermediarios como el butirato o el acetato, dando rendimientos de 2-4 mol hidrógeno por mol de hexosa convertido a partir de sacarosa (Ec.4.1 y 4.2) ([Hussy et al., 2005](#)).



Tanto las bacterias puras como en consorcios microbianos mixtos pueden generar electricidad, sin embargo, la descripción de la microbiología de una biopelícula y sus implicaciones de la ecología microbiana sobre el funcionamiento han sido poco estudiados ([Lovley, 2008](#); [Bretschger et al., 2010](#)). Conocer los procesos de colonización, invasión y sucesión de las poblaciones microbianas puras y mixtas que producen electricidad permitirá explorar nuevos métodos para la producción de electricidad ([Logan y Regan, 2006](#)).

4.5. Producción de electricidad con la CCH acoplado a la CCM-H₂

La Figura 4.10 muestra la producción de voltaje con la CCH, en la que se utilizó como combustible el bio-hidrógeno captado por la CCM-H₂, el cual no recibió algún tratamiento de purificación en la separación de CH₄ y CO₂. También se realizó una curva de voltaje con hidrógeno puro para comparar el comportamiento de producción de electricidad entre ambos tipos de hidrógeno. En este experimento se observó la cantidad de voltaje producido con volúmenes de 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 y 50 mL de bio-hidrógeno, los cuales fueron inyectados al ánodo de la CCH. El máximo voltaje registrado fue de 459 mV con una muestra de 50 mL de bio-hidrógeno (obtenido de la CCM-H₂ operada con un TRH de 8 d). El bio-hidrógeno captado durante la operación con tiempos de retención de 4 y 1 d generó voltajes de 282 y 197 mV con volúmenes de muestra de 50 mL. Con hidrógeno puro se realizó el mismo procedimiento para la generación de voltaje, éste contenía 99.9% de pureza, con el cual se registró un máximo voltaje de 1 V con una muestra de 45 mL.

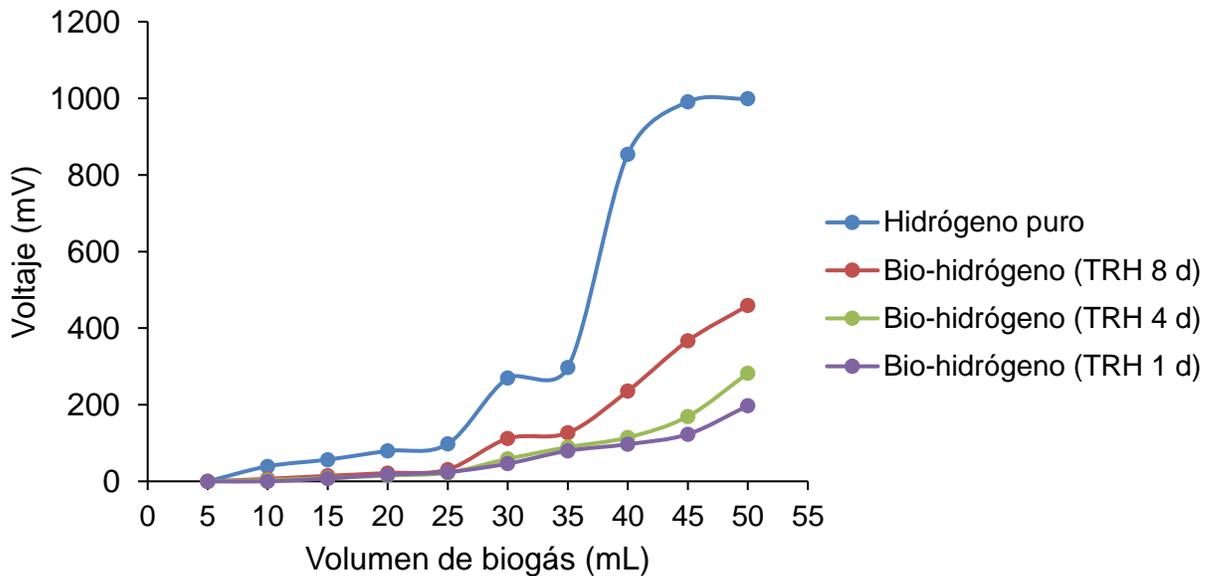


Figura 4.10. Producción de electricidad con la CCH

La Figura 4.11 muestra el tiempo de agotamiento de voltaje con muestras de 50 mL, para ello se tomaron lecturas de voltaje a través del tiempo, esto representa el consumo de electricidad por parte de la CCH. El hidrógeno puro tardó 170 min en agotar 1 V, el bio-hidrógeno captado con un TRH de 8 d, tardó 39 min en consumir 459 mV y el bio-hidrógeno captado con los tiempos de retención de 4 y 1 d, agotó 282 y 197 mV en 23 y 19 min respectivamente. Entre el hidrógeno puro y el bio-hidrógeno existe una diferencia del 80 % de eficiencia en el tiempo de

agotamiento. Después del agotamiento de voltaje en la celda es necesario aplicar más bio-hidrógeno para generar más electricidad.

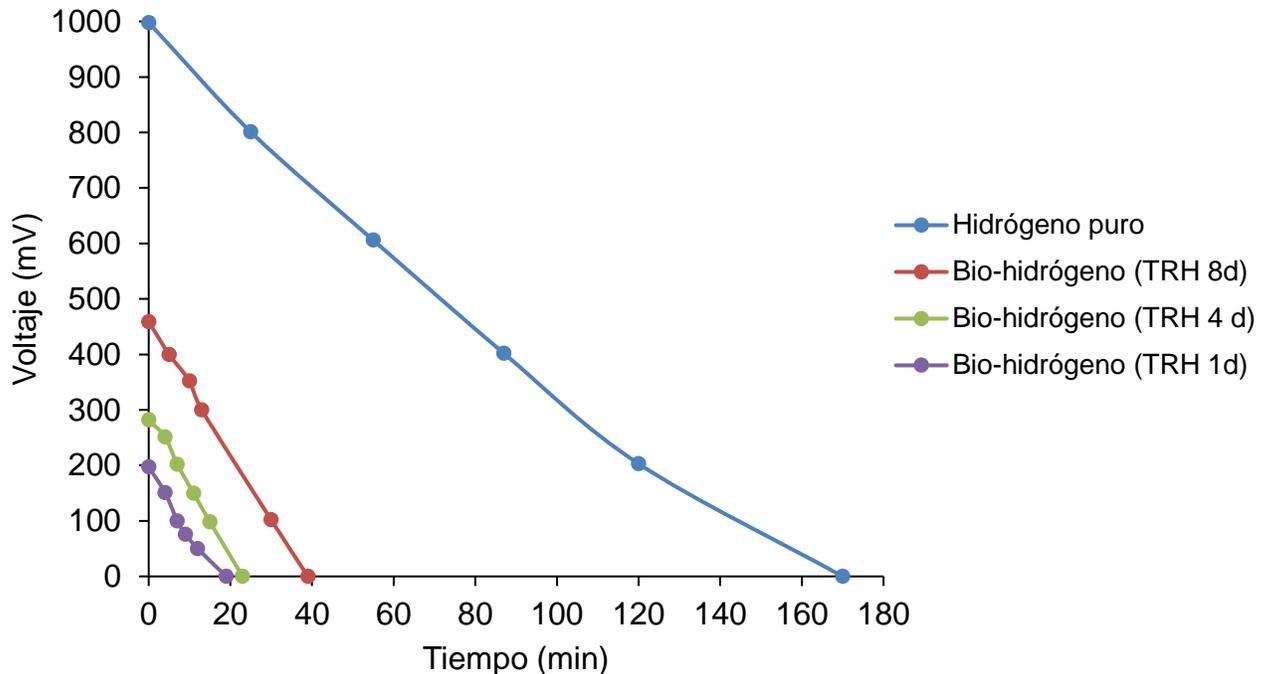


Figura 4.11. Tiempo de agotamiento de voltaje en la CCH a partir de bio-hidrógeno e hidrógeno puro

Los resultados del análisis estadístico ANOVA-Tukey de este experimento demostraron que hay una diferencia significativa entre las producción de voltajes a partir de bio-hidrógeno con todos los tratamientos, es decir con todos los tiempos de retención hidráulico. Conforme se aumenta la cantidad de volumen inyectado en el ánodo de la CCH incrementa la producción de voltaje, incluso con el hidrógeno puro, por lo que la concentración, la producción y el rendimiento de hidrógeno en la CCM-H₂ están relacionados con la eficiencia de la CCH, lo que explica estas diferencias. Se observó que entre más contenido de bio-hidrógeno en una muestra de biogás (pureza) mayor será la producción de energía, el mismo caso pasa en la fuente de oxígeno que se alimenta al ánodo, en el que puede utilizarse aire u oxígeno puro, por lo que la relación $H_{2(puro)}/O_{2(puro)}$ con $H_{2(bio-hidrógeno)}/O_{2(aire)}$ tiene una diferencia de ~60 % de producción, es por eso que el nivel de pureza afecta la eficiencia de la CCH donde las placas bipolares a ambos lados de la celda ayudan a distribuir los gases y sirven como colectores de corriente, el gas de hidrógeno fluye a través de los canales hasta el ánodo, donde un catalizador hace que las moléculas de hidrógeno se separen en protones y

electrones. La membrana sólo permite que los protones pasen a través de ella, mientras que los protones se conducen a través de la membrana al otro lado de la celda, la corriente de electrones negativamente-cargados sigue un circuito externo hacia el cátodo. En el otro lado de la celda, el oxígeno gaseoso, típicamente extraído del aire del ambiente, fluye a través de los canales hacia el cátodo. Los electrones reaccionan con el oxígeno y los protones del hidrógeno (que han migrado a través de la membrana) en el cátodo para formar agua creando una fuerza electromotriz (Cheng et al., 2007). Una ventaja de este sistema híbrido es que el hidrógeno se puede producir a partir de agua residual o sintética con altas concentraciones de sales disueltas (conductividad eléctrica), mientras que en otros procesos electroquímicos como son los electrolizadores acoplados a una celda de combustible de hidrógeno solo se utiliza agua desionizada que no exceda una concentración de $2 \mu\text{s/cm}$ de conductividad, ya que la formación e incrustación de sales sobre los electrodos del electrolizador evita su funcionamiento, lo que resulta una limitante para la producción de electricidad con la CCH, mientras que en este estudio fue posible producir electricidad sin el uso de electrolizadores ni fuentes de energía externas a pesar de la impureza del biogás.

Debido a las deficiencias que presentan tanto los procesos de fermentación oscura como las celdas electroquímicas, en sus niveles alcanzados de producción de hidrógeno, recientes investigaciones han sugerido acoplar ambos sistemas, de tal manera que los productos de la fermentación oscura pueden ser aprovechados por los microorganismos presentes en celdas MEC o CCM para producir biohidrógeno. Sin embargo hasta el momento son muy pocos los trabajos reportados en la literatura en los que se utilizan sistemas acoplados, ya sea por fermentación oscura-MEC o CCM-MEC. Por ejemplo Sun et al. (2008) desarrollaron un sistema acoplado CCM-MEC para la producción de hidrógeno a partir de acetato, utilizaron una celda de una sola cámara, como electrodos utilizaron papel de carbón con Pt como catalizador, como inóculo utilizaron lodo anaerobio. Los componentes de la MEC fueron los mismos que los de la CCM. El volumen máximo de hidrógeno que obtuvieron fue $15 \text{ mL H}_2/\text{L}\cdot\text{d}$.

En otro estudio utilizaron un sistema MEC-CCM, lo que permitió demostrar que la producción de hidrógeno puede ser manipulada variando la cantidad de corriente que se aplica en la MEC. Este voltaje puede ser regulado aplicando diferentes resistencias conectadas al sistema, en su estudio utilizaron cambios de resistencias de 10Ω hasta $10 \text{ K}\Omega$, la corriente y el volumen de hidrógeno producidos por el sistema variaron. Alcanzaron una producción de $2.9 \pm 0.2 \text{ mL H}_2/\text{L}\cdot\text{d}$ (Sun et al., 2008).

También se han realizado algunos estudios acoplando un sistema de fermentación oscura con celdas MEC, por ejemplo Lalarette et al. (2009) utilizaron la

fermentación de un agua residual con lignocelulosa y celobiosa la que fue adicionada a una celda MEC. Mediante la fermentación oscura los volúmenes de hidrógeno que obtuvieron fueron: en el caso de la lignocelulosa 250 mL H₂/L·d y 1650 mL H₂/L·d para la celobiosa. Con la MEC produjeron un volumen adicional de hidrógeno de 1000 mL H₂/L·d para la lignocelulosa y 960 mL H₂/L·d para la celobiosa.

En este trabajo de investigación se buscó la forma en que converjan este tipo de procesos, es por eso que las condiciones de operación de la CCM para la producción de bio-hidrógeno tiene características semejantes a los reactores de fermentación oscura, tanto en la temperatura de operación, como en los tiempos de retención hidráulicos. Este reactor también tiene la funcionalidad de una MEC, la ventaja de este reactor es que no utilizó una fuente de electricidad externa para la producción de hidrógeno. Por otra parte el reactor de este estudio se basó en los componentes de una CCM, produciendo electricidad directa, por lo que su diseño permitió la producción de electricidad y bio-hidrógeno en un solo paso. El nombre “sistema híbrido” surge del acoplamiento entre una CCM que alimenta con bio-hidrógeno a una CCH, estos procesos son combinados para que dentro de un solo sistema existan dos fuentes de producción de electricidad, siendo esto lo novedoso de esta investigación. En sistemas de acoplamiento (sistemas híbridos), los trabajos anteriores son lo más parecido al tema de esta tesis. Durante la investigación de este proyecto no se encontró literatura publicada sobre el acoplamiento de una CCM productora de hidrógeno con una CCH donde se utilice hidrógeno producido biológicamente como combustible, por lo que no fue posible comparar con otros estudios los resultados del apartado 4.5 (Figuras 4.10 y 4.11) de este trabajo.

Para que un sistema híbrido pueda llegar a desarrollarse a mayor escala, se deben realizar mayores pruebas que permitan su optimización. Algunos problemas que presenta este sistema son los siguientes: la producción de bio-hidrógeno se opera bajo condiciones inestables, hay factores que afectan la estabilidad de la CCM-H₂, el tipo de sustrato y su concentración, la actividad catalítica de las bacterias presentes en la biopelícula, la resistencia interna. En el caso de la CCH es recomendable trabajar con celdas que produzcan un alto voltaje. Es necesario contemplar las condiciones de un reactor productor de bio-hidrógeno y uno productor de electricidad, ya que algunas condiciones favorecen la producción de bio-hidrógeno pero afectan la producción de electricidad y viceversa. Un cambio desfavorable en los factores mencionados, puede ocasionar la inestabilidad del sistema global. Por lo tanto se requiere mayor esfuerzo y un mayor número de investigaciones para lograr la estabilidad y optimización a largo plazo en un sistema acoplado CCM-H₂-CCH.

4.6. Cinética de producción de bio-hidrógeno operado en lote (batch)

La Figura 4.12 presenta los resultados de la cinética de producción de bio-hidrógeno operado en lote, esta prueba se realizó con el modelo ajustado de Gompertz, el cual es un modelo adaptado para describir el progreso acumulativo de producción de hidrógeno en un experimento lote, tal como se evalúa en este trabajo. Para ello se utilizó la función Solver en Microsoft Excel, este modelo ha sido modificado para estimar la producción de bio-hidrógeno acumulado en el procesos de digestión anaerobia (Ginkel et al., 2005; Lin y Lay, 2004).

En esta aproximación empírica, se utilizan tres parámetros: la tasa de producción de bio-hidrógeno (TPH), la producción máxima de bio-hidrógeno (H_{max}) y el tiempo de latencia (λ); estos parámetros son ajustados para que la ecuación coincida con las mediciones experimentales. Esta prueba se realizó al finalizar la operación en continuo, con el uso de esta herramienta se obtuvieron los valores que describen la cinética como resultado de la producción de bio-hidrógeno en operación en lote. El valor de λ fue de 4 h, este tiempo representa la fase de latencia antes de la producción exponencial de bio-hidrógeno, el valor de H_{max} fue de 1527 mL, que representa la producción máxima acumulada de bio-hidrógeno en el reactor, la tasa de producción máxima (velocidad de producción) fue de 90.7 mL/h. Los parámetros anteriores fueron ajustados al modelo de Gompertz.

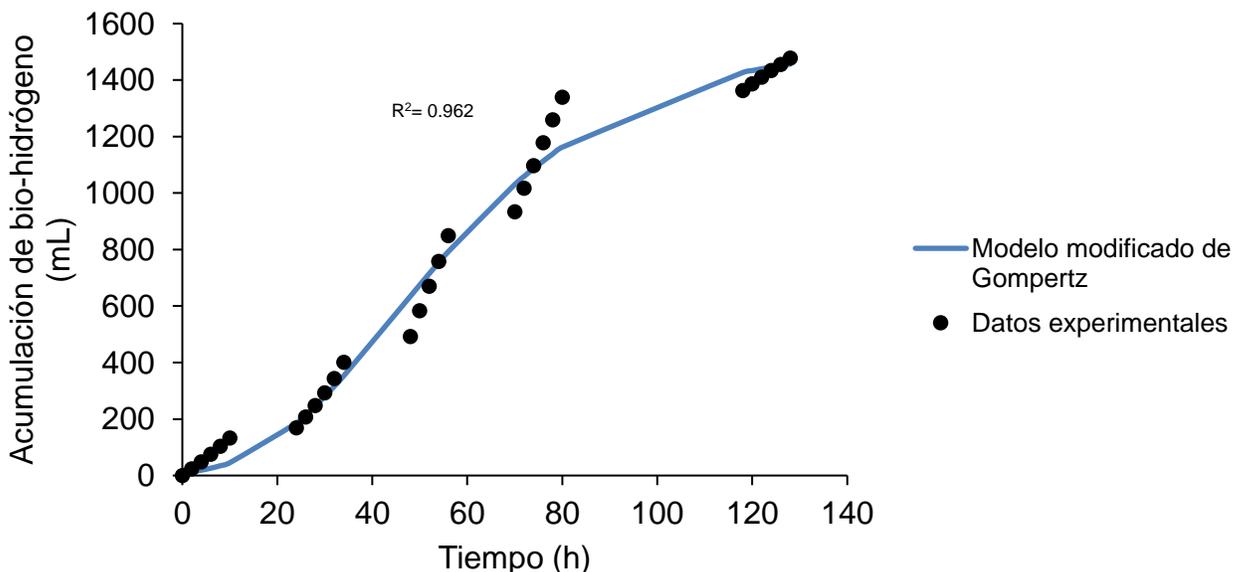


Figura 4.12. Cinética de acumulación de bio-hidrógeno en la CCM-H₂

La Figura 4.13 muestra la producción de bio-hidrógeno en mmoles acumulados durante la operación en lote, para esta prueba también se utilizó la herramienta Solver, tiempo de latencia (λ) fue de 4 h, el valor de H_{max} fue de 1.8 mmol de bio-

hidrógeno y el valor de R_{\max} fue de 0.2 mmol/h. La máxima acumulación de bio-hidrógeno fue de 3.2 mmol/h en el transcurso de 128 h de operación, que fue el tiempo de la corrida. En ambas gráficas (Figura 4.12 y 4.13) se presenta el valor del coeficiente de correlación, por lo que este modelo ha sido utilizado por diferentes autores con buenos ajustes de $r^2 > 0.90$, donde se correlacionan resultados experimentales. Los valores en ambas gráficas fueron de 0.96 ($R^2 = 96\%$), lo que muestra que los coeficientes obtenidos son adecuados para predecir los valores del sistema de producción de bio-hidrógeno y los valores teóricos encontrados fueron lo más cercano a los resultados, lo cual indica una concordancia aceptable entre los datos experimentales y los ajustados a través del modelo.

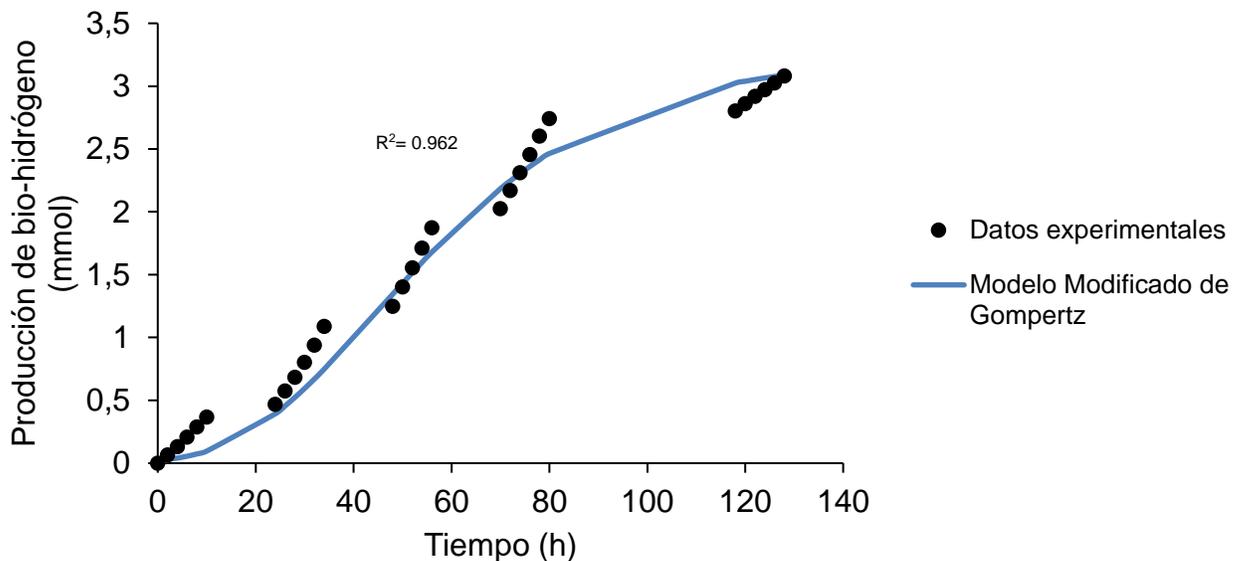


Figura 4.13. Cinética de producción de bio-hidrógeno en mmol en la CCM-H₂

En la Figura 4.14 se muestra la velocidad volumétrica específica de producción de bio-hidrógeno (VVPH), esta gráfica refleja las velocidades de producción de bio-hidrógeno a través de la corrida. La máxima VVPH obtenida fue de 90.7 mL/L·h.

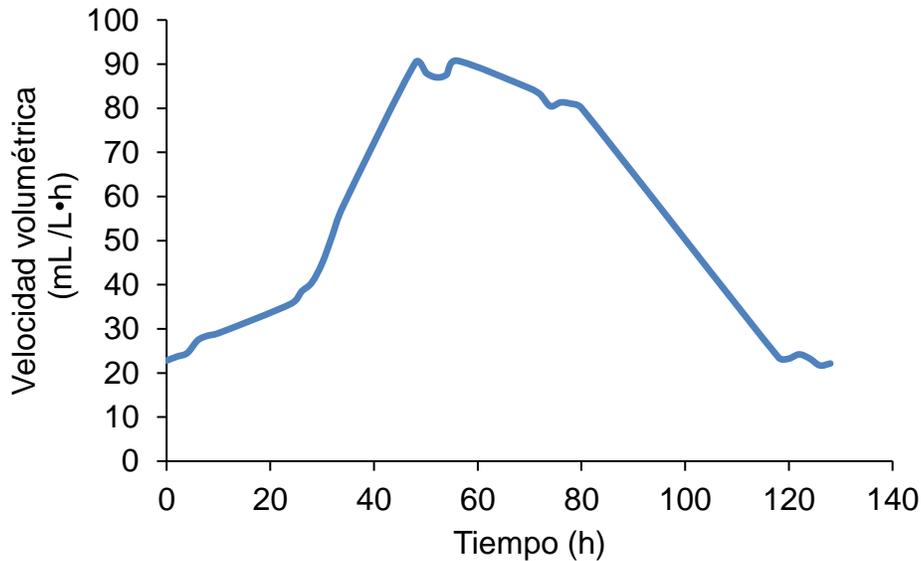


Figura 4.14. Velocidad volumétrica de producción de bio-hidrógeno en lote

En la Tabla 4.4 se presenta el consolidado de los resultados obtenidos en la producción de bio-hidrógeno en el reactor operado en lote.

Tabla 4.4. Resultados de la cinética de producción de bio-hidrógeno

Temperatura (°C)	Tiempo de latencia (h)	Producción de bio-hidrógeno (mmol)	Rendimiento (mol H ₂ /mol de sacarosa)	VVPH (mL/L·h)	Producción de bio-hidrógeno (H _{max} (mL))	Porcentaje de bio-hidrógeno (%)
32	4	3.2	1.6	90.7	1527	54

Estos resultados son similares a los reportados de [Carvajal y Buitrón \(2009\)](#) quienes en su estudio utilizaron un reactor SBR operado en lote para la producción de bio-hidrógeno a partir de la fermentación oscura, evaluaron el efecto de la temperatura en el que utilizaron un inóculo colectado de un reactor UASB que trata agua de la industria tequilera, al cual le realizaron un pretratamiento térmico llevándolo a una 104°C por 24 h. Observaron mejores resultados cuando la temperatura de control en el reactor fue de 35°C, alcanzaron una acumulación máxima de bio-hidrógeno de 2270 mL (vs 1527 mL de este estudio), con un valor de λ de 5 h (vs 4 h de este estudio), la velocidad volumétrica de producción de bio-hidrógeno fue de 58 mL/L·h (vs contra 90 mL/L·h de este estudio), la producción fue de 3.7 mmol de bio-hidrógeno (vs 3.2 mmol de bio-hidrógeno de este estudio) y el máximo rendimiento que obtuvieron fue de 2.2 mol H₂/mol de glucosa (vs 1.6 mol H₂/mol de sacarosa de este estudio), alcanzaron un

62 % de bio-hidrógeno y este estudio el porcentaje fue del 54 %. Se puede observar que la mayoría de los parámetros medidos en ambos casos son valores cercanos, considerando que se utilizaron las mismas bases de operación de pretratamiento térmico ácido en el inóculo y durante la operación de los reactores.

Otro estudio con resultados similares es el trabajo de [Heguan et al. \(2008\)](#) quienes utilizaron dos reactores continuos de tanque con agitación alcanzando una VVPH de 119 mL/L·h, con un porcentaje de producción del 45 % de hidrógeno a partir de un sustrato de agua de papas.

[Ginkel et al. \(2005\)](#) reportaron también valores de VVPH y % de producción similares a los de este estudio, ellos utilizaron pequeños reactores en forma de botellas alimentados con aguas residuales del procesamiento industrial de manzanas, generaron una eficiencia del 60 % de bio-hidrógeno, el valor de VVPH fue de 90 mL/L·h.

[Kyazze et al. \(2007\)](#) y [Fang y Liu \(2002\)](#) observaron máximos rendimientos de bio-hidrógeno cuando el pH del medio varió entre 5 y 6. [Ferchichi et al. \(2005\)](#) realizaron experimentos en lote para investigar el efecto del pH, experimentaron en un rango de 5 a 10 unidades acerca de la producción de bio-hidrógeno a partir de lactosuero, como inóculo utilizaron una cepa pura de *Clostridium saccharoperbutylacetonicum*. Los autores observaron la velocidad de producción volumétrica de bio-hidrógeno y el rendimiento molar de bio-hidrógeno más altos cuando el pH inicial fue 6 alcanzando valores de 9.4 mmol H₂ acumulativo y un rendimiento de 2.7 mol H₂/mol lactosa, es por eso que en esta prueba el pH inicial fue de 6.5. En esta prueba el rendimiento fue menor que en operación en continuo (2.3 y 1.6 mol H₂/mol de sacarosa obtenido en continuo y en lote), respecto a la composición del biogás, se han reportado porcentajes de producción de hidrógeno que van del 30 al 80% en reactores a nivel de laboratorio con flujo continuo o lote ([Chun et al., 2008](#); [Wan-Qian et al., 2008](#); [Yang et al., 2006](#)) y de 60 a 73% en reactores de volúmenes pequeños (hasta 750 mL) ([Fan et al., 2006](#); [Ginkel et al., 2005](#), [Shin et al., 2004](#)). En esta investigación el porcentaje de producción de bio-hidrógeno fue mayor en continuo (78 % en continuo y 54 % en lote), posiblemente se debe a que el crecimiento y desarrollo de la biopelícula del ánodo se encontraba en una fase de declive por parte de las bacterias productoras de hidrógeno afectado el rendimiento su producción.

4.7. Producción de electricidad de la CCM-H₂ operado en lote

Las Figuras 4.15, 4.16 y 4.17 muestran la producción de electricidad de la CCM-H₂ operado en lote. En la Figura 4.15 se muestra la generación de voltaje, el primer registro se realizó en tiempo 0 de operación, cuyo primer valor fue de 30 mV. El máximo voltaje fue de 313 mV con una densidad de potencia de 10 mW/m² y una potencia volumétrica de 1.4 W/m³, registrada a las 30 horas de operación. En términos de electricidad se pudieron observar diferentes fases en la generación de energía que asemejan el crecimiento microbiano, desde la fase exponencial de bacterias exoelectrógenas, causada por los procesos de enriquecimiento y formación de la biopelícula de bacterias ánodo-respiratorias sobre el fieltro de carbón (ánodo), hasta el decaimiento microbiano, estas fases se vieron reflejadas en la producción de voltaje. En las primeras 4 horas de operación del reactor se observó una fase de adaptación de los microorganismos donde la producción de voltaje no fue significativa. Después ocurrió una fase exponencial hasta la hora 51 de operación, donde se registró el máximo voltaje. Después ocurrió una fase de estabilización la que está comprendida entre las 80 y 190 h, después de ese tiempo se observó una fase de decaimiento hasta finalizar la operación de la celda. La fase de decaimiento de electricidad pudo deberse a una sobreproducción de biomasa adherida sobre las paredes de los electrodos afectando la transferencia de los reactantes y productos entre el electrolito y los electrodos, bioquímicamente las bacterias requieren energía para su crecimiento y desarrollo, por lo tanto, la biopelícula anódica toma parte de la energía disponible por el sustrato orgánico disminuyendo el voltaje en la celda, además de que el aporte de sustrato orgánico no es contante.

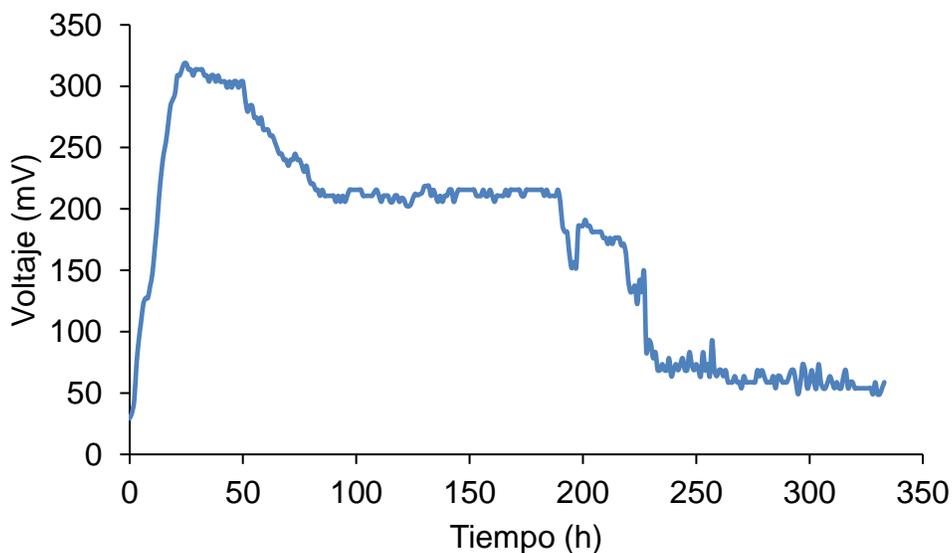


Figura 4.15. Producción de voltaje con la CCM-H₂ en lote

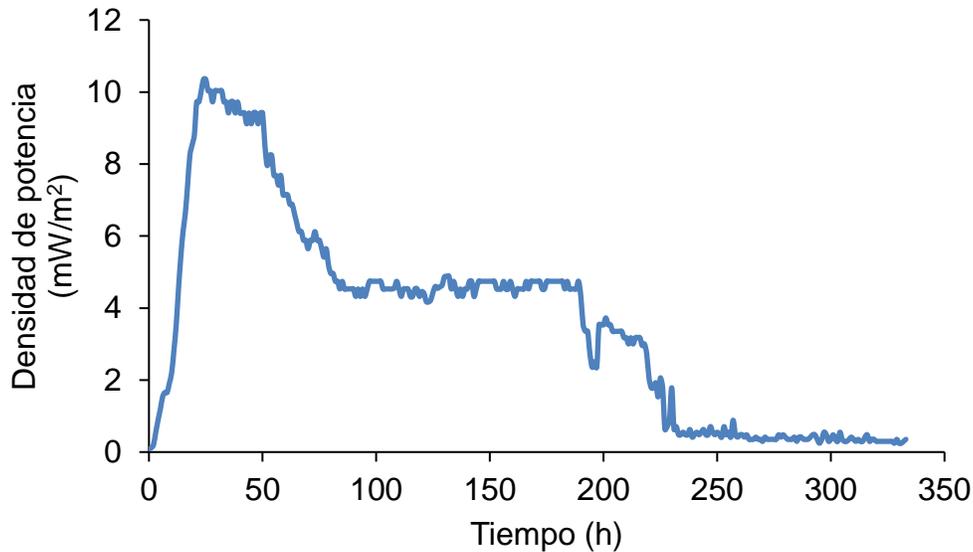


Figura 4.16. Producción de densidad de potencia con la CCM-H₂ en lote

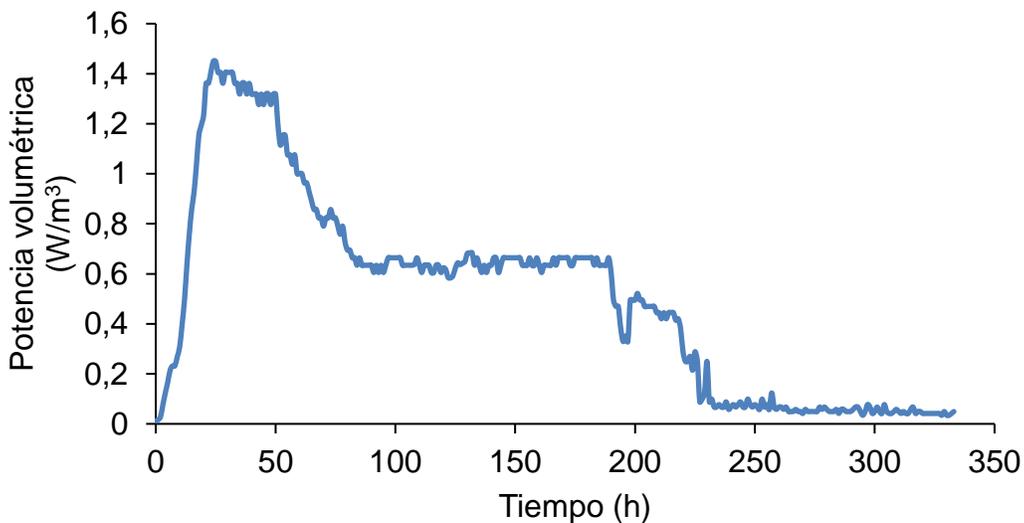


Figura 4.17. Producción de potencia volumétrica con la CCM-H₂ en lote

Los componentes de la celda como los electrodos, el agua de alimentación y la membrana de intercambio protónico pueden encontrarse saturados de biomasa lo que también limita la transferencia de electrones y como consecuencia decae el voltaje (Finkelstein et al., 2006; Aelterman et al., 2006; Viridis et al., 2009). Otro factor que repercute en el rendimiento es el limitado aporte de materia orgánica debido a que en alimentación en lote el sustrato orgánico no es constante. Existe una diferencia en la generación de electricidad en alimentación en continuo y en lote. En este trabajo se obtuvieron mejores resultados en continuo, el movimiento

del agua de la circulación promueve un mayor contacto del sustrato con los microorganismos, lo que genera una mayor transferencia de masa y una mejor distribución hacia las bacterias. Al degradarse una mayor cantidad de materia orgánica de forma continua el voltaje no decae rápidamente, mientras que en lote el agua de alimentación se encuentra en un estado estático, por lo que el sustrato no se distribuye uniformemente.

Los resultados de [Ahn y Logan \(2013\)](#) muestran un comportamiento similar en la producción de voltaje y las fases de decaimiento, ellos operaron una CCM de una cámara en lote, como electrodos utilizaron fibras de carbón con cátodo aireado conectados a una resistencia de 1000 Ω , alimentaron la celda con agua residual municipal. Alcanzaron un máximo voltaje de 422 mV, durante los primeros dos días de operación el voltaje se mantuvo en incremento, posteriormente el voltaje disminuyó en el tercer día hasta llegar a un comportamiento constante. Otro estudio similar está reportado por [Wu et al. \(2014\)](#) quienes alcanzaron un voltaje máximo de 420 mV y una densidad de potencia de 45 mW/m³. [Sun et al. \(2012\)](#) generaron un voltaje máximo de 242 mV y una densidad de potencia de 24 mW/m², en ambos casos utilizaron celdas de una sola cámara con membranas de intercambio protónico de Nafion.

Para estudiar la producción de voltaje también se utilizó el modelo matemático ajustado de Gompertz. Esta ecuación únicamente tiene en cuenta el crecimiento, en este caso el crecimiento de electricidad, sin considerar el consumo de sustrato de los microorganismos electroactivos, por lo que se puede utilizar este modelo para describir la evolución del voltaje durante la corrida de la CCM-H₂ mediante la ecuación 4.3.

$$E = E_{\max} \cdot \exp \left\{ -\exp \left[\frac{R \cdot e}{E_{\max}} (\lambda - t) + 1 \right] \right\} \quad (\text{EC. 4.3})$$

Donde, E (mV) es el voltaje y E_{max} (mV) es el voltaje alcanzable y R es la velocidad máxima de crecimiento específico (mV/h).

El modelo matemático de Gompertz predijo de una forma adecuada la producción de voltaje a lo largo de la corrida operada en lote, siendo el coeficiente de correlación de 0.95. De acuerdo con dicho modelo el voltaje máximo (E_{max}) que se podía obtener en la CCM-H₂ era de 314 mV, aunque experimentalmente el valor fue ligeramente menor con una diferencia mínima. El resultado de la velocidad máxima de crecimiento de voltaje fue de 18.3 mV/h. Por último, cabe destacar que según el modelo el tiempo de latencia, es decir el tiempo en el que los microorganismos exoelectrógenos comienzan a producir electricidad fue de 0.1 h,

aunque realmente la producción de electricidad fue instantánea pero muy baja. Se realizó el mismo procedimiento para calcular la producción de densidad de potencia, donde se registró un valor de 9.8 mW/m². En las Figuras 4.18 y 4.19 se muestra producción de electricidad evaluada con el modelo ajustado de Gompertz.

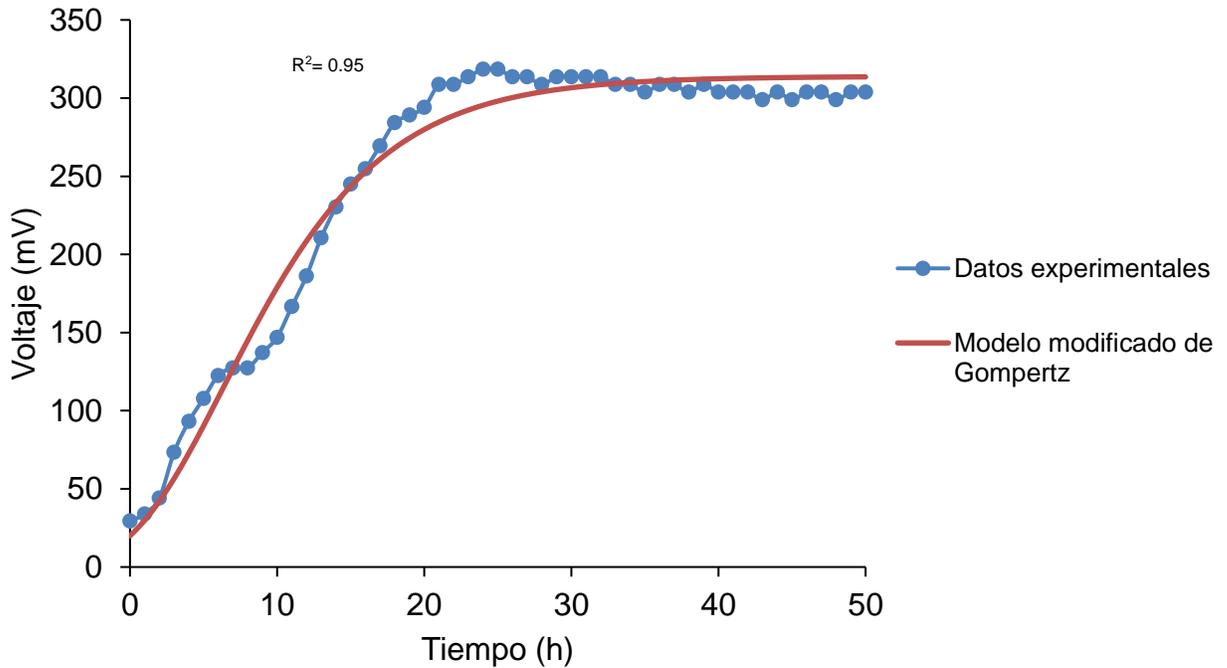


Figura 4.18. Producción de voltaje con el modelo de Gompertz

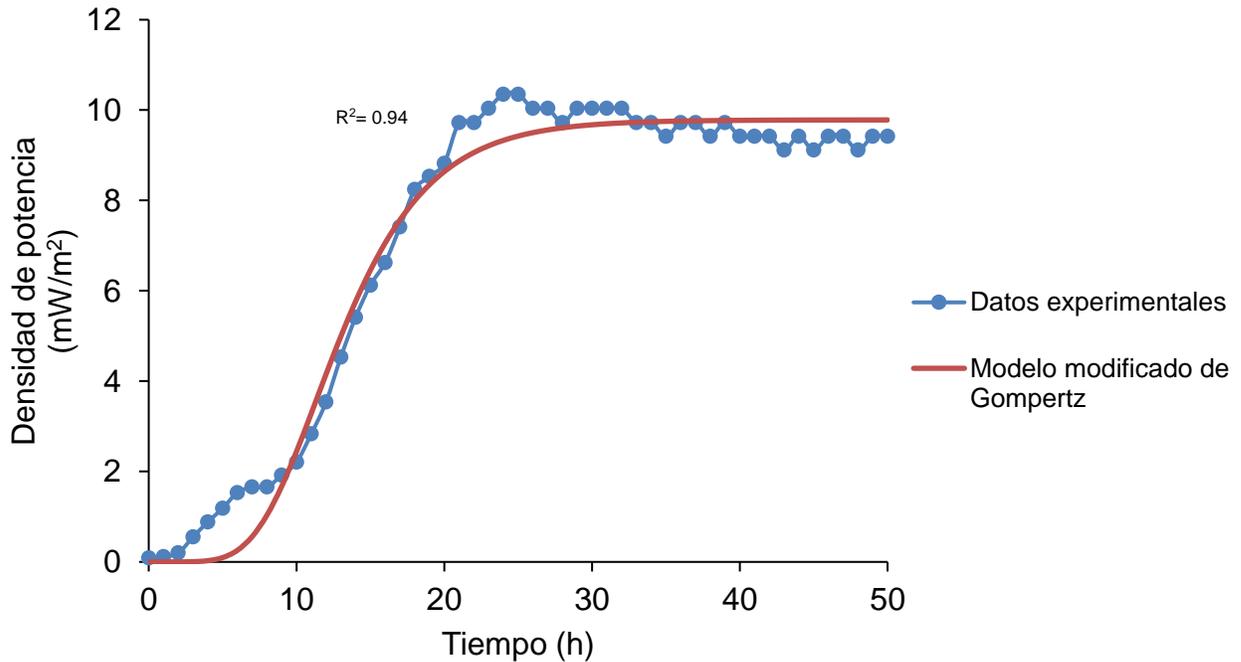


Figura 4.19. Producción de densidad de potencia con el modelo de Gompertz

Villarrubia (2015) también utilizó el modelo ajustado de Gompertz para estimar la acumulación de voltaje. En su estudio utilizó una microcelda (microMFC) alimentada con agua residual, como electrodos utilizó placas cuadradas de grafito, el electrodo catódico contenía una capa catalítica de 0.5 mg Pt/cm² depositada sobre una capa microporosa, ambos electrodos se encontraban separados por una membrana de intercambio protónico *Sterion*. El volumen de la microcelda fue de 1 cm³. Como inóculo utilizaron un cultivo mixto de microorganismos procedente de un reactor biológico de una PTAR. El máximo voltaje que registraron fue de 32 mV con una densidad de potencia de 42 mW/m². El tiempo de corrida donde mostraron los resultados con el modelo Gompertz fue de 10 d, donde registraron una producción de 7.1 mV. Este ejemplo fue el único encontrado donde se puede comparar la producción de voltaje por este modelo, por lo que es recomendable estimar la cantidad de electricidad a través de modelos matemáticos de tipo predictivo en celdas de combustible microbianas.

4.8. Producción total de electricidad en el sistema híbrido CCM-H₂-CCH

En la Tabla 4.5 se muestra la producción total del sistema híbrido, que es la suma del voltaje producido por la CCM-H₂ y la CCH. El máximo voltaje fue de 1130 mV obtenido cuando la operación del sistema fue de 8 d, y con los TRH de 4 y 1 d, el sistema generó 605 y 481 mV respectivamente. Diversas investigaciones se han realizado hasta la fecha probando las tres tecnologías mencionadas con anterioridad (fermentación oscura, celdas de combustible microbiana y celdas de electrólisis microbiana) de manera individual y algunas como sistemas acoplados, observándose que al ensamblar los sistemas puede mejorarse la eficiencia en cuanto a la producción de hidrógeno. En este estudio se añadió la tecnología de CCH, con el fin de aprovechar el hidrógeno para la producción de electricidad como otra fuente de producción de energía a parte de la CCM-H₂. Al sistema CCM-H₂-CCH se puede acoplar un sistema MEC, ya que ambos trabajan con la digestión anaerobia, pudiendo generar mayores cantidades de hidrógeno a los que se pueden alcanzar utilizando cada uno de estos sistemas por separado. Además, se comprobó que al utilizar una CCM es posible adicionar parámetros de operación que favorece la producción de bio-hidrógeno dentro de la misma. En general se recomienda realizar estudios utilizando un CCM de un sola cámara y variando los parámetros operacionales tales como la temperatura, TRH, acidez del medio y fuentes de inóculo y alimentada con agua residual real, donde se permita desarrollar un consorcio bacteriano adecuado para maximizar las tasas de rendimiento y producción de hidrógeno sin dejar a un lado la electricidad. En cuanto al sistema CCH se recomienda utilizar diferentes resistencias externas que permitan conocer el rendimiento en cuanto a densidades de potencia y de

corriente. Otro importante y posible punto de este estudio, será la búsqueda de un tratamiento que evite el crecimiento de bacterias metanogénicas desde el momento de realizar la inoculación de los ánodos y que permitan una selección más rigurosa en la selección y formación de una biopelícula con bacterias específicas productoras de hidrógeno. Por lo es muy recomendable seguir realizando investigaciones usando este tipo de sistemas acoplados.

Tabla 4.5. Producción total de electricidad del sistema híbrido

Tipo de celda	Voltaje con TRH de 8 d (mV)	Voltaje con TRH de 4 d (mV)	Voltaje con TRH de 1 d (mV)
CCM-H ₂	671	323	284
CCH	459	282	197
Total	1130	605	481

4.9. Comportamiento de pH, potencial redox y remoción de DQO operado en continuo

4.9.1. pH

Los valores de pH en el influente con ambos tipos de agua comprende un rango de 4.3-6.1 unidades y el pH en el agua sintética en el efluente comprende un rango de 5.6-6.6. Existen varios trabajos relativos al estudio del rango óptimo de pH que han proporcionado diferentes resultados. Generalmente el rango es de 5-6.5 unidades, tanto en operación en continuo y en lote, es por eso que el pH es un factor crítico en la producción de hidrógeno (Redondas, 2013).

4.9.2. Potencial Redox

La producción de bio-hidrógeno a partir de sustratos orgánicos es limitada por la termodinámica de la reacción de las *hidrogenasas*, la cual implica la transferencia de electrones desde una molécula intracelular portadora de electrones hacia los protones. Los protones son pobres aceptores de electrones (potencial de óxido reducción (POR) del H₂ = - 14 mV), por lo que el donante del electrón debe ser un fuerte agente reductor. En el agua residual municipal presentó un valor de 71.6 ±115.1 mV en el efluente, mientras que en cada uno de los efluentes de cada fase de operación dicho potencial se ve disminuido, esto debido al consumo de oxígeno de microorganismos obtenido del aire atmosférico en los electrodos catódicos para realizar sus funciones de alimentación, crecimiento y reproducción. El valor de los

efluentes en la fase de inoculación fue de -13.7 ± 94.9 y se observó una mayor disminución en las fases de operación de la variación de los tiempos de retención (8,4 y 1 d) los valores del potencial redox prevalecieron en condiciones anoxias-anaerobias con valores de -60.6 ± 16.8 , -22.7 ± 28.5 , -51.5 ± 17.6 , en todos los casos de los resultados del efluente del potencial redox descienden por debajo de 0 mV, puede atribuirse a que las condiciones en las que se encuentra la cámara de la celda cambiaron su estado oxidativo al reductor donde la materia orgánica es reducida (Zarate, 2006) donde generalmente los aceptores finales de electrones son los nitratos, sulfatos y CO_2 a diferencia de las condiciones aerobias donde el aceptor final de electrones es el oxígeno (Estrada, 2006).

4.9.3. DQO

La cantidad de bio-hidrógeno producido por mol de sustrato en la práctica es alrededor de 2-3 moles de hidrógeno por mol de sustrato (Hallenbeck y Benemann, 2002). El rendimiento que puede alcanzarse en el proceso de producción de bio-hidrógeno por digestión anaerobia es solamente el 33% de la demanda química de oxígeno (DQO) contenida en los residuos orgánicos (considerando la glucosa como sustrato) puede ser transformada en bio-hidrógeno (considerando que cada mol de sustrato es fermentada a dos moles de acetato, dos moles de dióxido de carbono y cuatro moles de hidrógeno) (Kalogo y Bagley, 2008). El resto es transformada principalmente en ácidos grasos volátiles (AGV – ácido acético y ácido butírico-) (Bartacek et al., 2007). Generalmente, la demanda química de oxígeno (DQO) transformada en hidrógeno está por debajo del 20% que corresponde a una media de 2.5 mol hidrógeno/mol de sustrato.

En este estudio el rendimiento máximo fue de 2.4 ± 0.1 mol H_2 /mol sacarosa. Por lo que se pudo observar que la producción de bio-hidrógeno se ve influenciada por las mayores remociones de DQO, fue notorio que el bio-hidrógeno incrementó a mayor consumo de sustrato orgánico (degradación de DQO). La disminución que se observa en la Figura 4.20 en el TRH de 8 d fue en el momento en que se produjo la máxima cantidad de bio-hidrógeno ($\text{L H}_2/\text{L}\cdot\text{d}$) y el máximo rendimiento ($\text{mol H}_2/\text{mol sacarosa}$). Durante la operación con los TRH de 4 y 1 d las concentraciones en el efluente no tuvieron grandes diferencias. La máxima remoción de DQO fue de 79.4 ± 8.0 % cuando se operó con agua residual municipal con una DQO de ~ 300 mg/L y un TRH de 8 d (etapa de operación 1). Operando con agua sintética con una DQO de 1000 mg/L (etapa de operación 2), la máxima remoción fue de 56.1 ± 6.7 % aplicando un TRH de 4 d.

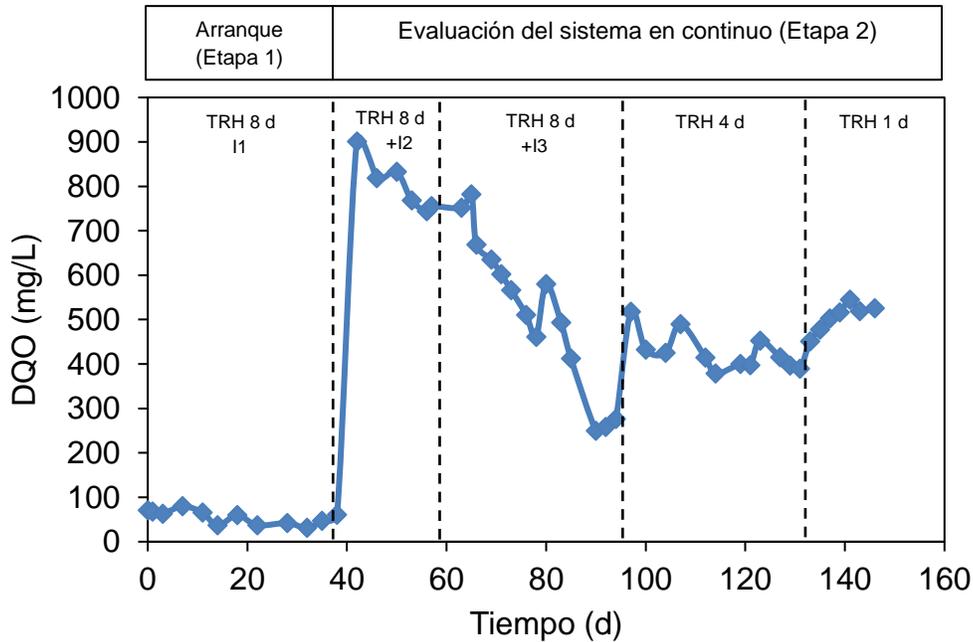


Figura 4.20. Resultados de la DQO en el efluente de cada fase

4.10. Análisis microbiológico

Se tomó una muestra de la biopelícula formada en la superficie del ánodo del reactor para observar la morfología de las colonias bacterianas para el análisis de ADN genómico. Para ello se sembró una pequeña muestra de lodo (biopelícula) en medio de cultivo NBY, el cual permite el crecimiento de un amplio género de especies bacterianas. Una vez crecidas las colonias bacterianas en una caja Petri (caja madre), se identificaron las colonias de bacterias por morfología, tipo de crecimiento y pigmentación y fueron resembradas en el mismo medio para hacer crecer las bacterias de forma pura.

En la Figura 4.21 se puede observar el plaqueado del aislamiento de algunas de las colonias bacterianas por método de dilución para la obtención de colonias perfectamente aisladas, en los aislamientos la forma de crecimiento se observó en colonias dispersas y en Swarming. El proceso de aislamiento y purificación se realizó dos veces, la primera muestra fue tomada a partir de la mezcla de lodos anaerobios pretratados en donde las bacterias purificadas fueron inoculadas y la segunda muestra fue tomada al término de la operación del reactor de la superficie del ánodo.

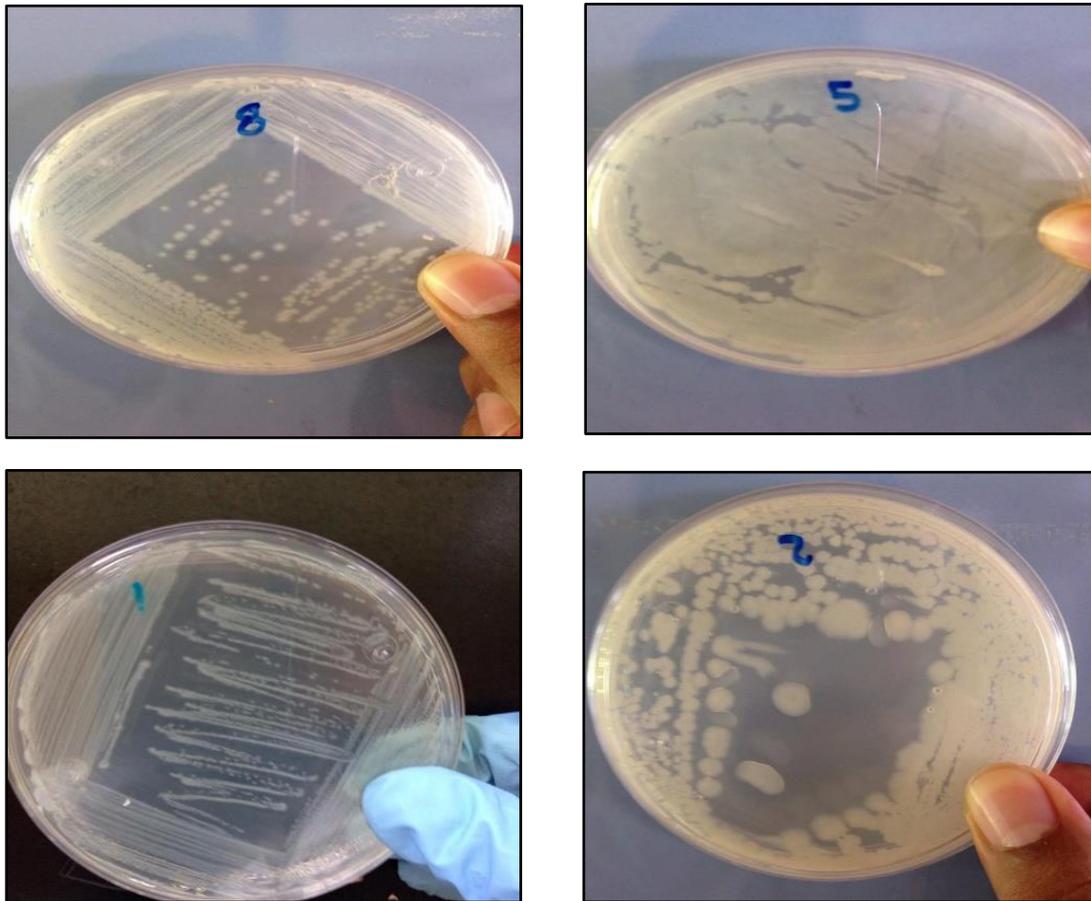


Figura 4.21. Aislamiento de bacterias tomadas del ánodo

Tanto las bacterias puras como en consorcios microbianos mixtos pueden generar electricidad, sin embargo, la descripción de la microbiología de una biopelícula y sus implicaciones de la ecología microbiana sobre el funcionamiento han sido poco estudiados (Lovley, 2008; Bretschger et al., 2010). Conocer los procesos de colonización, invasión y sucesión de las poblaciones microbianas puras y mixtas que producen electricidad permitirá explorar nuevos métodos para la producción de electricidad (Logan y Regan, 2006). En este estudio a través de la técnica de tinción de esporas (Wirtz-Conklin) se observaron bacterias Gram positivas esporuladas. En este trabajo se aislaron 9 bacterias en la primera toma de muestra, dentro de la identificación morfológica con la tinción de Gram y la de Wirtz-Conklin se observaron bacterias bacilos Gram positivas de tamaño corto, mediano y largo, algunas bacterias presenciaron esporas en los extremos de cada bacteria, otras contenían la espора en el centro, algunas esporas se observaron con mayor intensidad en el teñido.

En la segunda toma de muestra se aislaron 6 tipos de bacterias, en este inóculo se observaron bacterias tanto Gram positivas como negativas en forma de cocos y bacilos de tamaño corto y mediano, no todas las bacterias presentaron esporas, la tinción de esporas fue con menor intensidad en comparación con las bacterias provenientes de la muestra 2. Se ha reportado que muchas de las bacterias productoras de bio-hidrógeno tienen la capacidad de formar esporas cuando son sometidas a procesos de estrés (pretratamiento térmico-ácido), generalmente las bacterias esporuladoras pertenecen al género de *Clostridium*, *Citrobacter* y *Bacillus*. En la Figura 4.22 se muestra la morfología de algunas bacterias con forma de bacilos Gram positivos de longitud corta y mediana. En la Figura 4.23 se pueden observar las esporas en los extremos de las bacterias y en el centro. Una vez que se observó la morfología de las bacterias por la tinción de Gram y Wirtz Conklin, se realizó la extracción de ADN genómico y se amplificó el gen 16S por PCR.

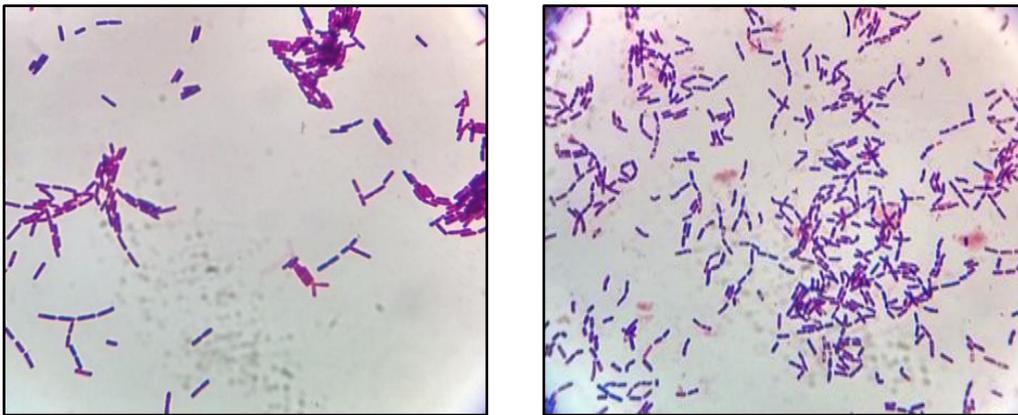


Figura 4.22. Bacilos Gram positivos. Técnica tinción de Gram
Resolución de imagen: 100x

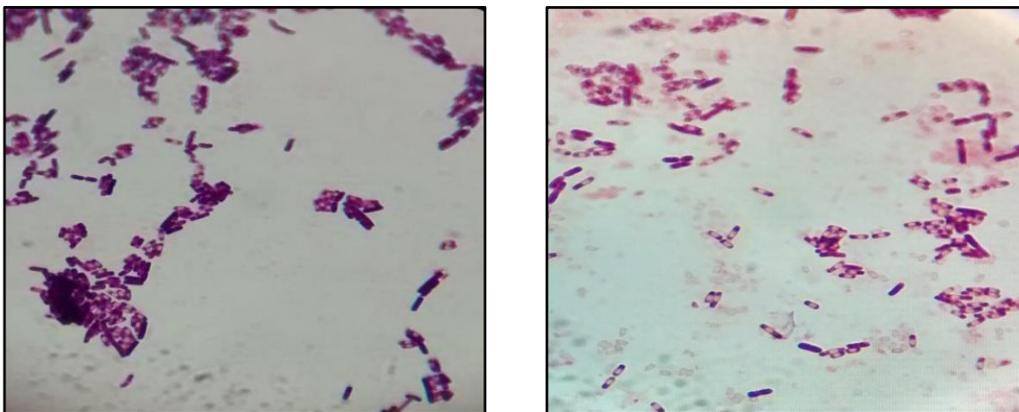


Figura 4.23. Bacterias en estado de esporulación. Técnica tinción Wirtz Conklin
Resolución de imagen: 100x

Actualmente se está explorando la eficacia de microorganismos que actúan sobre el ánodo. Los microorganismos en las CCM juegan un papel importante en la transferencia de electrones, un proceso que ocurre en la célula misma, de la célula hacia el electrodo; por lo tanto, estudiar sus interacciones, identificarlos y establecer su función en este proceso, aporta al conocimiento básico y al futuro mejoramiento del desempeño de estos sistemas. Además explorar consorcios eficaces para las funciones de generación de electricidad, remoción de materia orgánica, biorremediación y producción de bio-hidrógeno, a partir de muestras sometidas a diferentes condiciones se puede permitir el desarrollo de novedosos bioánodos y/o biocátodos.

La comunidad microbiana presente en el reactor fue analizada por la técnica de PCR a partir de dos muestras. Los patrones de bandas obtenidos por la técnica de electroforesis en gel de agarosa se muestran en la Figura 4.24, en la primera columna se encuentra el marcador de peso molecular (MPM), posteriormente las bandas enumeradas del 1-15 corresponden a las bacterias, en algunos casos las columnas se encuentran vacías lo que indica que el proceso de amplificación del gen 16S por PCR no se llevó a cabo.

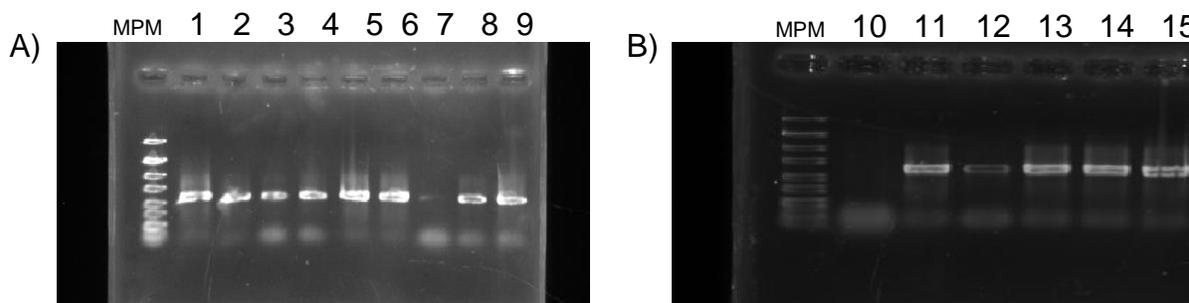


Figura 4.24. Perfiles de bandas obtenidos por PCR.
A) Perfil de bandas de muestra 1. B) Perfil de bandas de muestra 2

En la Tabla 4.6 se muestran los resultados obtenidos del análisis de las secuencias en la base de datos de ADN microbiano GenBank del NCBI (National Center for Biotechnology Information) mediante el programa NucleotideBLASTsearch. En la tabla el número de banda del 1-9 se refiere a la muestra 1 (secuencias de bacterias extraídas de la mezcla de lodos anaerobios pretratados) y las bandas 10-15 es la segunda muestra (secuencias de bacterias extraídas de la biopelícula del ánodo). La alineación utilizando el BLAST de nucleótidos muestra similitudes altas (99-100%) a una amplia gama de especies representativas o subespecies perteneciente a los géneros de la siguiente Tabla (4.6).

Tabla 4.6. Resultados de la secuenciación correspondiente a las bandas obtenidas de la amplificación por PCR

N° de banda	Correspondencia	Similitud (%)	Morfología
1	<i>Citrobacter freundii</i>	100	Bacilos Gram negativos
2	<i>Bacillus thuringiensis</i>	100	Bacilos Gram positivos
3	<i>Providencia sp.</i>	99	Bacilos Gram positivos con esporas en los extremos de la bacteria
4	<i>Bacillus mycoides</i>	99	Bacilos Gram positivos con espora en el centro de la bacteria
5	<i>Bacillus mycoides</i>	100	Bacilos Gram positivos con espora en el centro de la bacteria
6	<i>Bacillus mycoides</i>	100	Bacilos Gram positivos con espora en el centro de la bacteria
7	Sin identificar	---	Cocos Gram negativos
8	<i>Enterococcus faecalis</i>	99	Cocos Gram positivos
9	<i>Lysinibacillus sp.</i>	99	Bacilos Gram positivos
10	Sin identificar	---	Cocos Gram positivos
11	<i>Chryseobacterium gleum</i>	99	Bacilos Gram negativos
12	<i>Enterococcus faecalis</i>	99	Cocos Gram positivos
13	<i>Azotobacter sp.</i>	100	Bacilos Gram negativos con espora en el centro de la bacteria
14	<i>Bacillus mycoides</i>	100	Bacilos Gram positivos con espora en el centro de la bacteria
15	<i>Citrobacter freundii</i>	100	Cocos Gram negativos

El patrón de bandas obtenido en cada muestra tuvo poca diferencia en la comunidad microbiana establecida en el ánodo como era de esperarse. Así, el número de bandas detectado en la muestra 1 fue mayor que el detectado en la muestra 2. [Shin et al., 2004](#) sugieren que la diversidad de especies cambia a lo largo del tiempo de experimentación. Los números de banda 7 y 10 corresponde a bacterias que no fueron identificadas, probablemente se debe a que la cantidad de ADN genómico no fue suficiente para obtener un amplicon del gen 16S por un PCR convencional.

Los análisis de diversidad microbiana utilizando los genes de ARNr 16S indicaron la presencia de especies procariontas pertenecientes a los géneros *Bacillus*, *Citrobacter*, *Enterococcus*, *Lysinibacillus*, *Chryseobacterium*, *Azotobacter* y *Providencia*. En la Figura 4.25 se muestra el árbol filogenético basado en la secuencia para 8 especies, éstas fueron identificadas en el reactor, la historia evolutiva fue inferida mediante el método Neiborg Joining. Se presenta el árbol óptimo en forma de cladograma con los respectivos valores *Bootstrap* (100 réplicas) entre las ramificaciones.

Para este análisis se utilizó el programa CLC Sequence versión Viewer 7.8.1. Las bacterias que se observan en la Figura 4.25 estaban contenidas en la biopelícula del ánodo y contenidas en la mezcla de lodos anaerobios, estos microorganismos muy probablemente contribuyen a la transferencia de electrones catódicos e incluso en la producción de bio-hidrógeno.

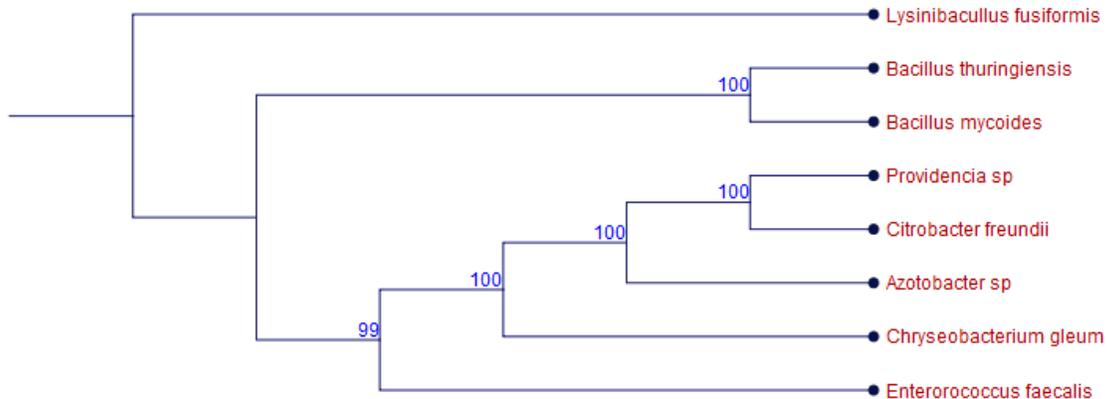


Figura 4.25. Relación filogenética del consorcio bacteriano identificado en la CCM-H₂

El mecanismo que implica la transferencia de electrones por bacterias desde el cátodo al oxígeno en CCM todavía está abierto a la discusión por lo que es difícil llegar a concluir qué las bacterias son electroactivas de forma específica (Powell et al, 2009; Rosenbaum et al., 2010), los resultados de este estudio muestran que las bacterias mencionadas en la Tabla 4.5 podrían ser electroactivas y productoras de bio-hidrógeno. En total se identificaron 11 bacterias de las cuales: *Citrobacter freundii*, *Bacillus thuringiensis*, *Providencia sp*, *Bacillus mycooides*, *Enterococcus faecalis* y *Lysinibacillus fusiformis* corresponden al primer muestreo (bacterias contenidas en la mezcla de lodos), después de inocular estas bacterias de forma pura la producción de electricidad y bio-hidrógeno aumentó como se observó en la Figura 4.9. Las bacterias *Chryseobacterium gleum*, *Azotobacter sp*, *Enterococcus faecalis*, *Bacillus mycooides* y *Citrobacter freundii* corresponden a la segunda muestra (biopelícula soportada en el ánodo). Existe un 50 % especies de bacterias que estuvieron presentes en ambos muestreos. Los análisis filogenéticos bacterianos dominantes hasta el nivel del género podrían revelar más información sobre la composición del consorcio.

Se ha comprobado actividad electrogénica en bacterias como *Rhodobacter ferriducens*, *Aeromonas hydrophyla*, *Clostridium butyricum*, *Enterococcus gallinarum*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* y *Geobacter sulfurreducens* etc.

(Nuñez, 2008). Por otra parte entre las bacterias productoras de bio-hidrógeno se encuentran *Clostridium* (*butyricum*, *pasteurianum*, *thermocellum*, *dificile*, *thermolacticum* etc.) *Escheriquia coli*, *Enterobacter aerogenes* y *Rodhobacter*, también bacterias del género *Citrobacter*, *Enterococcus* y *Bacillus* (Bastidas-Oyanedel, Mette y Ejbye, 2015; Bedoya et al., 2008). Por lo tanto bacterias del género que se encontraron en este estudio podrían considerarse productoras de electricidad y de bio-hidrógeno.

De acuerdo con Nuñez (2008) las bacterias identificadas en este estudio tales como: *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus mycooides*, *Enterococcus faecalis* y *Lysinibacillus fusiformis* han sido reportadas como productoras de electricidad. Por otra parte de acuerdo con Bastidas-Oyanedel et al. (2015) y Bedoya et al. (2008) las bacterias *Citrobacter freundii*, *Enterococcus faecalis*, *Bacillus thuringiensis* y *Bacillus mycooides* son productoras de bio-hidrógeno. Respecto a *Chryseobacterium gleum*, *Azotobacter sp* y *Providencia sp* no se ha reportado que sean bacterias productoras de electricidad o de bio-hidrógeno.

Los microorganismos exoelectrógenos en las CCM juegan un papel importante en la transferencia de electrones, un proceso que ocurre en la célula misma, de la célula hacia el electrodo y del electrodo a la célula; por lo tanto, estudiar sus interacciones, identificarlos y establecer su función en este proceso, aporta al conocimiento básico y al futuro mejoramiento del desempeño de estos sistemas. Además explorar consorcios eficaces para las funciones de generación de electricidad, remoción de materia orgánica y biorremediación, a partir de muestras ambientales sometidas a diferentes condiciones, puede permitir el desarrollo de novedosos bioánodos y/o biocátodos. A nivel práctico es mejor emplear cultivos mixtos porque generan altos potenciales y su manejo es más económico y menos exigente, por lo que se utilizan lodos anaeróbicos y otras fuentes de comunidades microbianas (Du et al., 2007). Estos estudios indican que la producción de bio-hidrógeno en los sistemas por digestión anaerobia es debida a bacterias anaerobias obligadas pertenecientes a los géneros mencionados anteriormente pueden obtener energía tanto por respiración (en presencia de oxígeno) como por fermentación (en ausencia de oxígeno) produciendo en este último caso bio-hidrógeno (Hawkes et al., 2002).

Parecería razonable concluir que el sistema de CCM productor de bio-hidrógeno utilizado aquí podría ser eficiente en la producción de electricidad y bio-hidrógeno a partir de las bacterias encontradas en el interior del reactor, aunque siguen existiendo preocupaciones con respecto al posible crecimiento de competidores como las bacterias metanogénicas y por las bacterias que no pudieron ser identificadas.

CAPÍTULO 5. CONCLUSIONES

El sistema híbrido de CCM-H₂ logró la producción simultánea de electricidad y bio-hidrógeno, donde este último fue utilizado como combustible para una CCH acoplada para la producción de electricidad.

Como primer objetivo se evaluaron los perfiles de electricidad en ambas celdas. Cuando la CCM-H₂ operó en continuo con un TRH de 8 d, una temperatura de 32°C y pH de 6.5 se produjo un voltaje máximo de 671 mV, una densidad de potencia de 46 mW/m² y una potencia volumétrica de 6.4 W/m³. El reactor CCM-H₂ operado en lote produjo un máximo voltaje de 313 mV, una densidad de potencia de 10 mW/m² y una potencia volumétrica de 1.4 W/m³. En cuanto a la CCH, el voltaje más alto registrado fue de 459 mV, el cual fue producido con el bio-hidrógeno generado en la CCM-H₂. El voltaje máximo generado por el sistema híbrido CCM-H₂-CCH fue de 1130 mV operado con un TRH de 8 d.

Se produjo mayor electricidad con la CCM-H₂ que con la CCH con una diferencia del 31 %, además de que el tiempo de agotamiento de voltaje fue de 39 min, mientras que en la CCM-H₂ la producción de electricidad se mantuvo constante.

Se demostró que las condiciones de temperatura, TRH y pH son favorables para la producción de bio-hidrógeno y electricidad. Los mejores resultados se registraron cuando la CCM-H₂ fue operada en continuo con un TRH de 8 d. La máxima cantidad de bio-hidrógeno producido fue de 5 L H₂/L·d, a lo que corresponde un 78 % del biogás total. La CCM-H₂ operada en lote alcanzó una máxima velocidad volumétrica de producción de bio-hidrógeno de 90 mL/L·h. Se observó una diferencia notoria en la producción de bio-hidrógeno operado en continuo, los resultados muestran una mayor cantidad de bio-hidrógeno generada en continuo (78 %) que en lote (54 %), lo que sugiere que es necesario mantener el control de las condiciones para la inhibición de bacterias metanogénicas y así evitar en lo posible la disminución de bio-hidrógeno.

Al realizar el análisis microbiológico de la biopelícula adherida al ánodo de la celda, se comprobó que diferentes consorcios bacterianos pueden producir electricidad y bio-hidrógeno, dependiendo de las condiciones de operación, donde se demostró que el control de pH juega un papel determinante en el desarrollo de la microbiota independientemente de los parámetros operacionales utilizados. La composición y la diversidad de los consorcios microbianos pueden influir significativamente en las tasas de rendimiento de producción de bio-hidrógeno, por lo que es importante mantener la inhibición de los metanógenos.

Los análisis de diversidad microbiana dirigidos a los genes ARNr 16S indicaron la presencia de especies procariontas pertenecientes a los géneros *Bacillus*, *Citrobacter*, *Enterococcus*, *Lysinibacillus*, *Chryseobacterium*, *Azotobacter* y *Providencia sp*, las cuales contribuyeron a la producción de electricidad y bio-hidrógeno.

De acuerdo con los resultados de la cinética de producción de bio-hidrógeno operado en lote con el modelo modificado de Gompertz, se estimó una acumulación de bio-hidrógeno de 1527 mL y 3.23 mmol. Respecto a la electricidad se estimó una acumulación de 59 V con una densidad de potencia de 1.2 W/m².

El análisis estadístico realizado demostró que un alto tiempo de retención hidráulico de 8 días tiene un efecto significativo en el funcionamiento de la CCH-H₂ acerca de la producción de voltaje y bio-hidrógeno, dadas las condiciones de operación utilizadas en el sistema.

Se encontró que el sistema híbrido al utilizar inóculos puros y mixtos de forma conjunta beneficio el incremento simultáneo de electricidad y bio-hidrógeno de forma inmediata.

CAPÍTULO 6. PERSPECTIVAS Y RECOMENDACIONES

Dentro de las áreas de oportunidad de estudio en las CCM son:

- La investigación de materiales en forma de electrodos en el diseño reactores electroquímicos para incrementar la generación de electricidad ya que no se han reportado los materiales óptimos dentro del diseño de una CCM para la operación.
- Aislar bacterias electroactivas para poder inocularlas en las celdas a fin de incrementar la producción de electricidad y bio-hidrógeno. En los consorcios productores de energía y de bio-hidrógeno las bacterias más comunes pertenecen a los generos *Shewanella*, *Geobacter*, *Proteobacter*, *Pseudomonas*, *Clostridium*, *Citrobacter* y *Enterococcus* etc., por lo que es necesario investigar la capacidad de transferencia de electrones y la producción de bio-hidrógeno producido por la oxidación del sustrato orgánico por parte de estas bacterias.
- Es necesario investigar utilizando mutagénesis e incluso tecnologías de ADN recombinante para crear algunas cepas de microorganismos que cumplan con todas las funciones requeridas de manera óptima para el desarrollo de bioelectricidad o para incrementar la velocidad de transferencia de electrones, o cepas especializadas en la producción de bio-hidrógeno.

Con los resultados de este estudio se sugiere operar la celda de combustible microbiana productora de bio-hidrógeno bajo condiciones necesarias para la producción de bio-hidrógeno sin olvidar las condiciones necesarias de las bacterias electroactivas, quedando pendiente realizar más investigación respecto a los muchos diferentes tipos de inóculos que existen.

El seguimiento a la comunidad microbiana y el crecimiento selectivo de organismos productores de bio-hidrógeno podrían mejorar los resultados obtenidos en esta investigación, en tal sentido, se sugiere que futuras investigaciones estén orientadas al estudio y características de la comunidad microbianas presentes en el reactor con técnicas más especializadas como las de pirosecuenciación. También se recomienda escalar la celda de combustible microbiana productora de bio-hidrógeno y evaluar el reactor con otro tipo de inóculo.

CAPÍTULO 7. ANEXO

7.1. Análisis estadístico

Con el objetivo de identificar si hubo una diferencia significativa entre los voltajes producidos en la CCM-H₂, la producción de bio-hidrógeno en la CCM-H₂ y la producción de voltaje en la CCH, se realizó un análisis de varianza. Se realizó un análisis de varianza de un factor considerando un nivel de significancia de 0.05. Tomando en cuenta que todas las pruebas se realizaron bajo las mismas condiciones y que la única condición diferente entre ellas fue el tiempo de retención hidráulico. En las Tablas 7.1, 7.2 y 7.3 se muestran los resultados obtenidos del análisis de estadístico de cada tratamiento.

Tabla 7.1. ANOVA de producción de voltaje en la CCM-H₂

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrados medios	Razón Fc
Tratamientos	8666555	1	835.74	16.66
Error	345636	2	16.66	
Total de la correlación	902187	3		

Valor calculado de Fc: 16.66

Ft Valor de Tablas $\alpha=0.05$ 7.7

Fc>Ft Si hay diferencias significativas

Tabla 7.2. ANOVA de producción de bio-hidrógeno en la CCM-H₂

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrados medios	Razón Fc
Tratamientos	289.85	1	289.85	10.05
Error	5.9	2	2.89	
Total de la correlación	7.13	3		

Valor calculado de Fc: 10.05

Ft Valor de Tablas $\alpha=0.05$ 7.7

Fc>Ft Si hay diferencias significativas

Tabla 7.3. ANOVA de producción de voltaje en la CCH

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrados medios	Razón Fc
Tratamientos	2814104	1	3814104	155
Error	328846	2	164423	
Total de la correlación	28481	3		

Valor
calculado
de Fc:
155

Ft
Valor de
Tablas
 $\alpha=0.05$
7.7

**Fc>Ft Si hay diferencias
significativas**

En las Figuras 7.1, 7.2 y 7.3 se muestra el análisis de la prueba de Tukey, donde se observa la diferencia entre los resultados de los tratamientos (TRH). Donde considera que $ab \neq a$ y $a \neq b \neq c$.

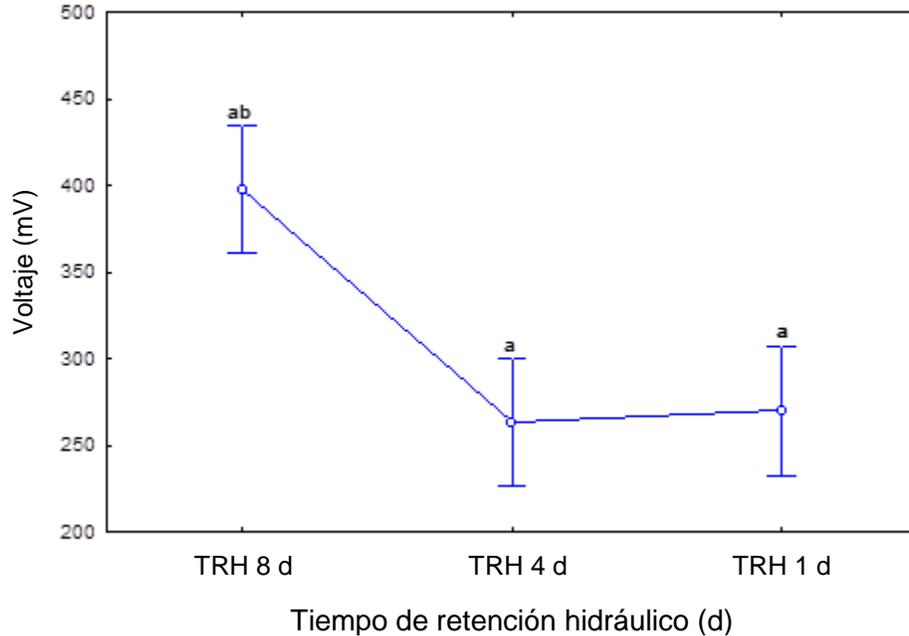


Figura 7.1. Prueba de Tukey de producción de voltaje en la CCM-H₂

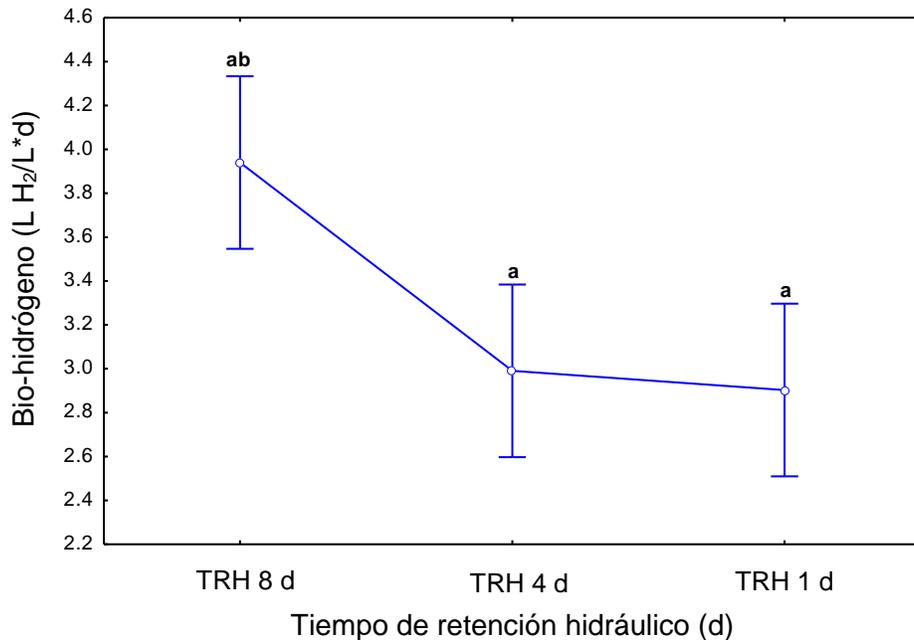


Figura 7.2. Prueba de Tukey de producción de bio-hidrógeno en la CCM-H₂

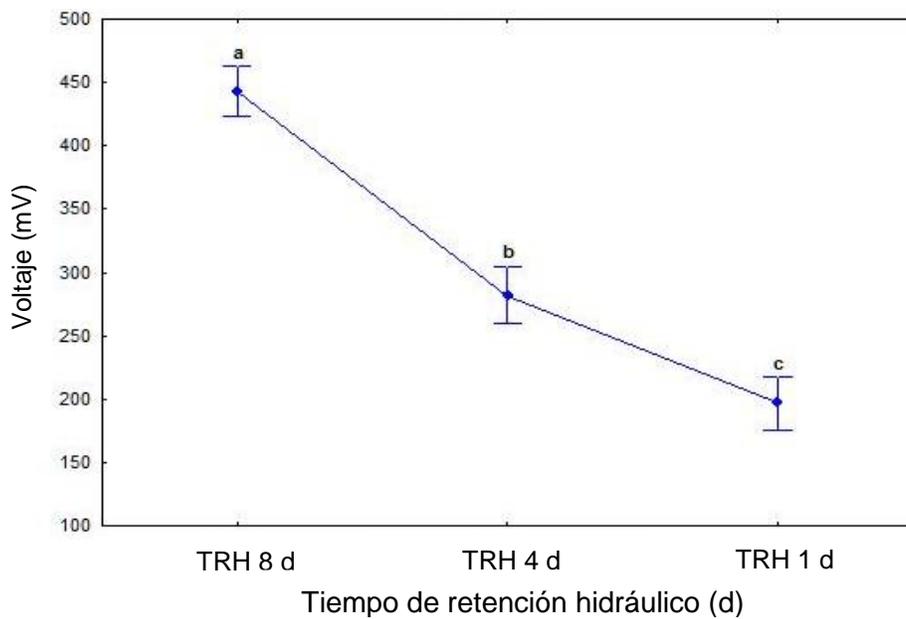


Figura 7.3. Prueba de Tukey de producción de voltaje en la CCH

CAPÍTULO 8. REFERENCIAS

Aelterman, P., Rabaey, K., Clauwaert, P., Verstraete, W. (2006). Microbial fuel cells for wastewater treatment. *Water science and technology*, 54(8), 9-15.

Ahn, Y., Hatzell, M. C., Zhang, F., Logan, B. E. (2014). Different electrode configurations to optimize performance of multi-electrode microbial fuel cells for generating power or treating domestic wastewater. *Journal of Power Sources*, 249, 440-445.

Ahn, Y., Logan, B. E. (2013). Domestic wastewater treatment using multi-electrode continuous flow MFCs with a separator electrode assembly design. *Applied microbiology and biotechnology*, 97(1), 409-416.

APHA. 2005 Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 21st ed. APHA, AWWA, WOCF, Washington DC, USA.

Argun, H., Kargi, F., Kapdan, I. K. (2009). Microbial culture selection for bio-hydrogen production from waste ground wheat by dark fermentation. *International journal of hydrogen energy*, 34(5), 2195-2200.

Arslan, C., Sattar, A., Ji, C., Sattar, S., Yousaf, K., Hashim, S. (2015). Optimizing the impact of temperature on bio-hydrogen production from food waste and its derivatives under no pH control using statistical modelling. *Biogeosciences*, 12(21), 6503-6514.

Bartacek J., Zabranska J., Lens P.N.L. (2007). Developments and constraints in fermentative hydrogen production. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*, (1), 201-214.

Bastidas-Oyanedel JR, Mohd-Zaki Z, Zeng RJ, Bernet N, Pratt S., Steyer J. (2012) Gas controlled hydrogen fermentation. *Bioresour Technol*, (110), 503–509.

Bastidas-Oyanedel, J. R., Mohd-Zaki, Z., Zeng, R. J., Bernet, N., Pratt, S., Steyer, J. P., Batstone, D. J. (2012). Gas controlled hydrogen fermentation. *Bioresource technology*, 110, 503-509.

Bedoya, A., Castrillón, J. C., Ramírez, J. E., Vásquez, J. E., Arias Zabala, M. (2008). Biological production of hydrogen: a literature survey. *Dyna*, 75(154), 137-157.

Behera, P. R., Dash, R., Ali, S. M., Mohapatra, K. K. (2014). A review on fuel cell and its applications. *International Journal of Research in Engineering and Technology*, (3), 562-565.

Blanco Londoño, S. A., Rodríguez Chaparro, T. (2012). Producción de biohidrógeno a partir de residuos mediante fermentación oscura: una revisión crítica. *Ingeniare. Revista chilena de ingeniería*, 20(3), 398-411.

Bretschger, O., Osterstock, J. B., Pinchak, W. E., Ishii, S. I., Nelson, K. E. (2010). Microbial fuel cells and microbial ecology: applications in ruminant health and production research. *Microbial ecology*, 59(3), 415-427.

Buitrón, G., Carvajal, C. (2010). Biohydrogen production from Tequila vinasses in an anaerobic sequencing batch reactor: effect of initial substrate concentration, temperature and hydraulic retention time. *Bioresource Technology*, 101(23), 9071-9077.

Caisaguano, A., Elizabeth, G., Galarza, G., Fernando, A. (2015). Tesis. Estudio de la influencia de la demanda Bioquímica de Oxígeno de Aguas Residuales en la producción de Bioelectricidad de una Celda de Combustible Microbiano. Escuela Superior Politécnica de Chimborazo. Facultad de ciencias. Riobamba, Ecuador

Calignano, F., Tommasi, T., Manfredi, D., Chiolerio, A. (2015). Additive manufacturing of a microbial fuel cell—A detailed study. *Scientific reports*, 5, 17373.

Carbajal, C. (2009). Tesis de maestría. Efecto de la temperatura en la producción de hidrógeno a partir de las aguas residuales. Universidad Nacional Autónoma de México.

Cardoso, V., Romão, B. B., Silva, F. T., Santos, J. G., Batista, F. R., Ferreira, J. S. (2014). Hydrogen production by dark fermentation. *Chem Engg Trans*, 38, 481-486.

Cervantes A. (2001). Tesis de maestría. Biodegradación de aguas residuales y producción de electricidad en una celda de combustible microbiana. Universidad Nacional Autónoma de México. Querétaro, México.

Chandrasekhar, K., Lee, Y. J., Lee, D. W. (2015). Biohydrogen production: strategies to improve process efficiency through microbial routes. *International journal of molecular sciences*, 16(4), 8266-8293.

Chen, W. M., Tseng, Z. J., Lee, K. S., Chang, J. S. (2005). Fermentative hydrogen production with *Clostridium butyricum* CGS5 isolated from anaerobic sewage sludge. *International Journal of Hydrogen Energy*, 30(10), 1063-1070.

Chen, X., Sun, Y., Xiu, Z., Li, X., Zhang, D. (2006). Stoichiometric analysis of biological hydrogen production by fermentative bacteria. *International Journal of Hydrogen Energy*, 31(4), 539-549.

Cheng, S., Liu, H., Logan, B. E. (2006). Increased power generation in a continuous flow MFC with advective flow through the porous anode and reduced electrode spacing. *Environmental science & technology*, 40(7), 2426-2432.

Choi, Y., Kim, N., Kim, S., Jung, S. (2003). Dynamic behaviors of redox mediators within the hydrophobic layers as an important factor for effective microbial fuel cell operation. *Bulletin-Korean chemical society*, 24(4), 437-440.

Chu, C. F., Li, Y. Y., Xu, K. Q., Ebie, Y., Inamori, Y., Kong, H. N. (2008). A pH-and temperature-phased two-stage process for hydrogen and methane production from food waste. *International journal of hydrogen energy*, 33(18), 4739-4746.

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. *International Journal of hydrogen energy*, 35(17), 8855-8861.

Danish, M. K., Abdulateif, H., Ismail, I. M., Sabir, S., Khan, M. Z. (2015). Bioelectricity generation and bioremediation of an azo-dye in a microbial fuel cell coupled activated sludge process. *PloS one*, 10(10), e0138448.

Dincer, I., Acar, C. (2015). Review and evaluation of hydrogen production methods for better sustainability. *International journal of hydrogen energy*, 40(34), 11094-11111.

Dong, Y., Feng, Y., Qu, Y., Du, Y., Zhou, X., Liu, J. (2015). A combined system of microbial fuel cell and intermittently aerated biological filter for energy self-sufficient wastewater treatment. *Scientific reports*, 5.

Du, Z., Li, H., Gu, T. (2007). A state of the art review on microbial fuel cells: a promising technology for wastewater treatment and bioenergy. *Biotechnology advances*, 25(5), 464-482.

ElMekawy, A., Srikanth, S., Bajracharya, S., Hegab, H. M., Nigam, P. S., Singh, A., Pant, D. (2015). Food and agricultural wastes as substrates for bioelectrochemical system (BES): the synchronized recovery of sustainable energy and waste treatment. *Food Research International*, 73, 213-225.

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. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 55, 942-956.

Esteve-Núñez, A. (2008). Bacterias productoras de electricidad. *Revista Actualidad Sociedad Española de Microbiología*, 38-43.

Estrada E. (2006). Tesis de maestría. Remoción de compuestos aromáticos mediante un sistema combinado anaerobio/aerobio de lecho fluidizado. Universidad Nacional Autónoma de México.

Falcón, A., Lozano, J. E., Juárez, K. (2009). Bioelectricidad. *BioTecnología*, 13, 62-78.

Fang, H. H., Liu, H. (2002). Effect of pH on hydrogen production from glucose by a mixed culture. *Bioresource technology*, 82(1), 87-93.

Fangkum, A., Reungsang, A. (2011). Biohydrogen production from sugarcane bagasse hydrolysate by elephant dung: effects of initial pH and substrate concentration. *International Journal of Hydrogen Energy*, 36(14), 8687-8696.

Fangkum, A., Reungsang, A. (2011). Biohydrogen production from sugarcane bagasse hydrolysate by elephant dung: effects of initial pH and substrate concentration. *International Journal of Hydrogen Energy*, 36(14), 8687-8696.

Fatemi, S., Ghoreyshi, A., Najafpour, G., Rahimnejad, M. (2012). Bioelectricity Generation in Mediator-Less Microbial Fuel Cell: Application of Pure and Mixed Cultures. *Iranica J. Energy Environ (IJEE)*, 3, 104.

Finkelstein, D. A., Tender, L. M., Zeikus, J. G. (2006). Effect of electrode potential on electrode-reducing microbiota. *Environmental science & technology*, 40(22), 6990-6995.

Gadhamshetty, V., Johnson, D. C., Nirmalakhandan, N., Smith, G. B., Deng, S. (2010). Dark and acidic conditions for fermentative hydrogen production. *International journal of hydrogen energy*, 34(2), 821-826.

García-Villarrubia, A. (2015). Tesis. Valoración energética y tratamiento de efluentes residuales mediante celdas de combustible microbiológicas. Universidad de Castilla-la Mancha. Facultad de ciencias y tecnologías químicas. Ciudad Real, España.

Ghasemi, M., Daud, W. R. W., Ismail, M., Rahimnejad, M., Ismail, A. F., Leong, J. X., Liew, K. B. (2013). Effect of pre-treatment and biofouling of proton exchange membrane on microbial fuel cell performance. *International journal of hydrogen energy*, 38(13), 5480-5484.

Ghasemi, M., Shahgaldi, S., Ismail, M., Yaakob, Z., Daud, W. R. W. (2012). New generation of carbon nanocomposite proton exchange membranes in microbial fuel cell systems. *Chemical Engineering Journal*, 184, 82-89.

Ghimire, A., Sposito, F., Frunzo, L., Trably, E., Escudié, R., Pirozzi, F., Esposito, G. (2016). Effects of operational parameters on dark fermentative hydrogen production from biodegradable complex waste biomass. *Waste Management*, 50, 55-64.

Gil-Carrera, L., Escapa, A., Mehta, P., Santoyo, G., Guiot, S. R., Morán, A., Tartakovsky, B. (2013). Microbial electrolysis cell scale-up for combined wastewater treatment and hydrogen production. *Bioresource technology*, 130, 584-591.

Gil-Carrera, L., Escapa, A., Moreno, R., Morán, A. (2013). Reduced energy consumption during low strength domestic wastewater treatment in a semi-pilot tubular microbial electrolysis cell. *Journal of environmental management*, 122, 1-7.

Ginkel, S., Logan, B. E. (2005). Inhibition of biohydrogen production by undissociated acetic and butyric acids. *Environmental science & technology*, 39(23), 9351-9356.

Giorgi, L., Leccese, F. (2013). *Fuel Cells: Technologies and Applications*. The Open Fuel Cells Journal, (6), 1-20.

Goto, Y., Yoshida, N., Umeyama, Y., Yamada, T., Tero, R., Hiraishi, A. (2015). Enhancement of electricity production by graphene oxide in soil microbial fuel cells and plant microbial fuel cells. *Frontiers in bioengineering and biotechnology*, 3, 42.

Haile, S. M. (2003). Fuel cell materials and components. *Acta Materialia*, 51(19), 5981-6000.

Hallenbeck P.C., Benemann J.R. (2002). Biological hydrogen production; fundamentals and limiting processes. *International Journal of Hydrogen Energy*, (27), 1185-1193.

Haoran, Y., Lifang, D., Tao, L., Yong, C. (2014). Hydrothermal synthesis of nanostructured manganese oxide as cathodic catalyst in a microbial fuel cell fed with leachate. *The Scientific World Journal*, 2014.

Heidrich E. S., Dolfig J., Scott K., Edwards S.R., Jones C., Curtis T. P. (2013). Production of hydrogen from domestic wastewater in a pilot-scale microbial electrolysis cell. *Environmental Biotechnology*, (97), 6979-6989.

Heidrich, E. S., Dolfig, J., Scott, K., Edwards, S. R., Jones, C., Curtis, T. P. (2013). Production of hydrogen from domestic wastewater in a pilot-scale microbial electrolysis cell. *Applied microbiology and biotechnology*, 97(15), 6979-6989.

Hou, B., Hu, Y., Sun, J. (2012). Performance and microbial diversity of microbial fuel cells coupled with different cathode types during simultaneous azo dye decolorization and electricity generation. *Bioresource technology*, 111, 105-110.

Hou, Y., Luo, H., Liu, G., Zhang, R., Li, J., Fu, S. (2014). Improved hydrogen production in the microbial electrolysis cell by inhibiting methanogenesis using ultraviolet irradiation. *Environmental science & technology*, 48(17), 10482-10488.

Hoyos, B. A., Restrepo, A. I., Mesa, C. M. (2007). Ánodos de Pt-Ru y Pt-Ir para celdas de combustible alimentadas con metano y propano directo. *Información tecnológica*, 18(4), 41-46.

Hussy, I., Hawkes, F. R., Dinsdale, R., Hawkes, D. L. (2005). Continuous fermentative hydrogen production from sucrose and sugarbeet. *International Journal of Hydrogen Energy*, 30(5), 471-483.

Jafary, T., Daud, W. R. W., Ghasemi, M., Kim, B. H., Jahim, J. M., Ismail, M., Lim, S. S. (2015). Biocathode in microbial electrolysis cell; present status and future prospects. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 47, 23-33.

Jeremiasse, A. W., Hamelers, H. V., Buisman, C. J. (2010). Microbial electrolysis cell with a microbial biocathode. *Bioelectrochemistry*, 78(1), 39-43.

Kadier, A., Simayi, Y., Abdeshahian, P., Azman, N. F., Chandrasekhar, K., Kalil, M. S. (2016). A comprehensive review of microbial electrolysis cells (MEC) reactor designs and configurations for sustainable hydrogen gas production. *Alexandria Engineering Journal*, 55(1), 427-443.

Kadiera A., Simayib Y., Abdeshahianc P., Azmana N.F., Chandrasekhare K., Kalila M.S. (2016). A comprehensive review of microbial electrolysis cells (MEC) reactor designs and configurations for sustainable hydrogen gas production. *Alexandria Engineering Journal*, 55 (1), 427–443.

Kalogo Y., Bagley D.M. (2008). Fermentative hydrogen gas production using biosolids pellets as the inoculum source. *Bioresource Technology*, (99), 540-546.

Kazemi, S., Barazandegan, M., Mohseni, M., Fatih, K. (2016). Systematic Study of Separators in Air-Breathing Flat-Plate Microbial Fuel Cells—Part 2: Numerical Modeling. *Energies*, 9(2), 79.

Kiely, P. D., Cusick, R., Call, D. F., Selembo, P. A., Regan, J. M., Logan, B. E. (2011). Anode microbial communities produced by changing from microbial fuel cell to microbial electrolysis cell operation using two different wastewaters. *Bioresource technology*, 102(1), 388-394.

Kiely, P. D., Rader, G., Regan, J. M., Logan, B. E. (2011). Long-term cathode performance and the microbial communities that develop in microbial fuel cells fed different fermentation endproducts. *Bioresource technology*, 102(1), 361-366.

Kim, Y., Logan, B. E. (2013). Simultaneous removal of organic matter and salt ions from saline wastewater in bioelectrochemical systems. *Desalination*, 308, 115-121.

Koponen, J. (2015). Review of water electrolysis technologies and design of renewable hydrogen production systems. Lappeenranta University of Technology.

Kwasi, C. C., Obanor, A. I., Aisien, F. A. (2015). A Review on Electrolytic Method of Hydrogen Production from Water. *American Journal of Renewable and Sustainable Energy*, 1(2), 51-57.

Kyazze, G., Dinsdale, R., Hawkes, D. L. (2007). Continuous dark fermentative hydrogen production by mesophilic microflora: principles and progress. *International Journal of Hydrogen Energy*, 32(2), 172-184.

Lache M. (2015). Hydrogen Production from Solar Energy. The Overview in Colombia. *Revista Elementos*, 5, 95-111.

Lay, J. J., Lee, Y. J., Noike, T. (1999). Feasibility of biological hydrogen production from organic fraction of municipal solid waste. *Water research*, 33(11), 2579-2586.

Lee, Y. S., Ahn, J., Kim, B., Park, H., Kim, J., Chang, I. S. (2015). Increased power in sediment microbial fuel cell: facilitated mass transfer via a water-layer anode embedded in sediment. *PloS one*, 10(12),

Leite, J. A., Fernandes, B. S., Pozzi, E., Barboza, M., Zaiat, M. (2008). Application of an anaerobic packed-bed bioreactor for the production of hydrogen and organic acids. *International Journal of Hydrogen Energy*, 33(2), 579-586.

Leong, J. X., Daud, W. R. W., Ghasemi, M., Liew, K. B., Ismail, M. (2013). Ion exchange membranes as separators in microbial fuel cells for bioenergy conversion: a comprehensive review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 28, 575-587.

Lewis, N. S., Nocera, D. G. (2006). Powering the planet: Chemical challenges in solar energy utilization. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(43), 15729-15735.

Li W.-W., Yu H.-Q., He Z. (2014). Towards sustainable wastewater treatment by using microbial fuel cells-centered technologies. *Energy and Environmental Science*, 7, 911-924.

Li, W. W., Yu, H. Q., He, Z. (2014). Towards sustainable wastewater treatment by using microbial fuel cells-centered technologies. *Energy & Environmental Science*, 7(3), 911-924.

Liu D., Zeng R.J. and Angelikadi I. (2006). Hydrogen methane production from household solid waste in two-stage fermentation process. *Water Research*. Vol. 40, pp. 2230-2236.

Liu, D., Angelidaki, I., Zeng, R. J., Min, B. (2008). Bio-hydrogen production by dark fermentation from organic wastes and residues. Technical University of Denmark Danmarks Tekniske Universitet, Department of Systems Biology Institut for Systembiologi.

Liu, H., Wang, J., Wang, A., Chen, J. (2011). Chemical inhibitors of methanogenesis and putative applications. *Applied microbiology and biotechnology*, 89(5), 1333-1340.

Logan B.E., Wallack M.J., Kim K.-Y., He W., Feng Y., Saikaly P.E. (2015). Assessment of microbial fuel cell configurations and power densities. *Environmental Science and Technology Letters*, 2, 206-214.

Logan, B. E., Regan, J. M. (2006). Electricity-producing bacterial communities in microbial fuel cells. *TRENDS in Microbiology*, 14(12), 512-518.

Logan, B. E., Wallack, M. J., Kim, K. Y., He, W., Feng, Y., Saikaly, P. E. (2015). Assessment of microbial fuel cell configurations and power densities. *Environmental Science & Technology Letters*, 2(8), 206-214.

Logan, B., Cheng, S., Watson, V., Estadt, G. (2007). Graphite fiber brush anodes for increased power production in air-cathode microbial fuel cells. *Environmental science & technology*, 41(9), 3341-3346.

Logroño, W., Guambo, A., Pérez, M., Kadier, A., Recalde, C. (2016). A Terrestrial Single Chamber Microbial Fuel Cell-based Biosensor for Biochemical Oxygen Demand of Synthetic Rice Washed Wastewater. *Sensors*, 16(1), 101.

López-Prieto, I., Salazar, L., Vargas, A., Buitrón, G. Automatic strategy for a microbial fuel cell colonization. *Biological Processes IWA-Mexico*

Lovley, D. R. (2008). The microbe electric: conversion of organic matter to electricity. *Current opinion in Biotechnology*, 19(6), 564-571.

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. *Biosensors and Bioelectronics*, 24(10), 3055-3060.

Maintinguer, S. I., Fernandes, B. S., Duarte, I. C., Saavedra, N. K., Adorno, M. A. T., Varesche, M. B. A. (2011). Fermentative hydrogen production with xylose by *Clostridium* and *Klebsiella* species in anaerobic batch reactors. *International journal of hydrogen energy*, 36(21), 13508-13517.

Mayahi, A., Ismail, A. F., Ilbeygi, H., Othman, M. H. D., Ghasemi, M., Norddin, M. M., Matsuura, T. (2013). Effect of operating temperature on the behavior of promising SPEEK/cSMM electrolyte membrane for DMFCs. *Separation and Purification Technology*, 106, 72-81.

McCormick, A. J., Bombelli, P., Bradley, R. W., Thorne, R., Wenzel, T., Howe, C. J. (2015). Biophotovoltaics: oxygenic photosynthetic organisms in the world of bioelectrochemical systems. *Energy Environ. Sci.*, 8(4), 1092-1109.

Merino-Jimenez, I., Santoro, C., Rojas-Carbonell, S., Greenman, J., Ieropoulos, I., Atanassov, P. (2016). Carbon-based air-breathing cathodes for microbial fuel cells. *Catalysts*, 6(9), 127.

Nakamura, M., Kanbe, H., Matsumoto, J. I. (2003). Fundamental studies on hydrogen production in the acid-forming phase and its bacteria in anaerobic treatment processes—the effects of solids retention time. *Water Science and Technology*, 28(7), 81-88.

Ntaikou, I., Antonopoulou, G., Lyberatos, G. (2010). Biohydrogen production from biomass and wastes via dark fermentation: a review. *Waste and Biomass Valorization*, 1(1), 21-39.

Oh, S. E., Iyer, P., Bruns, M. A., Logan, B. E. (2004). Biological hydrogen production using a membrane bioreactor. *Biotechnology and bioengineering*, 87(1), 119-127.

Omeroglu, S., Sanin, F. (2015). Microbial fuel cells: Sustainable technology for energy production and wastewater treatment. *Proceedings of the 14th International Conference on Environmental Science and Technology*.

Pandey, P., Shinde, V. N., Deopurkar, R. L., Kale, S. P., Patil, S. A., Pant, D. (2016). Recent advances in the use of different substrates in microbial fuel cells toward wastewater treatment and simultaneous energy recovery. *Applied Energy*, 168, 706-723.

Pant, D., Arslan, D., Van Bogaert, G., Gallego, Y. A., De Wever, H., Diels, L., Vanbroekhoven, K. (2013). Integrated conversion of food waste diluted with sewage into volatile fatty acids through fermentation and electricity through a fuel cell. *Environmental technology*, 34(13-14), 1935-1945.

Pant, D., Singh, A., Van Bogaert, G., Gallego, Y. A., Diels, L., Vanbroekhoven, K., (2011). An introduction to the life cycle assessment (LCA) of bioelectrochemical systems (BES) for sustainable energy and product generation: Relevance and key aspects; *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, (15), 1305-1313.

Park, I. H., Christy, M., Kim, P., Nahm, K. S. (2014). Enhanced electrical contact of microbes using Fe₃O₄/CNT nanocomposite anode in mediator-less microbial fuel cell. *Biosensors and Bioelectronics*, 58, 75-80.

Passos, V. F., Aquino Neto, S., Andrade, A. R. D., Reginatto, V. (2016). Energy generation in a Microbial Fuel Cell using anaerobic sludge from a wastewater treatment plant. *Scientia Agricola*, 73(5), 424-428.

Pisciotta J.M., Zaybak Z., Call D.F., Nam J.-Y., Logan B.E. (2012). Enrichment of microbial electrolysis cell biocathodes from sediment microbial fuel cell bioanodes. *Applied and Environmental Microbiology*, 78 (15), 5212-5219

Rabaey, K., Verstraete, W. (2005). Microbial fuel cells: novel biotechnology for energy generation. *TRENDS in Biotechnology*, 23(6), 291-298.

Rahimnejad, M., Adhami, A., Darvari, S., Zirepour, A., Oh, S. E. (2015). Microbial fuel cell as new technology for bioelectricity generation: A review. *Alexandria Engineering Journal*, 54(3), 745-756.

Rahimnejad, M., Bakeri, G., Najafpour, G., Ghasemi, M., Oh, S. E. (2014). A review on the effect of proton exchange membranes in microbial fuel cells. *Biofuel Research Journal*, 1(1), 7-15.

Rashid, M. M., Al Mesfer, M. K., Naseem, H., Danish, M. (2015). Hydrogen production by water electrolysis: a review of alkaline water electrolysis, PEM water electrolysis and high temperature water electrolysis. *Int J Eng Adv Technol*, 4(3), 80-93.

Redondas Monteserín, V. (2013). Tesis de doctorado. Obtención de Hidrógeno mediante la fermentación oscura de residuos de comida y lactosuero. Universidad de León. Instituto de Medio Ambiente, Recursos Naturales y Biodiversidad. León, España.

Revelo, D. M., Hurtado, N. H., Ruiz, J. O. (2013). Celdas de combustible microbianas (CCMs): Un reto para la remoción de materia orgánica y la generación de energía eléctrica. *Información tecnológica*, 24(6), 17-28.

Reyes-Contreras, C., and Vidal, G. (2015). Methanogenic toxicity evaluation of chlortetracycline hydrochloride. *Electronic Journal of Biotechnology*, 18(6), 445-450.

Rismani-Yazdi, H., Christy, A. D., Carver, S. M., Yu, Z., Dehority, B. A., Tuovinen, O. H. (2011). Effect of external resistance on bacterial diversity and metabolism in cellulose-fed microbial fuel cells. *Bioresource technology*, 102(1), 278-283.

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. *Journal of Applied Electrochemistry*, 45(11), 1223-1229.

Rossi, R., Fedrigucci, A., Setti, L. (2015). Characterization of electron mediated microbial fuel cell by *Saccharomyces Cerevisiae*. *Chemical Engineering Transactions*, 43, 337-342.

Rozendal, R. A., Hamelers, H. V., Euverink, G. J., Metz, S. J., Buisman, C. J. (2006). Principle and perspectives of hydrogen production through biocatalyzed electrolysis. *International Journal of Hydrogen Energy*, 31(12), 1632-1640.

Rozendal, R. A., Hamelers, H. V., Euverink, G. J., Metz, S. J., Buisman, C. J. (2006). Principle and perspectives of hydrogen production through biocatalyzed electrolysis. *International Journal of Hydrogen Energy*, 31(12), 1632-1640.

Rózsenszki, T., Koók, L., Hutvágner, D., Nemestóthy, N., Bélafi-Bakó, K., Bakonyi, P., Sarkady, A. (2015). Comparison of anaerobic degradation processes for bioenergy generation from liquid fraction of pressed solid waste. *Waste and Biomass Valorization*, 6(4), 465-473.

Satyapal, S., Petrovic, J., Read, C., Thomas, G., Ordaz, G. (2007). The US Department of Energy's National Hydrogen Storage Project: Progress towards meeting hydrogen-powered vehicle requirements. *Catalysis today*, 120(3), 246-256.

Sevda, S., Dominguez-Benetton, X., Vanbroekhoven, K., Sreekrishnan, T. R., Pant, D. (2013). Characterization and comparison of the performance of two different separator types in air-cathode microbial fuel cell treating synthetic wastewater. *Chemical engineering journal*, 228, 1-11.

Sharma, A., Del Carmen Flores-Vallejo, R., Cardoso-Taketa, A., Villarreal, M. L. (2016). Antibacterial activities of medicinal plants used in Mexican traditional medicine. *Journal of ethnopharmacology*.

Sharma, Y., Li, B. (2010). Optimizing energy harvest in wastewater treatment by combining anaerobic hydrogen producing biofermentor (HPB) and microbial fuel cell (MFC). *International Journal of Hydrogen Energy*, 35(8), 3789-3797.

Shin, H. S., Youn, J. H., Kim, S. H. (2004). Hydrogen production from food waste in anaerobic mesophilic and thermophilic acidogenesis. *International Journal of Hydrogen Energy*, 29(13), 1355-1363.

Soares, B. F., Peixoto, G., Albrecht, F. R., Del Aguila, N. K. S., Zaiat, M. (2010). Potential to produce biohydrogen from various wastewaters. *Energy for Sustainable Development*, 14(2), 143-148.

Song, H. L., Zhu, Y., Li, J. (2015). Electron transfer mechanisms, characteristics and applications of biological cathode microbial fuel cells—A mini review. *Arabian Journal of Chemistry*.

Sun, M., Sheng, G. P., Mu, Z. X., Liu, X. W., Chen, Y. Z., Wang, H. L., Yu, H. Q. (2009). Manipulating the hydrogen production from acetate in a microbial electrolysis cell-microbial fuel cell-coupled system. *Journal of Power Sources*, 191(2), 338-343.

Sung, S., Bazylnski, D. A., Raskin, L. (2003, May). Biohydrogen production from renewable organic wastes. In US DOE Hydrogen, Fuel Cells & Infrastructure Technologies Program—2003 Annual Merit Review Meeting.

Tran, P., Nguyen, L., Nguyen, H., Nguyen, B., Nong, L., Mai, L., Pham, H. (2016). Effects of inoculation sources on the enrichment and performance of anode bacterial consortia in sensor typed microbial fuel cells. *AIMS BIOENGINEERING*, 3(1), 60-74.

Tursun, H., Liu, R., Li, J., Abro, R., Wang, X., Gao, Y., Li, Y. (2016). Carbon Material Optimized Biocathode for Improving Microbial Fuel Cell Performance. *Frontiers in microbiology*, 7.

Valdez-Vazquez, I., Poggi-Varaldo, H. M. (2009). Hydrogen production by fermentative consortia. *Renewable and sustainable energy reviews*, 13(5), 1000-1013.

Valverde, S. M., (2012). "Hidrógeno como energético y materiales para celdas de combustible". Departamento de Química, Primera edición. pp 464-467.

Venkata, B. L., Mohan, S. V., Sarma, P. N. (2009). Influence of reactor configuration on fermentative hydrogen production during wastewater treatment. *International Journal of Hydrogen Energy*, 34(8), 3305-3312.

Virdis, B., Rabaey, K., Yuan, Z., Rozendal, R. A., Keller, J. (2009). Electron fluxes in a microbial fuel cell performing carbon and nitrogen removal. *Environmental science & technology*, 43(13), 5144-5149.

Virdis, B., Read, S. T., Rabaey, K., Rozendal, R. A., Yuan, Z., Keller, J. (2011). Biofilm stratification during simultaneous nitrification and denitrification (SND) at a biocathode. *Bioresource Technology*, 102(1), 334-341.

Vishwanathan, A. S., Sai, S., Rao, G. (2015). The oxygen paradox in microbial fuel cells. *Current science*, 109(8), 1390.

Wang J. and Wan W. (2009). Factors influencing fermentative hydrogen production: A review. *International Journal of Hydrogen Energy*, (34), 799-811.

Wang, J., Wan, W. (2008). Comparison of different pretreatment methods for enriching hydrogen-producing bacteria from digested sludge. *International Journal of Hydrogen Energy*, 33(12), 2934-2941.

Wang, J., Wan, W. (2009). Factors influencing fermentative hydrogen production: a review. *International journal of hydrogen energy*, 34(2), 799-811.

Werner C.M., Logan B.L., Saikaly P.E., Amy G.L. (2013). Wastewater treatment, energy recovery and desalination using a forward osmosis membrane in an air-cathode microbial fuel cell. *Jouernl of Membrane Science*, 428, 116-122.

Yamashita, T., Ishida, M., Asakawa, S., Kanamori, H., Sasaki, H., Ogino, A., Yokoyama, H. (2016). Enhanced electrical power generation using flame-oxidized stainless steel anode in microbial fuel cells and the anodic community structure. *Biotechnology for biofuels*, 9(1), 62.

Yang, P., Zhang, R., McGarvey, J. A., Benemann, J. R. (2007). Biohydrogen production from cheese processing wastewater by anaerobic fermentation using mixed microbial communities. *International Journal of Hydrogen Energy*, 32(18), 4761-4771.

Yasin, N. H. M., Mumtaz, T., Hassan, M. A. (2013). Food waste and food processing waste for biohydrogen production: a review. *Journal of environmental management*, 130, 375-385.

Zarate A. (2006). Tesis de maestría. Estudio de los potenciales de óxido-reducción en reactores biológicos que simulan un humedal artificial. Universidad Nacional Autónoma de México.

Zhang, G. S., Guo, X. Y., Xing, Y., Fan, M. H. (2006). Biohydrogen-production from beer lees biomass by cow dung compost. *Biomass and Bioenergy*, 30(5), 493-496.

Zhang, T., Liu, H., Fang, H. H. (2003). Biohydrogen production from starch in wastewater under thermophilic condition. *Journal of environmental management*, 69(2), 149-156.

Zhang, Y., Angelidaki, I. (2012). Innovative self-powered submersible microbial electrolysis cell (SMEC) for biohydrogen production from anaerobic reactors. *Water research*, 46(8), 2727-2736.

Zhang, Y., Angelidaki, I. (2014). Microbial electrolysis cells turning to be versatile technology: recent advances and future challenges. *Water research*, 56, 11-25.

Zhou, M., Jin, T., Wu, Z., Chi, M., Gu, T. (2012). Microbial fuel cells for bioenergy and bioproducts. In *Sustainable Bioenergy and Bioproducts* (pp. 131-171). Springer London.

Zhou, M., Yang, J., Wang, H., Jin, T., Hassett, D. J., Gu, T. (2014). Bioelectrochemistry of microbial fuel cells and their potential applications in bioenergy. *Bioenergy Research: Advances and Applications*, 131-152.