INSTITUTO POTOSINO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA Y TECNOLÓGICA, A.C.

POSGRADO EN CIENCIAS AMBIENTALES

Efecto de la composición de mezclas de metabolitos procedentes de la fermentación oscura para su uso en la producción de biohidrógeno en celdas de electrólisis microbiana

Tesis que presenta

Claudia Lizeth Paz Mireles

Para obtener el grado de

Maestra en Ciencias Ambientales

Co-directores de Tesis:

Dr. Elías Razo Flores

Dra. Bibiana Cercado Quezada

San Luis Potosí, S.L.P., febrero de 2016

CRÉDITOS INSTITUCIONALES

Esta tesis fue elaborada en los laboratorios de la División de Ciencias Ambientales del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., bajo la co-dirección del Dr. Elías Razo Flores y de la Dra. Bibiana Cercado Quezada.

Durante la realización del trabajo el autor recibió una beca académica del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT-296786).

Este trabajo de investigación fue financiado con recursos de los proyectos SEP-CONACyT 132483 y 177441 asignados al Dr. Elías Razo Flores y a la Dra. Bibiana Cercado Quezada, respectivamente.

IPICYT

Constancia de aprobación de la tesis

La tesis ***"Efecto de la composición de mezclas de metabolitos procedentes de la fermentación oscura para su uso en la producción de biohidrógeno en celdas de electrólisis microbiana"*** presentada para obtener el Grado de Maestra en Ciencias Ambientales fue elaborada por **Claudia Lizeth Paz Mireles** y aprobada **el cinco de febrero de dos mil dieciséis** por los suscritos, designados por el Colegio de Profesores de la División de Ciencias Ambientales del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.

Dr. Elías Razo Flores
Codirector de la tesis

Dra. Bibiana Cercado Quezada
Codirectora de tesis

Dr. Luis Felipe Cházaro Ruiz
Miembro del Comité Tutoral

IPICYT

Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.

Acta de Examen de Grado

El Secretario Académico del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., certifica que en el Acta 030 del Libro Primero de Actas de Exámenes de Grado del Programa de Maestría en Ciencias Ambientales está asentado lo siguiente:

En la ciudad de San Luis Potosí a los 5 días del mes de febrero del año 2016, se reunió a las 10:00 horas en las instalaciones del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., el Jurado integrado por:

Dra. Bibiana Cercado Quezada	**Presidenta**	**CIDETEQ**
Dr. Luis Felipe Cházaro Ruiz	**Secretario**	**IPICYT**
Dr. Elías Razo Flores	**Sinodal**	**IPICYT**

a fin de efectuar el examen, que para obtener el Grado de:

MAESTRA EN CIENCIAS AMBIENTALES

sustentó la C.

Claudia Lizeth Paz Mireles

sobre la Tesis intitulada:

Efecto de la composición de mezclas de metabolitos procedentes de la fermentación oscura para su uso en la producción de biohidrógeno en celdas de electrólisis microbiana

que se desarrolló bajo la dirección de

Dr. Elías Razo Flores
Dra. Bibiana Cercado Quezada (CIDETEQ)

El Jurado, después de deliberar, determinó

APROBARLA

Dándose por terminado el acto a las 12:40 horas, procediendo a la firma del Acta los integrantes del Jurado. Dando fe el Secretario Académico del Instituto.

A petición de la interesada y para los fines que a la misma convengan, se extiende el presente documento en la ciudad de San Luis Potosí, S.L.P., México, a los 5 días del mes de febrero de 2016.

Dr. Marcial Bonilla Marín
Secretario Académico

Mtra. Ivonne Lizette Cuevas Vélez
Jefa del Departamento del Posgrado

INSTITUTO POTOSINO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA Y TECNOLÓGICA, A.C.
IPICYT
SECRETARIA ACADEMICA

AGRADECIMIENTOS

Agradezco al Dr. Elías Razo y a la Dra. Bibiana Cercado por el tiempo invertido, los comentarios y las sugerencias que tuvieron a bien hacerme, pero sobre todo por la paciencia y la oportunidad de compartir conmigo su experiencia. Así mismo mi agradecimiento para el Dr. Luis Felipe Cházaro por sus aportaciones que lograron enriquecer este trabajo.

Al valioso apoyo de los técnicos académicos de la División de Ciencias Ambientales del IPICyT: M. en C. Dulce I.F. Partida Gutiérrez, M. en C. Guillermo Vidriales Escobar y M. en C. Juan Pablo Rodas Ortíz. En particular, quisiera agradecer a la M. en C. Elizabeth Cortés Cedillo por su apoyo técnico así como por sus consejos y amistad en el transcurso de estos años.

Mi agradecimiento a los laboratorios LINAN y LAMBAMA del IPICyT por las instalaciones facilitadas así como al valioso apoyo técnico de la I.Q. Ma. del Carmen Rocha Medina y de la Dra. Gladis J. Labrada Delgado.

Agradezco a la División de Ciencias Ambientales del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C. por la infraestructura facilitada para el desarrollo de este trabajo. Mi agradecimiento a CONACyT por la beca otorgada durante el transcurso de la maestría.

Finalmente, agradezco a mis viejos amigos así como a los amigos que forme durante mi paso por la maestría, porque gracias a sus palabras de aliento y a los momentos que compartimos fuera y dentro del instituto, es que esta etapa fue mucho más agradable.

TABLA DE CONTENIDO

CRÉDITOS INSTITUCIONALES ii
AGRADECIMIENTOS iii
LISTA DE FIGURAS vi
LISTA DE TABLAS vii
LISTA DE ABREVIATURAS viii
RESUMEN ix
ABSTRACT x
CAP. I INTRODUCCIÓN 1
1.1 Antecedentes 1
1.1.1 Biocombustibles 2
1.1.2 Hidrógeno como vector energético 3
1.1.3 Sistemas biológicos de producción de Bio-H_2 3
1.1.4 Fermentación oscura 4
1.1.5 Sistemas híbridos de energía 6
1.2 Marco teórico 8
1.2.1 Sistemas Bioelectroquímicos 8
1.2.2 Celda de Electrólisis Microbiana 9
1.2.3 Comunidad microbiana 11
1.2.4 Sustratos 13
1.2.5 Diseño y operación de una CEM 15
1.2.6 Evaluación del desempeño de una CEM 17
1.2.7 Bases electroquímicas de la CEM 20
1.2.8 Estado del arte de la CEM 22
1.3 Justificación 26
1.4 Hipótesis 27
1.5 Objetivos 27
1.5.1 General 27
1.5.2 Específicos 27
CAP. II MATERIALES Y MÉTODOS 28
2.1 Fuente de inóculo 28

2.2 Anolito 29
2.3 Catolito 30
2.4 Estrategia experimental 31
2.5 Diseño de CEM y electrodos 32
2.6 Condiciones de operación 33
2.7 Métodos de análisis 34
2.7.1 Técnicas analíticas 34
2.7.2 Técnicas electroquímicas 35
CAP. III RESULTADOS Y DISCUSIONES 36
3.1 Evaluación del inóculo procedente de la fermentación oscura y de la biopelícula preformada 36
3.2 Evaluación del inóculo lixiviados de composta a dos diferentes voltajes 38
3.2.1 Evolución de la densidad de corriente 39
3.2.2 Producción de Bio-H_2 40
3.2.3 Composición de biogás en la cámara anódica 41
3.2.4 Remoción de DQO y consumo de AGVs 42
3.2.5 Cambios de pH en el sistema 44
3.2.6 Análisis electroquímico de la CEM: Voltamperometría cíclica 45
3.3 Producción de gases con acetato y mezclas de AGVs, lactato y etanol 46
3.4 Consumo de sustratos y cambios de pH 49
3.5 Análisis electroquímico: Cronoamperometría y Voltamperometría cíclica 52
3.6 Desempeño del sistema: Recuperación de energía 56
3.7 Estudio de la biopelícula por microscopía electrónica de barrido 60
CAP. IV 62
4.1 CONCLUSIONES 62
4.2 PERSPECTIVAS 63
REFERENCIAS 65

LISTA DE FIGURAS

Fig. 1 Rutas metabólicas de la fermentación oscura: vía Fd-hidrogenasa (1), vía formiato-hidrogenoliasa (2). Adaptado de Prescott *et al.,* 2002. 6
Fig. 2 Acoplamiento de sistemas para la producción de biocombustibles. Adaptado de Rivera, 2014. 7
Fig. 3 Diagrama esquemático de una CCM (izquierda) y una CEM (derecha). 9
Fig. 4 Componentes de una CEM. 10
Fig. 5 Esquema de los mecanismos de transferencia de electrones: directo (A y B) e indirecto (C) (Lovley, 2012)..... 12
Fig. 6 Microscopía de microorganismos electroactivos. *Geobacter metallireducens* (A) y *Shewanella oneidensis* (B). 13
Fig. 7 Interacciones microbianas en el consumo de sustratos en una CEM. 15
Fig. 8 Estrategia experimental..... 32
Fig. 9 Celda de electrólisis microbiana empleada; cámara anódica (izquierda) y cámara catódica (derecha)..... 33
Fig. 10 Evolución de la densidad de corriente en el tiempo de las CEMs con diferentes concentraciones de DQO (mg/L) probadas. 37
Fig. 11 Desempeño de las CEMs con electrodos previamente colonizados. 38
Fig. 12 Densidad de corriente generada en las CEMs en las que se empleó como inóculo lixiviados de composta a un voltaje aplicado de 0.6 y 1.0 V. 40
Fig. 13 Producción de Bio-H_2 acumulado como función del voltaje. 41
Fig. 14 Respuesta de VC, antes y después de la aplicación del voltaje, a una velocidad de barrido de 10 mV/s, en un intervalo de -1.0 a 1.0 V. CEM 1.0 V (Izquierda), CEM 0.6 V (Derecha). 45
Fig. 15 Producción de Bio-H_2 acumulado en la cámara catódica. 47
Fig. 16 Evolución de la densidad de corriente en el tiempo. 53
Fig. 17 VC registradas a 10 mV/s en el rango de potencial de -1 a 1 V. La línea roja representa la VC del inicio y la línea negra la VC al final del ensayo. (A) CEM M1, (B) CEM M2, (C) CEM M3 y (D) CEM M4. 55
Fig. 18 Micrografía electrónica de barrido del fieltro de carbón colonizado. (A) CEM M1, (B) CEM M2, (C) CEM M3, (D) CEM M4, (E) CEM CTRL (F) CEM CTRL ELECTRÓLISIS DEL AGUA. 61

LISTA DE TABLAS

Tabla 1 Clasificación de los biocmombustibles (Masera *et al.,* 2011). 2
Tabla 2 Ventajas y desventajas de los procesos biológicos de producción de Bio-H_2 (Apuro, 2011). 4
Tabla 3 Sustratos empleados en la CEM. 14
Tabla 4 Parámetros de operación y desempeño de CEMs. 25
Tabla 5 Concentración de AGVs en efluentes de reactores fermentativos. 30
Tabla 6 Composición de las mezclas (g DQO/L). 30
Tabla 7 Concentración de los metabolitos presentes en las CEMs. 43
Tabla 8 Determinación de pH de la cámara anódica y catódica del sistema. 44
Tabla 9 Velocidad de producción de Bio-H_2..... 48
Tabla 10 Volumen acumulado de Biogás en la cámara anódica..... 48
Tabla 11 Remoción de la DQO en cada ensayo. 50
Tabla 12 Cambios de pH en los ensayos con variaciones de lactato y etanol..... 51
Tabla 13 Valores de potenciales de circuito abierto (E_{OCV}). 54
Tabla 14 Desempeño global del sistema. 59

LISTA DE ABREVIATURAS

AGVs	Ácidos grasos volátiles
Bio-H_2	Biohidrógeno
BRA	Bacterias respiradoras del ánodo
CA	Cronoamperometría
CCM	Celda de combustible microbiana
C_E	Eficiencia coulómbica
CEM	Celda de electrólisis microbiana
CH_4	Metano
CO_2	Dióxido de carbono
CSTR	Reactor continuo de tanque agitado
VC	Voltamperometría cíclica
DQO	Demanda química de oxígeno
E_{eq}	Potencial de equilibrio
E_{anod}	Potencial de ánodo
E_{cat}	Potencial del cátodo
Fd	Forma reducida de la ferredoxina
H^+	Protones
H_2	Hidrógeno gaseoso
IPCC	Panel Intergubernamental del Cambio Climático
J	Densidad de corriente
MJ	Megajoules
n_{CE}	Moles de H_2 basados en la corriente producida
n_{exp}	Moles experimentales de H_2
n_{th}	Moles teóricos de H_2 basados en el consumo de sustrato
O_2	Oxígeno gaseoso
PEIS	Espectroscopía de impedancia electroquímica potenciostática
Q_e	Carga experimental
Q_t	Carga teórica
Q_{H2}	Tasa de producción de H_2
r_{cat}	Recuperación catódica de H_2
r_{H2}	Recuperación total de H_2
Ro	Resistencia Óhmica
Rtc	Resistencia a la transferencia de carga
SBE	Sistema bioelectroquímico
SSV	Sólidos suspendidos volátiles
TRH	Tiempo de retención hidráulico
UASB	Reactor anaerobio de flujo ascendente
V	Volt
Y_{H2}	Rendimiento de producción de H_2

RESUMEN

Palabras clave: Celda de electrólisis microbiana, hidrógeno, fermentación oscura.

La celda de electrólisis microbiana (CEM) es un dispositivo que surge como una alternativa a los sistemas actuales de producción de biohidrógeno (Bio-H_2). A la fecha diversos estudios han evaluado algunos parámetros de este sistema (voltaje aplicado, inóculo, configuración de la celda, etc.) con el fin de optimizarlos. El sustrato por excelencia para las CEMs suele ser acetato, sin embargo, hay estudios que reportan el empleo de mezclas de ácidos grasos volátiles (AGVs), lo cual da indicios de que los efluentes de fermentación oscura, ricos en AGVs, pueden emplearse como sustrato en CEMs. No obstante, el efecto de otros componentes de tales efluentes, tal como el etanol y el lactato, no han sido explorados.

El objetivo general de este trabajo fue evaluar el efecto de la variación de la fracción de etanol y lactato en una mezcla definida de acetato, propionato y butirato, para la producción de Bio-H_2 en CEMs.

Para cumplir el objetivo se recurrió a celdas de tipo H, separadas por una membrana de intercambio catiónico, se empleó como inóculo un efluente de un fermentador productor de Bio-H_2 y lixiviados de composta, como voltaje se probaron 0.6 y 1 V. Se evaluó el efecto en el sistema al variar la mezcla de sustratos, que estuvo conformada por acetato, propionato y butirato, los cuales se mantuvieron en una proporción fija, mientras que las proporciones de lactato y etanol variaron.

Al evaluar el inóculo procedente de la fermentación oscura aplicando 0.6 V y diferentes concentraciones de AGVs fue evidente que la cantidad de especies electroactivas presentes en el inóculo no fue la suficiente, puesto que la generación de corriente fue muy inferior a lo reportado en la literatura (~38 mA/m^2), aunado a esto no se observó formación de Bio-H_2. Por lo tanto se decidió utilizar lixiviados de composta de los cuales se sabe tienen una comunidad electroactiva importante, para este caso se aplicaron los mismos voltajes: 0.6 y 1.0 V, siendo con éste último el ensayo con el cual se obtuvo una mejor respuesta en la producción de hidrógeno (0.0325 m^3 H_2/m^3 anolito-d). Una vez definido el inóculo, voltaje y concentración de la mezcla base (lixiviados de composta, 1.0 V y 2.5 g DQO/L) se evaluaron cuatro mezclas de lactato y etanol, en las cuales la DQO se mantuvo fija (1 g/L) pero las proporciones de éstos sustratos variaron de manera tal que de las mezclas uno a la cuatro la concentración de lactato disminuyó, mientras que la de etanol aumentó. Los resultados obtenidos de estos ensayos arrojaron lo siguiente: conforme la proporción de etanol aumentó en la mezcla la producción de Bio-H_2 se vio afectada negativamente a un grado tal que la producción de éste se detuvo por completo.

Puede concluirse entonces que mientras ciertos componentes comunes en los efluentes de fermentación, como los AGVs, permiten la producción de Bio-H_2, otros resultan en detrimento de dicha producción, como es el caso del etanol. La mezcla de los componentes mencionados es inevitable, por tanto es de interés científico y práctico evaluar el alcance de las limitaciones causadas por dichas mezclas en la producción de Bio-H_2 en CEMs.

ABSTRACT

Keywords: Microbial electrolysis cell, hydrogen, dark fermentation.

Microbial electrolysis cell (MEC) is a device that is an alternative to current biohydrogen production systems (Bio-H_2). To date few studies have evaluated system parameters (applied voltage, inoculum, cell configuration, etc.) in order to optimize them. The substrate of choice for the MECs is usually acetate, however, some studies have reported the use of mixtures of volatile fatty acids (VFA), which are produced during dark fermentation. Nonetheless the effects of other components present in the mixture, such as ethanol and lactate, have not yet been explored. The overall objective of this study was to evaluate the effect of varying the fraction of ethanol and lactate in a defined mixture of acetate, propionate and butyrate, for the production of Bio-H_2 in MECs.

To achieve the objective cells type H were used, separated by a cation exchange membrane, it were used as inoculum both effluent from a fermenter producing Bio-H_2 and leachate compost. As voltage were tested 0.6 and 1 V, and it was assessed their effect on the system by varying the mixture of substrates, which consisted of acetate, propionate and butyrate, which remained in a fixed ratio while the proportions of lactate and ethanol varied.

Assessing the inoculum from dark fermentation using 0.6 V and under different concentrations of VFA it was evident its low electroactive capacity since the current generation was much lower than that reported in the literature (~ 38 mA/m^2), additionally Bio-H_2 was not observed. Therefore leachate compost was used as inoculum, which is known to have a significant electroactive community; in this case two voltages were applied: 0.6 and 1.0 V. From this trial 1.0 V was used because it was the potential to which it was obtained a better response in the hydrogen production (0.0325 m^3/m^3 anolyte-d). Having defined the inoculum, voltage and concentration of the base mixture (compost leachate, 1.0 V and 2.5 g COD/L), four assays of different lactate and ethanol ratios were evaluated, in which COD (1 g/L) remained fixed but the proportions of these substrates varied so that lactate concentration decreased while that of ethanol increased in the mixtures. The results of these tests yielded the following: as the proportion of ethanol increased production of Bio-H_2 in the mixture was adversely affected to an extent that it stopped production altogether. It can be concluded that while certain common components in the fermentation effluent, as the VFA, allow the production of Bio-H_2, others affect its production, as in the case of ethanol. The mixture of these components is inevitable, so it is of scientific and practical interest to assess the extent of the limitations caused by such mixtures in the production of Bio-H_2 in MECs.

CAP. I INTRODUCCIÓN

1.1 Antecedentes

En años recientes el aumento de las actividades humanas tanto domésticas como industriales ha generado un uso desmedido de los combustibles fósiles, lo cual ha traído consigo problemas relacionados a la contaminación ambiental y a la disminución de las reservas energéticas mundiales. Algunos expertos señalan que se alcanzará un pico máximo de producción de combustibles entre los años 2010 y 2020; para presentar posteriormente un declive drástico en los niveles (Vázquez & Quintero, 2004).

Alrededor del mundo existen grupos de científicos dedicados a la investigación de fuentes alternas de energía, dentro de ellas se encuentran la energía eólica, solar, geotérmica, hidroeléctrica y bioenergía (obtenida a partir de la biomasa). De acuerdo a un informe del IPCC (Panel intergubernamental de expertos en el cambio climático) emitido en el 2008, la bioenergía cubría a esa fecha poco más del 10% del suministro mundial (Edenhofer *et al.*, 2011).

Los biocombustibles que actualmente han generado un mayor interés en la sociedad son obtenidos a través de una gran variedad de procesos y empleando en los mismos una amplia variedad de sustratos, dentro de los biocombustibles destaca el biohidrógeno (Bio-H_2) el cual se obtiene a partir de la transformación de la biomasa y presenta diversas ventajas frente a los combustibles fósiles.

De los procesos biológicos para la producción de Bio-H_2 la fermentación oscura es de los sistemas más recurridos, sin embargo recientemente surgió un sistema bioelectroquímico denominado celda de electrólisis microbiana (CEM), a partir de la cual es posible no solo producir Bio-H_2 si no que en el mismo proceso se realiza una remoción de materia orgánica logrando incluso en algunos casos eficiencias de remoción cercanas a los sistemas de digestión anaerobia. Dado que la CEM es un sistema reciente que surge en el año 2005, aún no se tiene bien documentada la respuesta de este tipo de procesos a variaciones en algunos de sus parámetros de operación por lo que varios grupos de investigación trabajan en ello.

1.1.1 Biocombustibles

Los biocombustibles son vectores energéticos que se obtienen a partir de la transformación de la biomasa, se entiende por biomasa toda aquella materia vegetal o animal de origen reciente que se encuentra sobre la superficie de la tierra (Lee & Shah, 2013). La historia de los biocombustibles no es reciente, de acuerdo a algunos autores la biomasa (empleada para la generación de biocombustibles) fue de las primeras fuentes de energía usadas por el hombre, sin embargo, con la explotación masiva de los combustibles fósiles (petróleo, carbón y gas natural) el interés por la obtención de energía a partir de los biocombustibles disminuyó.

De acuerdo a las investigaciones realizadas en los últimos años el uso desmedido de los combustibles fósiles se encuentra dentro de las primeras causas del cambio climático del planeta, en este contexto se vuelve a retomar el interés por los biocombustibles, sobre todo por aquellos que se obtienen a partir de desechos (domésticos, industriales, etc.) y que no generan un impacto negativo al ambiente.

Los biocombustibles suelen clasificarse de acuerdo al estado de la materia y a las tecnologías empleadas en su obtención (Tabla 1), a pesar de algunas limitantes, los biocombustibles como el biodiesel, bioetanol y Bio-H_2 ya son empleados en la industria química y automotriz. Las investigaciones en este sector se encuentran enfocadas en optimizar los procesos de producción para acelerar su obtención y comercialización.

Tabla 1 Clasificación de los biocmombustibles (Masera *et al.,* 2011).

BIOCOMBUSTIBLE	SÓLIDO	LÍQUIDO	GASEOSO
1° Generación	Leña, carbón vegetal, bagazo, pellets	Bioetanol, biodiesel, licor negro	Biogás, gas de síntesis.
2° Generación	Biochar, torrefactos, torpellets	Etanol celulósico, syndiésel, aceite de pirólisis	-
3° Generación	-	Diesel de algas, etanol de algas	Biohidrógeno

1.1.2 Hidrógeno como vector energético

El hidrógeno (H_2) es considerado como una forma de almacenar y transportar energía (vector energético), es decir como una energía secundaria ya que para producirlo se requiere una transformación con base en energías primarias. El gas H_2 presenta dos ventajas importantes respecto a los combustibles fósiles; en primera instancia el H_2 es el combustible con más alta densidad de energía por unidad de masa: 120 MJ/Kg mientras que la gasolina contiene solamente 44 MJ/Kg (Lalaurette *et al.,* 2009), por otro lado reduce las emisiones de gases de efecto invernadero liberados con el uso de combustibles fósiles.

A pesar de las amplias ventajas que presenta el H_2 respecto a otros combustibles existen algunos retos que limitan la transición energética (proceso de cambio en los modelos de producción y utilización de energía): baja producción de H_2, poca infraestructura para su distribución y almacenamiento, y un conocimiento limitado sobre su uso en máquinas de combustión interna (Sun *et al.,* 2012).

El H_2 puede ser producido a partir de diferentes metodologías, los procesos termoquímicos y electroquímicos son hoy en día de los procesos más recurridos por la industria para la generación de H_2, sin embargo, presentan como desventaja el requerir de niveles altos de energía. Por otro lado se encuentran los procesos biológicos los cuales se perfilan como alternativas prometedoras por su mínimo impacto al ambiente (Apuro, 2011).

1.1.3 Sistemas biológicos de producción de Bio-H_2

Los procesos biológicos de producción de Bio-H_2 tienen ventajas sobre otros métodos, por un lado la posibilidad de generar un combustible de forma renovable, así como emisiones menores de dióxido de carbono (CO_2) a la atmósfera debido al uso, en muchos de los casos, de residuos lignocelulósicos (carbono neutro); adicionalmente los procesos de producción biológica de Bio-H_2 requieren de menor energía en comparación con otros. Existen múltiples formas de producción de Bio-H_2 a partir de diversas materias primas utilizando microorganismos, entre

estas alternativas se encuentra la biofotólisis, la fotofermentación y la fermentación oscura (Tabla 2).

Tabla 2 Ventajas y desventajas de los procesos biológicos de producción de Bio-H_2 (Apuro, 2011).

PROCESO	VENTAJAS	DESVENTAJAS
Biofotólisis directa	Puede producir Bio-H_2 directamente a partir de agua y luz solar.	Requiere altas cantidades de luz. El oxígeno (O_2) puede ser peligroso para el sistema. Baja eficiencia fotoquímica
Biofotólisis indirecta	Puede producir Bio-H_2 a partir de agua. Tiene la habilidad de fijar el nitrógeno de la atmosfera.	Las hidrogenasas consumidoras de Bio-H_2 deben ser removidas. El O_2 tiene un efecto inhibidor en la nitrogenasa.
Fotofermentación	Puede utilizar una gama amplia de residuos.	La eficiencia de conversión de luz es muy baja, solo el 1-5%. El O_2 es un fuerte inhibidor de la nitrogenasa.
Fermentación Oscura	Amplia variedad de fuentes de carbono usadas como sustrato. Producción de metabolitos importantes como subproductos. No existe limitación por O_2.	Se alcanzan bajos rendimientos en la producción. A medida que los rendimientos se incrementan, la fermentación de Bio-H_2 es termodinámicamente desfavorable. La mezcla de gas producida contiene CO_2 que debe ser separado.

1.1.4 Fermentación oscura

La fermentación oscura es uno de los procesos biológicos de mayor interés para la producción de Bio-H_2 ya que se lleva a cabo bajo condiciones de temperatura y presión ambiental. Este proceso es complejo puesto que en el intervienen diversos grupos de bacterias que bajo condiciones anaerobias son las encargadas de realizar la conversión de moléculas orgánicas de alto peso molecular a Bio-H_2.

Durante el proceso de fermentación las bacterias oxidan los residuos orgánicos con el objetivo de obtener energía para el mantenimiento celular, de este proceso se liberan electrones que la célula debe disponer para mantener su equilibrio interno para ello emplea protones (H^+) como aceptor final de los electrones, de ésta reducción se obtiene entonces H_2.

El proceso de fermentación se puede efectuar por dos vías: la vía Fd-hidrogenasa y la vía formiato-hidrógeno liasa (Fig. 1). La primera de ellas es llevada a cabo por microorganismos anaerobios estrictos los cuales transfieren los electrones del piruvato al H^+ a través de la forma reducida de la ferredoxina (Fd_{red}), posteriormente los H^+ son reducidos a H_2 por acción de la enzima hidrogenasa. En la segunda vía están implicados microorganismos anaerobios facultativos; en este proceso la enzima formiato-hidrógeno liasa rompe la molécula formiato y a partir de ello se genera H_2 y CO_2 (Lee *et al.,* 2009).

La producción fermentativa de H_2 se ve afectada por diversos factores como el inóculo, sustrato, tipo de reactor, nitrógeno, fosfato, iones metálicos, temperatura y pH (Wang & Wan, 2009), cada uno de estos parámetros ha sido ampliamente estudiado por diversos grupos de investigación. En un proceso ideal en el que sólo se produce acetato e H_2, por cada mol de hexosa se generarían 4 moles de H_2 y 2 moles de acetato, sin embargo, en la práctica algunos de los electrones liberados se emplean para la generación de otros compuestos reducidos (etanol, lactato, propionato, butirato, etc.) lo que disminuye los rendimientos y las tasas de producción (Carrillo, 2013; Argun *et al.,* 2008).

Los metabolitos que se generan a la par de la producción de Bio-H_2 y que para este proceso se consideran residuos pueden adquirir valor al ser utilizados como sustratos en procesos posteriores como la metanogénesis o los sistemas bioelectroquímicos.

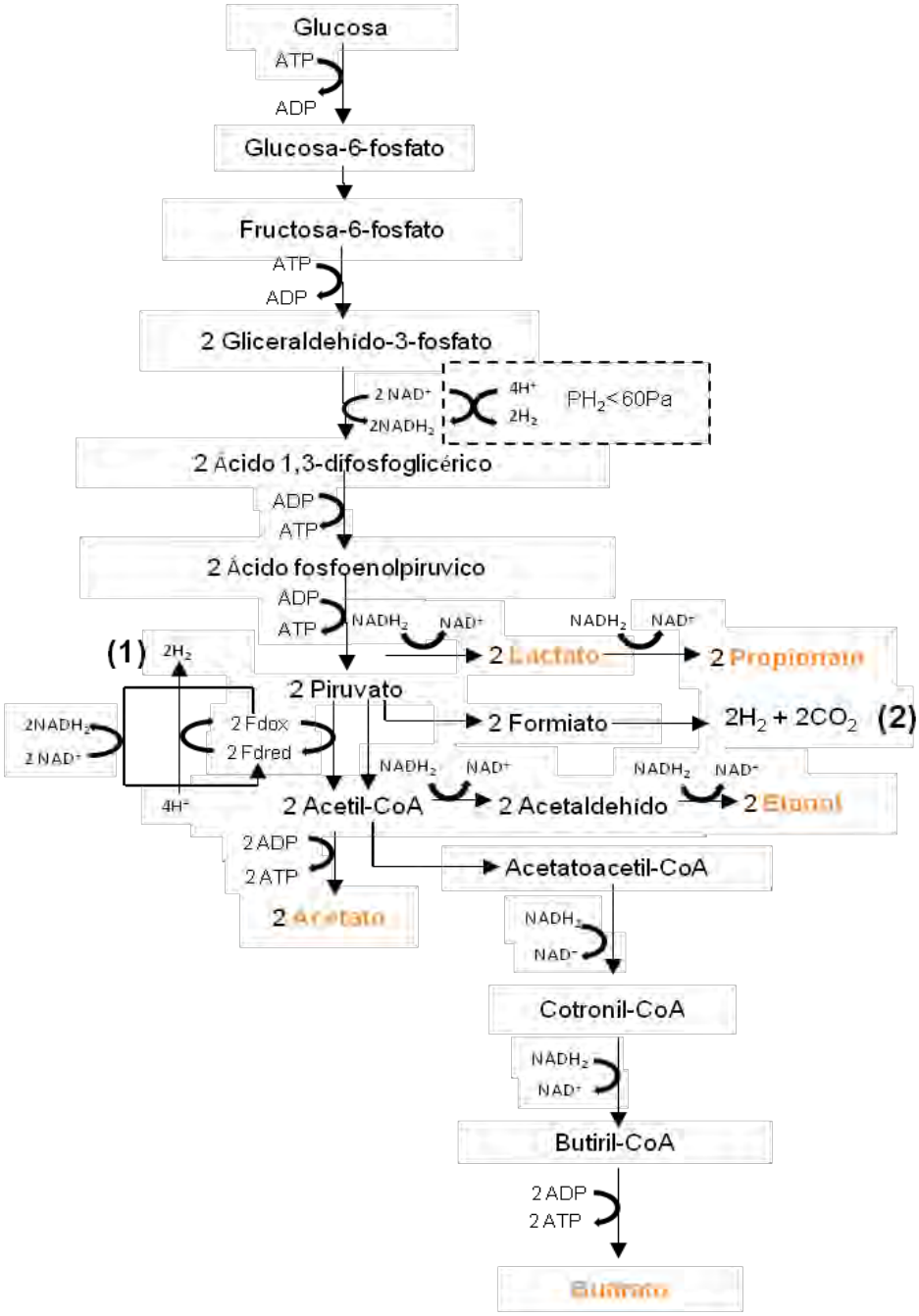

Fig. 1 Rutas metabólicas de la fermentación oscura: vía Fd-hidrogenasa (1), vía formiato-hidrogenoliasa (2). Adaptado de Prescott *et al.,* 2002.

1.1.5 Sistemas híbridos de energía

Los sistemas híbridos se crean a partir del acoplamiento de procesos en los cuales los subproductos de una etapa se convierten en la materia prima de otra

etapa. Las biorefinerias son por lo tanto sistemas acoplados los cuales toman diversos tipos de biomasa para elaborar diferentes productos; todos los productos que se generan tienen valor y no se obtienen desechos finales. Algunos de los pasos del proceso incluyen hidrólisis ácida, fermentación, gasificación, pirólisis, combustión, separación, etc. Dentro de los productos de una biorefinería se puede incluir calor y energía, combustibles líquidos, plásticos, solventes, adhesivos, lubricantes, pinturas, tinturas, detergentes, papel y cartón, etc. (Das *et al.,* 2007).

En el contexto de los sistemas híbridos algunos autores reportan el acoplamiento de la fermentación oscura a procesos como la digestión anaerobia (Cota *et al.,* 2011), la fotofermentación (Uyar *et al.,* 2009), y a los sistemas bioelectroquímicos microbianos (Lalaurette *et al.,* 2009; Teng *et al.,* 2010; Ruíz *et al.,* 2014) para mejorar la eficiencia global de producción de energía (Fig. 2).

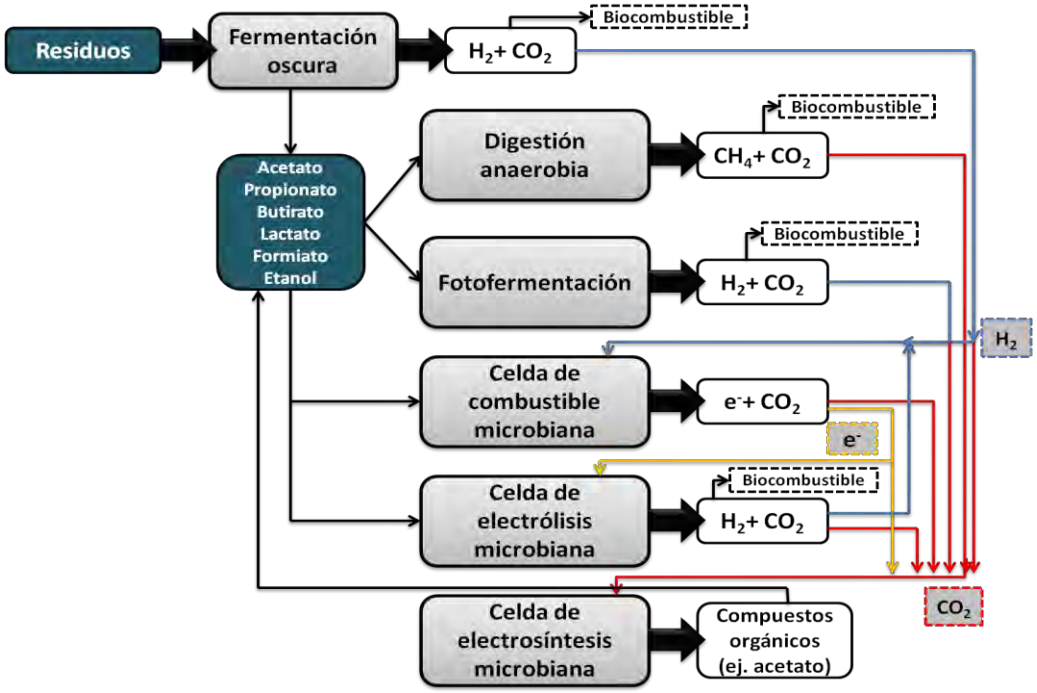

Fig. 2 Acoplamiento de sistemas para la producción de biocombustibles. Adaptado de Rivera, 2014.

1.2 Marco teórico

1.2.1 Sistemas Bioelectroquímicos

Los sistemas bioelectroquímicos (SBE) involucran una corriente farádica como resultado de reacciones electroquímicas que son mediadas por microorganismos. El sistema consiste de dos electrodos (ánodo y cátodo) inmersos en soluciones electrolíticas (anolito y catolito), tales soluciones se encuentran separadas por una membrana. Los SBE pueden ser clasificados cómo celda galvánica cuando las reacciones que ocurren son espontáneas desde el punto de vista termodinámico, o cómo celda electrolítica cuando las reacciones son no espontáneas, y hay que suministrar energía para inducirlas.

La celda galvánica es un dispositivo autoalimentado que produce energía eléctrica a partir de la energía química almacenada en los compuestos, la cual es liberada por medio de reacciones químicas redox. El proceso está limitado por la cantidad de sustancias químicas que contiene, la polaridad del cátodo es positiva, mientras que el ánodo es negativo. Un ejemplo de un dispositivo generador de energía eléctrica es la celda de combustible microbiana (CCM) y las semi-reacciones que ocurren en este sistema al utilizar acetato como sustrato se muestran en las ecuaciones 1 y 2.

Ánodo: $\frac{1}{8} CH_3COO^- + \frac{3}{8} H_2O \rightarrow \frac{1}{8} CO_2 + \frac{1}{8} HCO_3^- + H^+ + e^-$ (Ec. 1)

Cátodo: $\frac{1}{4} O_2 + H^+ + e^- \rightarrow \frac{1}{2} H_2O$ (Ec. 2)

Reacción Global: $CH_3COO^- + 2\ O_2 \rightarrow H_2O + CO_2 + HCO_3^-$ (Ec. 3)

($\Delta Gr° = -848\text{-}98$ kJ/mol)

Por otro lado una celda electrolítica es un sistema que consume energía, es decir, convierte energía eléctrica en energía química, en este caso la polaridad del cátodo es negativa y la del ánodo es positiva, por ejemplo la CEM (Fig. 3), más adelante se abordarán los aspectos que definen a la CEM como un sistema no espontaneo, desde el punto de vista termodinámico.

Los SBE se utilizaron inicialmente para la producción de electricidad, sin embargo, en años recientes se han empleado también para la producción de compuestos de interés como el H_2, metano y etanol (electrosíntesis). La principal ventaja de estos sistemas es llevar a cabo una variedad de procesos simultáneamente (Sobieszuk *et al.,* 2012).

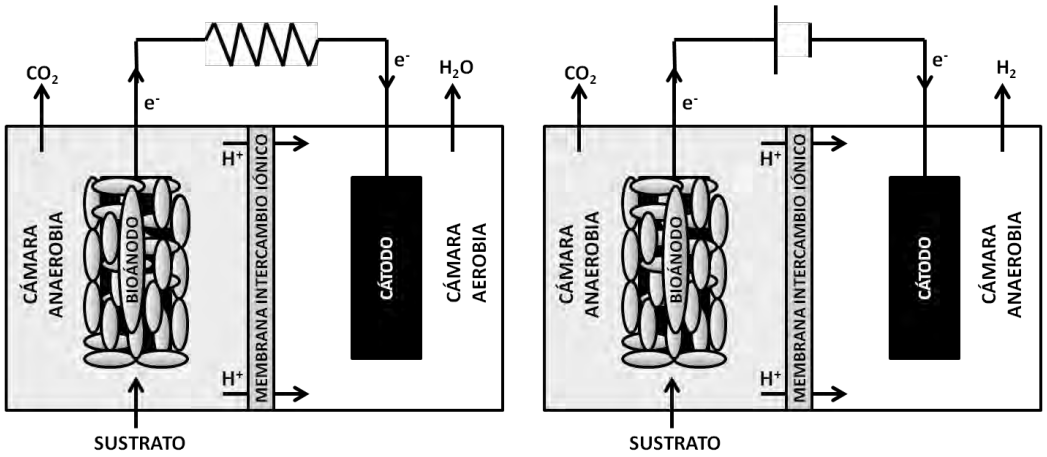

Fig. 3 Diagrama esquemático de una CCM (izquierda) y una CEM (derecha).

1.2.2 Celda de Electrólisis Microbiana

La CEM es una tecnología relativamente nueva pues los primeros reportes surgieron en el año 2005 (Liu *et al.*, 2005; Rozendal *et al.*, 2006). Este sistema es empleado para producir Bio-H_2, para ello microorganismos que se encuentran en la cámara anódica llevan a cabo la oxidación del sustrato a través de su metabolismo, liberando iones H^+ y electrones que se transportan hacia la cámara catódica (Fig. 4).

A diferencia de una CCM donde la transferencia de carga eléctrica ocurre en dirección del ánodo hacia el cátodo debido a que el potencial eléctrico del cátodo es más positivo que el del ánodo, en la CEM para que la corriente eléctrica fluya desde el ánodo hacia el cátodo se requiere una fuerza impulsora que se suministra como un voltaje aplicado entre los dos electrodos, dado que la reacción de reducción de H^+ a H_2 en el cátodo tiene generalmente un potencial de

reducción estándar menor (-0.41 V vs. EHS) que las reacciones de oxidación de los sustratos que se efectúan en el ánodo (por ejemplo para acetato -0.29 V vs. EHS). La cantidad de voltaje aplicado dependerá del sustrato a degradar, pero se ha observado que el Bio-H_2 finalmente proporciona más energía como vector energético que el voltaje necesario para impulsar el sistema.

De acuerdo a la literatura el sustrato por excelencia para estos sistemas es el acetato, puesto que las bacterias electroactivas o bacterias respiradoras del ánodo (BRA) que son las encargadas de llevar a cabo los procesos de transferencia de electrones, degradan fácilmente esta molécula.

Cuando el sistema es operado únicamente con cepas electroactivas la transferencia de los electrones generados durante la oxidación de la materia orgánica no presenta problemas. Sin embargo, cuando el inóculo consiste de una comunidad microbiana más compleja surge uno de los principales retos de este dispositivo: la competencia de las archeas metanogénicas por los electrones liberados y por el Bio-H_2 en caso de que se esté operando una CEM de un compartimento. Las condiciones de operación que se han propuesto para superar estas y otras limitantes del proceso se describen más adelante.

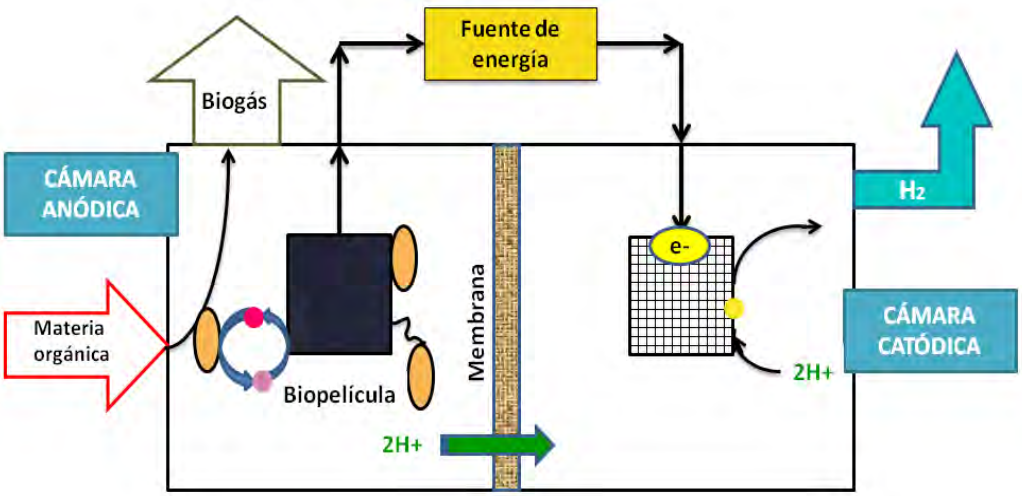

Fig. 4 Componentes de una CEM.

1.2.3 Comunidad microbiana

En la CEM la presencia de microorganismos exoelectrógenos y/o electroactivos es imprescindible ya que ellos son los encargados de transferir los electrones a otro material. Las bacterias electroactivas pueden encontrarse de forma planctónica o conformando una biopelicula, los procesos que se efectúan en torno a la biopelicula son importantes para el sistema puesto que ésta puede mejorar la eficiencia de transferencia de electrones, sin embargo, algunos autores reportan que biopeliculas con un espesor amplio disminuyen la difusión de los sustratos así como de los productos de la reacción (Franks & Nevin, 2010), generando de esta forma problemas de toxicidad por acumulación de moléculas que podrían inhibir el metabolismo celular (Rabaey *et al.,* 2011). Se proponen dos mecanismos de transferencia de electrones (Fig. 5) (Lovley, 2008):

- Directo: a través de los citocromos de la membrana celular y/o pili (estructura celular que se encuentra sobre la superficie de algunas bacterias y que sirve de interconexión entre ellas).
- Indirecto: mediante mediadores redox que pueden ser adicionados al sistema (por ejemplo azul de metileno) o secretados por los microorganismos (por ejemplo riboflavinas).

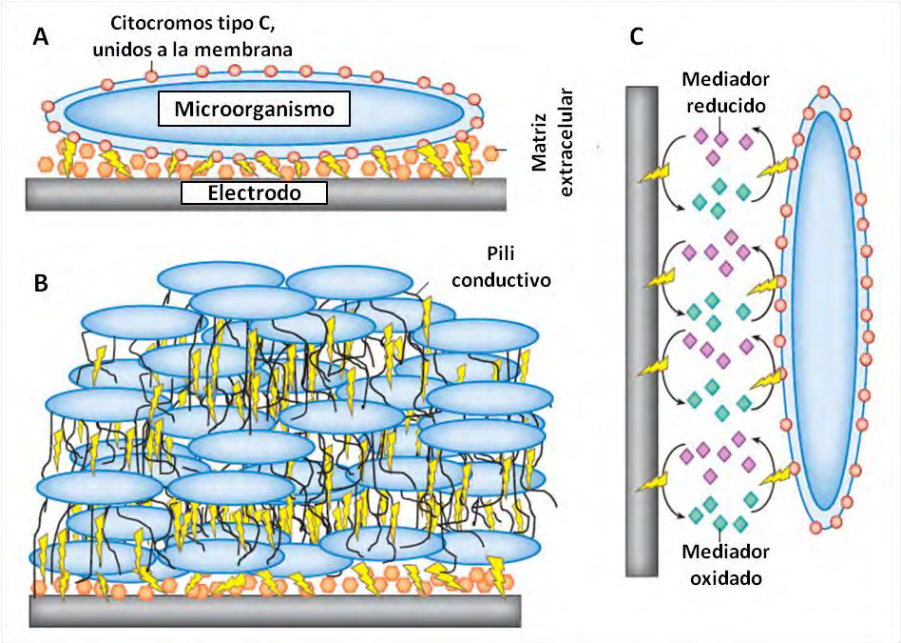

Fig. 5 Esquema de los mecanismos de transferencia de electrones: directo (A y B) e indirecto (C) (Lovley, 2012).

En la literatura la mayoría de los estudios con aplicaciones ambientales reporta el empleo de consorcios microbianos como inóculo, sin embargo, algunos autores como Liu & cols. (2010) han empleado cultivos puros como *G. sulfurreducens, G. metallireducens* y *S. oneidensis* para el estudio de los mecanismos de transferencia de electrones principalmente (Fig. 6).

Como inóculo de estos sistemas se prefiere el uso de cultivos mixtos puesto que éstos utilizan una mayor variedad de sustratos y son más robustos, lo que los hace más adecuados para escalar el proceso, sin embargo, al trabajar con cultivos mixtos suele presentarse un reto importante: la competencia de sustratos por microorganismos no electroactivos como los metanógenos que compiten con los electroactivos por el consumo de acetato para formar metano (CH_4). Con el objetivo de inhibir selectivamente a los metanógenos se han evaluado algunos tratamientos: cambios en la temperatura del sistema, pH del anolito, exposición del ánodo al aire y adición de agentes químicos como el 2-bromoetanosulfonato (Chae *et al.,* 2010).

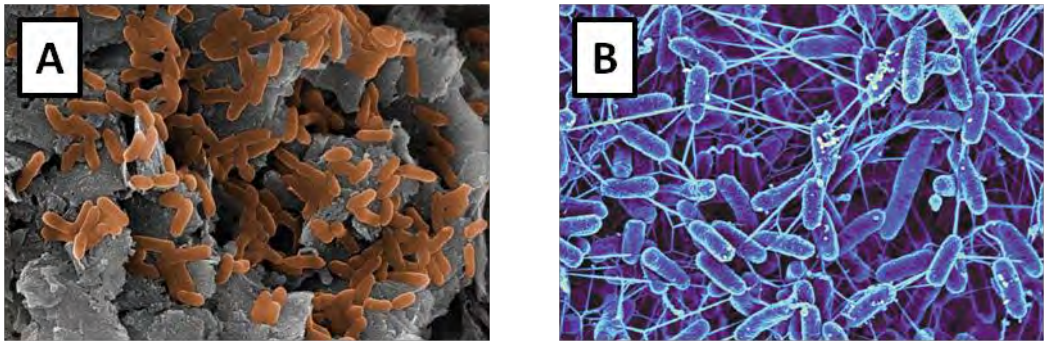

Fig. 6 Microscopía de microorganismos electroactivos. *Geobacter metallireducens* (A) y *Shewanella oneidensis* (B).

Las condiciones de operación del proceso (voltaje aplicado, sustrato, pH, temperatura, etc.) determinarán la estructura de la comunidad microbiana, por lo tanto es deseable conocer las condiciones óptimas de crecimiento de los microorganismos de interés con el objetivo de alinear éstas condiciones a las de operación, para obtener de esta forma un mejor desempeño del dispositivo.

1.2.4 Sustratos

El Bio-H_2 puede ser producido en las CEMs a partir de diferentes sustratos: orgánicos fermentables, no fermentables y aguas residuales (Kadier *et al.,* 2014). Por el tipo de sustratos que emplea esta tecnología, además de producir un biocombustible tiene como ventaja la remoción de materia orgánica de diversos tipos de efluentes, revalorizando los desechos que se generan diariamente. La Tabla 3 muestra algunos de los sustratos más empleados en las CEM, así como la respuesta en producción de Bio-H_2 considerando el voltaje aplicado al sistema.

Tabla 3 Sustratos empleados en la CEM.

SUSTRATO	E_{ap} (V)	Q_{H2} (m^3/m^3-d)	REFERENCIA
Ácido acético	0.6	1.10	Cheng & Logan, 2007
Ácido propiónico		0.72	
Ácido butírico		0.45	
Ácido láctico		1.04	
Acetato	0.5	0.02	Rozendal, 2006
Etanol	-200 mV*	-	Parameswaran *et al.,* 2009
Glucosa	0.9	1.87	Selembo *et al.,* 2009
Celulosa	0.6	0.11	Cheng & Logan, 2007
Efluentes sintéticos lignocelulósicos	0.5	1.11	Lalaurette *et al.,* 2009
Efluentes de fermentación	0.6	1.41	Lu *et al.,* 2009

E_{ap}: Potencial aplicado, Q_{H2}: Velocidad de producción volumétrica de H_2. *Potencial del ánodo vs. Ag/AgCl.

En la Fig. 7 se pueden observar las interacciones que existen entre los microorganismos de una comunidad para el consumo de un sustrato individual, lo cual da una idea de la importancia de los cultivos mixtos cuando se utilizan mezclas de sustratos, ya que un solo tipo de microorganismo no es capaz de realizar todas las reacciones que se requieren en un proceso para transformar los sustratos en corriente (Kiely *et al.,* 2011; Parameswaran *et al.,* 2009; Kadier *et al.,* 2014; Ruíz *et al.,* 2014).

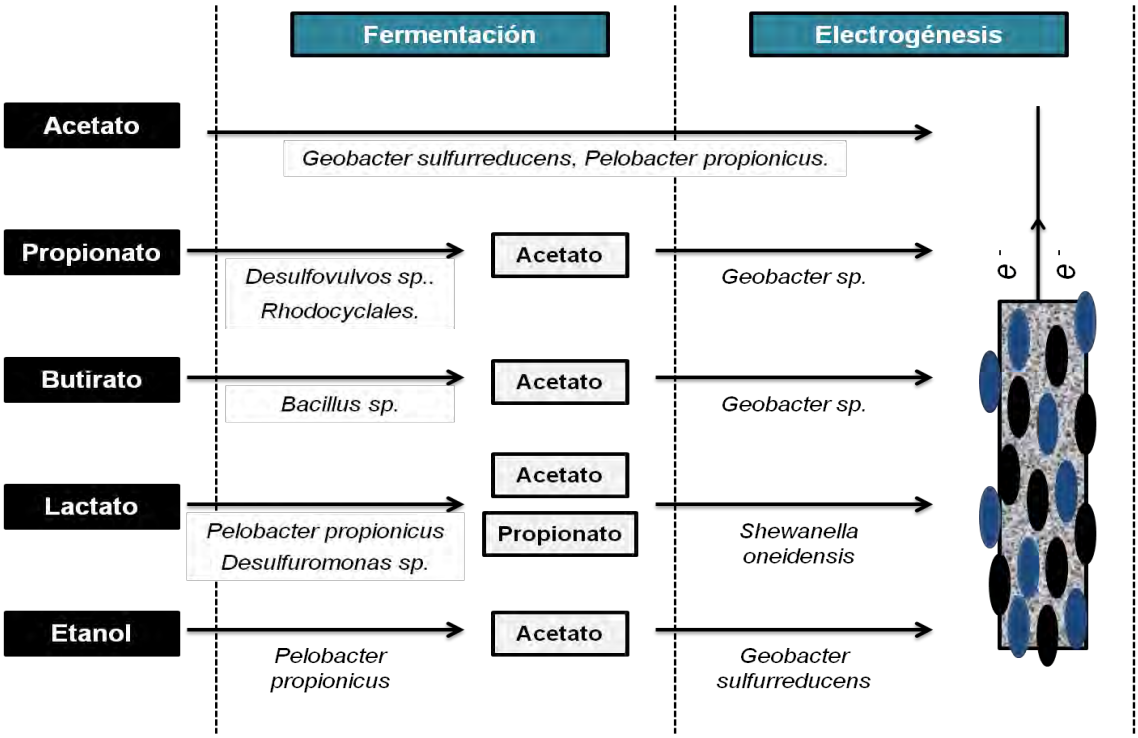

Fig. 7 Interacciones microbianas en el consumo de sustratos en una CEM.

1.2.5 Diseño y operación de una CEM

Los primeros reportes de la literatura datan de celdas en las que se pueden observar dos compartimientos (cámara anódica y catódica), sin embargo, con el paso de los años se han realizado modificaciones a la arquitectura de la celda, dejándola en algunos casos como celdas de una cámara (Cheng & Logan, 2011), o adicionando puertos que se emplean para toma de muestra así como para alimentar al sistema en caso de un proceso en continuo (Logan *et al.,* 2008).

Cada uno de los diseños de celdas usados al momento presenta ciertas ventajas y desventajas; en el caso de las celdas que se conforman de dos cámaras se tiene el inconveniente de que la membrana que divide el sistema crea gradientes de pH que afectan a la comunidad microbiana, aunado a esto la distancia que existe entre los electrodos ofrece una resistencia a la transferencia de masa, y por ende la reacción de formación de H_2 se ve afectada, además de generar una caída óhmica del voltaje impuesto. Adicional a la resistencia mencionada, en el sistema se presentan otro tipo de resistencias, como la resistencia a la transferencia del

electrón de la bacteria al electrodo, las resistencias propias del sistema ocasionan una pérdida de potencial lo cual provoca un aumento del consumo energético del proceso. Por otro lado las celdas de un compartimiento presentan como desventaja que el Bio-H_2 producido se recupera en una mezcla, y en el mejor de los casos dicha mezcla contiene solamente CO_2. Sin embargo, por las condiciones de operación y el tipo de inóculos empleados en estos sistemas, la mezcla de gas suele contener también CH_4, lo cual requiere de la implementación de procesos de purificación del gas, lo cual aumenta los costos del proceso.

Como ya se mencionó anteriormente, para las configuraciones de dos cámaras es necesario emplear una membrana que divida al sistema, las membranas que se han usado al momento son de intercambio catiónico y aniónico con lo cual se limita la transferencia de masa de moléculas de carga específica de una cámara a la otra de acuerdo al tipo de membrana empleada. Las primeras membranas utilizadas fueron de intercambio catiónico tales como Nafion, CMI-7000 y Fumasep FKE, sin embargo, por los gradientes de pH que suelen generarse con este tipo de membranas, es que algunos grupos de investigación han optado por emplear membranas de intercambio aniónico como la AMI-7001, que a pesar de tener como objetivo el intercambio de aniones, permite el paso de los iones H^+ los cuales debido a su tamaño (6×10^{-5} Å) son capaces excepcionalmente de franquear las membranas aniónicas (Liu *et al.*, 2010).

Otra parte esencial del sistema son los electrodos: ánodo (carga positiva) y cátodo (carga negativa). De acuerdo a lo reportado en la literatura, para el ánodo se ha recurrido a materiales a base de carbono, ya que estos presenta una buena conductividad, biocompatibilidad y una gama de morfologías (tela, fieltro, papel, etc.) que facilitan su manejo en el sistema, además de ser de bajo costo. Por otro lado, para el caso del cátodo suelen emplearse materiales a base de platino por su capacidad catalizadora, sin embargo, este material representa una limitante en el escalamiento del proceso, debido al alto costo del metal, por lo que una alternativa es emplear biocatalizadores, tales como electrodos a base de carbono con biopelícula (Rozendal *et al.,* 2007).

La aplicación de voltaje al proceso es indispensable para que la reacción se efectúe, esto se debe a que las reacciones de consumo de los sustratos que generalmente se emplean en estos sistemas no son termodinámicamente favorables cuando la energía libre de Gibbs de las reacciones es alterada por la concentración de hidrógeno presente. El voltaje aplicado al sistema se calcula a partir del sustrato a degradar y generalmente el voltaje aplicado en la práctica suele ser un poco superior puesto que se contemplan pérdidas por las resistencias propias del sistema. Este parámetro es uno de los más relevantes del sistema puesto que debe considerarse que el inóculo se ve afectado por el voltaje aplicado, es decir, mientras que para un consorcio microbiano cierto voltaje puede favorecer el desempeño del sistema, para otro esa misma cantidad de energía puede limitar o inhibir por completo el desarrollo de los microorganismos (Velasco *et al.,* 2011). En la literatura se pueden observar casos en los que se suministra al sistema hasta 1 V, sin embargo, este valor se encuentra aun por debajo del voltaje necesario para efectuar la electrólisis del agua, que es de 1.2 V (Liu *et al.,* 2010), proceso en el cual también se genera H_2.

1.2.6 Evaluación del desempeño de una CEM

Para evaluar el desempeño de la CEM hay una serie de parámetros que se determinan con el fin de verificar el nivel de eficiencia al cual está operando el sistema; dichos parámetros se pueden dividir en fisicoquímicos, biológicos y electroquímicos. Con base en los datos obtenidos de los parámetros de la CEM es posible realizar una serie de cálculos que permiten conocer la recuperación de energía en forma de corriente y de Bio-H_2 respecto al sustrato y biomasa (Logan *et al.,* 2008):

Moles teóricos de H_2 con base en la DQO (n_{th}): Relaciona los moles de H_2 producidos a partir del sustrato consumido, considerando que por cada mol de DQO removida se pueden producir hasta 2 moles de H_2 (Ec. 4).

$$n_{th} = \frac{2\Delta DQO}{PM_{O_2}} \qquad \text{Ec. 4}$$

Donde:
PM_{O_2}: Peso molecular del oxígeno (32 g/mol).

Las moles teóricas de H_2 con base en la corriente (n_{CE}): Moles de H_2 que pueden ser recuperados con base en la corriente obtenida, considerando que se requieren dos electrones para obtener un mol de H_2 (Ec. 5).

$$n_{CE} = \frac{\int_{t=0}^{t} I\, dt}{2F} \qquad \text{Ec. 5}$$

Donde:
dt (s): Intervalo en que los datos de la corriente son medidos.
F: Constante de Faraday (96485 C/mol e^-).

Moles de H_2 producidos experimentalmente (n_{exp}): Moles de H_2 recuperados en el cátodo y calculados a partir del volumen de agua desplazado en la bureta (Ec. 6).

$$n_{exp} = \frac{PV}{RT} \qquad \text{Ec. 6}$$

Donde:
P: Presión (0.81 atm).
V: Volumen de Bio-H_2 producido.
R: Constante de los gases ideales (0.08206 L atm/mol K).
T: Temperatura del sistema (K).

Eficiencia coulómbica (C_E): relación entre los moles de H_2 obtenidos a partir de la corriente producida y los moles calculados a partir del consumo de DQO (Ec. 7).

$$C_E = \frac{n_{CE}}{n_{th}} \qquad \text{Ec. 7}$$

Recuperación catódica de H_2 (r_{cat}): relaciona los moles de H_2 recuperados en el cátodo (moles experimentales) con los moles que teóricamente podrían ser obtenidos con base en la corriente producida (Ec. 8).

$$r_{CAT} = \frac{n_{exp}}{n_{CE}} \qquad \text{Ec. 8}$$

Recuperación total de H_2 (r_{H2}): relaciona los moles de H_2 obtenidos experimentalmente respecto a los moles producidos a partir de la DQO removida (Ec. 9).

$$r_{H2} = C_E * r_{CAT} \qquad \text{Ec. 9}$$

Carga teórica (Q_t): cantidad de electrones de acuerdo a la concentración del substrato consumido que pueden ser transferidos hacia el electrodo y atravesar el circuito externo desde el ánodo hacia el cátodo.

Acetato:

$CH_3COO^- + 3H_2O \rightarrow CO_2 + HCO_3^- + 8H^+ + \mathbf{8e^-}$

Propionato:

$CH_3CH_2COO^- + 5H_2O \rightarrow 2CO_2 + HCO_3^- + 14H^+ + \mathbf{14e^-}$

Butirato:

$CH_3CH_2CH_2COO^- + 7H_2O \rightarrow 3CO_2 + HCO_3^- + 20H^+ + \mathbf{20e^-}$

Lactato:

$CH_3CHOHCOO^- + 4H_2O \rightarrow 2CO_2 + HCO_3^- + 12H^+ + \mathbf{12e^-}$

Etanol:

$CH_3CH_2OH + 3H_2O \rightarrow 2CO_2 + 12H^+ + \mathbf{12e^-}$

Carga experimental (Q_e): cantidad de electrones que efectivamente fueron transferidos y es cuantificada como la corriente cronoamperométrica.

$$Q_e = \int_{t=0}^{t} I\, dt$$

Para evaluar el sistema se puede calcular la tasa de producción de H_2, así como la densidad de corriente, los cuales están estrechamente relacionados con sustrato, inóculo y potencial impuesto. Dichos resultados permitirán comparar entre sistemas y definir así las mejores condiciones de operación para cada caso específico.

1.2.7 Bases electroquímicas de la CEM

En los sistemas bioelectroquímicos como la CEM el cálculo de la energía mínima que debe suministrarse en el proceso para que las reacciones se efectúen es un punto importante. El voltaje aplicado está en función del sustrato con el que se opera la celda, por lo tanto la energía extra que se adiciona al sistema será diferente para sistemas con sustratos individuales o con una mezcla de ellos.
Para que una reacción ocurra espontáneamente, la energía libre de Gibbs de la reacción (ΔGr°) debe ser negativa, como ejemplo para el caso de acetato bajo condiciones biológicas estándar (T= 25°C, P= 1 bar, pH= 7) la ΔGr° para la oxidación de acetato a Bio-H_2 es:

$$CH_3COO^- + 4H_2O \longrightarrow 2HCO_3^- + H^+ + 4H_2 \qquad \text{Ec. 10}$$

(ΔGr°= +104.6 kJ/mol)

Dado que la reacción tiene un ΔGr° positivo el acetato no puede naturalmente ser oxidado a Bio-H_2, por lo tanto la aplicación de energía adicional es necesaria para sobrepasar este límite termodinámico en la formación de hidrógeno. Para dirigir el proceso de la celda de electrólisis microbiana es necesario aplicar cierto potencial de equilibrio (E_{eq}) el cual variará de acuerdo a la materia que se desee oxidar;

siguiendo con el caso del acetato bajo condiciones biológicas estándar el E_{eq} se calcula de la siguiente manera:

$$E_{eq} = -\frac{\Delta G_r^{\circ}}{nF} = -\frac{104.6\ x\ 10^3 \frac{J}{mol}}{8\ e^- \ x\ 96485 \frac{C}{mol\ e^-}} = -0.14\ V \qquad \text{Ec. 11}$$

Donde *n* es el número de electrones involucrados en la reacción. En el E_{eq} no se observa una corriente eléctrica neta, por lo tanto se aplica un voltaje tal que permita desplazar el potencial del electrodo desde el valor del equilibrio (-0.14 V vs. EHS) a otro, en donde es posible cuantificar una corriente eléctrica.

El E_{eq} también puede ser calculado a partir de los potenciales teóricos del cátodo (E_{cat}) y ánodo (E_{an}) como se observa en la Ec. 9, para ello es necesario conocer las semi-reacciones que se efectúan en la cámara anódica y catódica, ya que a partir de estas y de la ecuación de Nernst se puede calcular E_{an} y E_{cat} (Ec. 14 y 17).

$$E_{eq} = E_{cat} - E_{an} \qquad \text{Ec. 12}$$

$$CH_3COO^- + 4H_2O \longrightarrow 2HCO_3^- + 9H^+ + 8e^- \qquad \text{Ec. 13}$$

$$E_{an} = E_{an} - \frac{RT}{8F} \ln\left(\frac{|CH_3COO^-|}{|HCO_3^-|^2 |H^+|^9}\right) \qquad \text{Ec. 14}$$

$$E_{an} = 0.187\ V - \frac{\left(8.314 \frac{J}{K\ mol}\right)(298.15\ K)}{(8)\left(96485\ \frac{C}{mol\ e^-}\right)} \ln\left(\frac{|1|}{|1|^2 |1x10^{-7}|^9}\right) = -0.279\ V \qquad \text{Ec. 15}$$

$$2H^+ + 2e^- \longrightarrow H_2 \qquad \text{Ec. 16}$$

$$E_{cat} = -\frac{RT}{2F} \ln\left(\frac{\rho_{H_2}}{|H^+|^2}\right) \qquad \text{Ec. 17}$$

$$E_{cat} = -\frac{\left(8.314\frac{J}{K\,mol}\right)(298.15\,K)}{2\left(96485\,\frac{C}{mol\,e^{-}}\right)}\ln\left(\frac{1}{|1x10^{-7}|^{2}}\right) = -0.414\,V \quad \text{Ec. 18}$$

$$E_{eq} = (-0.414\ V) - (-0.279\ V) = -0.14\ V \quad \text{Ec. 19}$$

1.2.8 Estado del arte de la CEM

A una década del primer reporte de una CEM y de acuerdo a lo que se encuentra reportado en la literatura, la investigación en estos dispositivos ha tomado direcciones distintas, sin embargo, todos los estudios se encuentran dirigidos hacia la optimización de cada uno de los parámetros de este dispositivo (sustrato, inóculo, voltaje aplicado, material de electrodos y membrana, etc.); con el objetivo final de obtener un sistema cuyo rendimiento permita escalar el proceso a un mayor nivel, para hacer de ésta una tecnología más atractiva. En un estudio publicado por Li & cols. (2013) se analizan los artículos y patentes desarrollados sobre las CEMs a la fecha, a partir de esto los autores señalan cuatro rutas en las que se ha orientado la investigación en las CEMs: modificación de electrodos, producción de Bio-H_2, aplicaciones futuras del sistema y energía de entrada.

Algunos de los parámetros mencionados anteriormente así como las respuestas del sistema reportadas para diferentes casos se enlistan en la Tabla 4 y se discutirán a continuación.

Los primeros reportes de CEMs fueron realizados en sistemas en lote y empleando membranas de intercambio para separar los procesos que ocurrían en el ánodo y cátodo, sin embargo, con el paso del tiempo se han realizado modificaciones al modo de operación de la celda así como a su configuración, obteniendo con ello buenos resultados, tales como los reportados por Cheng & cols. (2011) quienes operaron un sistema en lote de una cámara con una buena respuesta en producción de Bio-H_2 y densidad de corriente (Tabla 4).

El pH de operación es un parámetro muy importante en este tipo de sistemas, los cambios efectuados en éste inciden directa e indirectamente en la comunidad microbiana así como en la respuesta del sistema a la producción de energía. La

mayor parte de los trabajos con celdas reportan valores de pH neutro, sin embargo, Hu & cols. (2008) probaron un sistema a pH 5.8 con el objetivo de evaluar si los metanógenos podían ser inhibidos sin afectar a la comunidad electroactiva; contrario a lo que se pensaba, los resultados indicaron que aun a pH 5.8 la formación de gas metano en el espacio de cabeza era muy similar a la obtenida en sus ensayos a pH neutro.

Considerando lo anterior podría decirse que los cambios en pH no afectaron demasiado a la comunidad metanogénica, sin embargo, pudieron si afectar a la comunidad electroactiva. En tal sentido, Lu & cols. (2009) emplearon un efluente de una fermentación tipo etanol, y evaluaron dos sistemas: una celda se operó con el efluente sin un amortiguador para el cambio de pH, mientras que a la otra se le adicionó un amortiguador, los cambios de pH fueron considerables para la primer celda descendiendo a valores de 4.5, reduciendo también la producción de Bio-H_2 de 1.41 a 0.0372 m^3 H_2/m^3 anolito-d.

Adicional al pH, el voltaje aplicado es otro parámetro muy importante del sistema, como ya anteriormente se mencionó, la energía que debe aplicarse al sistema para favorecer las reacciones está en función del tipo de sustratos utilizados así como de las condiciones de temperatura. El voltaje aplicado también afectará en la respuesta de la densidad de corriente, generalmente la tendencia indica que a mayor potencial mayor producción de densidad de corriente. En efecto, algunos autores que han empleado 1 V vs. Ag/AgCl han obtenido respuestas en densidad de corriente en el intervalo de 3 a 105 A/m^2 (Jia *et al.,* 2010; Cheng *et al.,* 2011).

Como se mencionó anteriormente una de las rutas de investigación de las CEMs son las futuras aplicaciones del sistema, en este sentido es que algunos estudios (Lu *et al.,* 2009; Lalaurette *et al.,* 2009; Ruíz *et al.,* 2014) evalúan efluentes reales y sintéticos de otros procesos con el objetivo de emplearlos como sustratos para la CEM y de esta manera favorecer el escalamiento del proceso minimizando los costos de operación. Los efluentes que han sido probados en las celdas provienen en su mayoría de procesos de fermentación oscura, sin embargo, a la fecha se ha evaluado la respuesta de las CEMs considerando solo algunos subproductos de estos procesos (acetato, propionato, butirato, etc.) y poco se sabe sobre la

respuesta que se tendría al suministrar otros metabolitos (lactato, etanol, formiato, etc.) que también suelen obtenerse en los efluentes de fermentación oscura.

Finalmente, la producción de Bio-H_2 es otra de las rutas de investigación de estos sistemas, por lo cual cada una de las modificaciones que se realiza a la CEM se hace considerando como se verán reflejados esos cambios en la formación de Bio-H_2. A la fecha el mejor desempeño ha sido obtenido utilizando acetato como sustrato, con una velocidad de producción volumétrica de hidrógeno de 50 m^3/m^3 anolito-d obtenidos en una CEM de dos cámaras con flujo continuo y un voltaje aplicado de 1 V (Jeremiasse *et al.,* 2010).

Tabla 4 Parámetros de operación y desempeño de CEMs.

Inóculo	Sustrato	pH	T (°C)	Vol (L)	V_{ap}	Desempeño			Referencia
						Q_{H2} (m^3/m^3-d)	J (A/m^2)	Y_{H2} (%)	
AR industria papel	Acetato	7	25	6.6	0.5	0.02	0.47	53	**Rozendal *et al.*, 2006**
ARD	ARD	7.1	30	0.58	0.5	0.01	0.35	8	**Ditzig *et al.*, 2007**
ARD	Acetato	NR	30	0.028	0.8	3.12	0.037	93	**Call *et al.*, 2008**
ARD	Acetato	5.8	30	0.25	0.6	0.69	14	64	**Hu *et al.*, 2008**
G. sulfurreducens	Acetato	6.8	NR	0.018	0.7	1.9	4.11	NR	**Call *et al.*, 2009**
AR sintética	Acetato	7	NR	0.72	1.0	0.095	3.19	21.2	**Jia *et al.*, 2010**
ARD	Acetato	NR	30	0.02	1.0	17.8	104.5	NR	**Cheng *et al.*, 2011**
Efluente de clarificador primario de PTAR	Efluente CSTR FA	6.7	25	0.026	0.6	1.41	135*	NR	**Lu *et al.*, 2009**
Efluente de clarificador primario de PTAR	ESF	7.0	NR	0.028	0.5	1.11	NR	82	**Lalaurette *et al.*, 2009**
AR municipal de PTAR	Mezclas de ácido acético y propionico	7.0	20	0.45	0.6	0.265	2.35	NR	**Ruíz *et al.*, 2014**
Efluente de una CEM	Acetato	7.0	30	0.02	1.0	50	22.8	NR	**Jeremiasse *et al.*, 2010**

V_{ap}: Voltaje aplicado, Q_{H2}: Tasa de producción de H_2, J: Densidad de corriente respecto al electrodo, Y_{H2}: Rendimiento de producción de H_2, AR: Agua residual, ARD: Agua residual doméstica, PTAR: Planta de tratamiento de aguas residuales, CSTR: Reactor continuo de tanque agitado, FA: Fermentación alcohólica, ESF: Efluentes sintéticos de fermentación, NR: No reportado, *: Densidad de corriente reportada en A/m^3.

1.3 Justificación

En la búsqueda de alternativas renovables que contribuyan a satisfacer la demanda energética mundial, surgen las CEMs como dispositivos atractivos para su empleo dada la capacidad de producir hidrógeno, cuyo vector energético presenta ventajas importantes respecto a los combustibles fósiles. Las CEMs pueden emplear una gran variedad de sustratos, lo que representa una ventaja del sistema; en este sentido resulta interesante acoplar los efluentes de fermentación oscura (otro sistema biológico productor de H_2) como sustratos para la CEM, para de esta forma incrementar la producción global de Bio-H_2, además de remover la materia orgánica presente en los efluentes.

Considerando que los efluentes de los reactores productores de Bio-H_2 suelen variar en composición de acuerdo al tipo de operación, es necesario evaluar el comportamiento que una CEM tendría con este tipo de sustratos, en específico con la variación de metabolitos como lactato y etanol que no siempre están presentes en este tipo de efluentes, pero que en caso de estarlo podrían modificar completamente el desempeño del sistema.

1.4 Hipótesis

La composición de las mezclas definidas de AGVs, lactato y etanol afectará tanto la producción de Bio-H_2 como la generación de corriente y se espera que en las mezclas con una mayor concentración de lactato respecto al etanol se obtengan mayores rendimientos.

1.5 Objetivos

1.5.1 General

Evaluar el efecto de la variación de la fracción de etanol y lactato en una mezcla definida de acetato, propionato y butirato, para la producción de Bio-H_2 en CEMs.

1.5.2 Específicos

- Evaluar el efluente de un reactor fermentativo productor de Bio-H_2 como inóculo para una CEM.

- Determinar la composición de la mezcla inicial de AGVs (acetato, propionato y butirato) para establecer la línea base de sustrato para cada ensayo.

- Evaluar el efecto que pueden tener los componentes de la fermentación oscura, etanol y lactato, en una CEM.

CAP. II MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Fuente de inóculo

Para llevar a cabo los ensayos, la comunidad microbiana se obtuvo a partir de dos inóculos, los cuales se describen a continuación:

- Efluente de un reactor fermentativo: Se recolectó el efluente de un reactor CSTR productor de Bio-H_2, el cual fue alimentado con suero de leche e inoculado con 4.5 g de sólidos suspendidos volátiles (SSV)/L de lodo granular disgregado proveniente de un reactor UASB a escala industrial que trata el agua residual de una industria confitera en el estado de San Luís Potosí, México; las condiciones de operación del reactor fueron las siguientes: 37°C, TRH: 8 h, pH 5.5. La cosecha de la biomasa se realizó durante las etapas estables del proceso, el efluente recolectado del reactor CSTR se concentró hasta obtener 4.5 g de SSV/L para inocular las celdas.

  Lixiviados de composta: Los lixiviados se obtuvieron a partir de composta comercial la cual es previamente aclimatada para incrementar la biomasa microbiana del medio y favorecer la selección de microorganismos electroactivos.
- Para obtener los lixiviados se realizó una mezcla de 600 mL de agua desionizada, 200 mL de composta comercial (Humus de lombriz, Rancho los molinos), 60 mM de KCl y 20 mM de $C_2H_3NaO_2 \cdot 3H_2O$. La mezcla se dejó en agitación durante 12 hrs. Al finalizar el tiempo de aclimatación, la mezcla se centrifugó durante 2 min a 1000 rpm, para de estar forma obtener el sobrenadante que fungió como inóculo en los ensayos y del cual se adicionó a la cámara anódica 110 mL.

2.2 Anolito

La composición del anolito (cámara anódica) varió de acuerdo a cada uno de los dos inóculos empleados. Para los ensayos que se operaron con el inóculo del reactor fermentativo el anolito estuvo constituido por un medio de nutrientes reportado por Teng *et al.,* 2010 (en 1 L de buffer de fosfatos): NH_4Cl, 310 mg; KCl, 130 mg; $CaCl_2$, 10 mg; $MgCl_2 \cdot 6H_2O$, 20 mg; NaCl, 2 mg; $FeCl_2$, 5 mg; $CoCl_2 \cdot 2H_2O$, 1 mg; $MnCl_2 \cdot 4H_2O$, 1 mg; $AlCl_3$, 0.5 mg; $(NH_4)_6Mo_7O_{24}$, 3 mg; H_3BO_3, 1 mg; $NiCl_2 \cdot 6H_2O$, 0.1 mg; $CuSO_4 \cdot 5H_2O$, 1 mg; $ZnCl_2$, 1 mg.

Respecto a los ensayos inoculados con lixiviados de composta la cámara anódica no tuvo un medio de nutrientes, por lo que el anolito fue conformado únicamente por el inóculo.

Adicional a los inóculos y al medio de nutrientes la cámara anódica tuvo una mezcla de AGVs (acetato, propionato y butirato a 2500 mg DQO/L, en proporción 0.26:0.25:0.49) que una vez evaluada fungió como la línea base (CEM CTRL) para las diferentes concentraciones de lactato y etanol que se probaron. La proporción de la mezcla de AGVs se fijó con base en la concentración promedio de AGVs de efluentes de diferentes reactores fermentativos como se observa en la Tabla 5; para establecer la proporción un total de 10 estudios fueron considerados.

Utilizando también como inóculo lixiviados de composta se montó una celda con acetato como único sustrato a una concentración de 2500 mg DQO/L (CEM ACETATO).

Tabla 5 Concentración de AGVs en efluentes de reactores fermentativos.

Referencia	Acetato g DQO/L	Propionato g DQO/L	Butirato g DQO/L
Dávila *et al.*, 2008	3.86	0.22	9.34
Cota *et al.*, 2009	5.35	6.00	20.88
Dávila *et al.*, 2009	6.69	9.75	18.27
Dávila *et al.*, 2011	2.45	5.12	8.78
Arriaga *et al.*, 2011	0.56	1.38	0.65
Carrillo *et al.*, 2012	2.41	0.18	8.84
	2.74	0.93	7.36
Arreola *et al.*, 2013	1.82	2.10	0.26
Carrillo *et al.*, 2014	2.25	3.89	2.96
Arreola *et al.*, 2014	0.64	0.50	0.70
Carrillo *et al.*, 2014	1.61	0.44	2.58

Para definir las mezclas lactato-etanol (Tabla 6), se determinó un máximo y un mínimo de las concentraciones obtenidas en el efluente de un reactor fermentativo operado en los laboratorios de la División de Ciencias Ambientales de IPICYT; a partir de éstos se definieron dos puntos intermedios dando un total de cuatro ensayos (CEM M1 a M4).

Tabla 6 Composición de las mezclas (g DQO/L).

Ensayo	Lactato	Etanol
CEM M1	0.4377	0.5623
CEM M2	0.3326	0.6674
CEM M3	0.2548	0.7452
CEM M4	0.1950	0.8050

2.3 Catolito

El catolito en la CEM estuvo conformado de un buffer de fosfatos (pH, 7.0, 0.5 M) el cual se preparó a partir de los siguientes reactivos (g/L): 4.33 Na_2HPO_4, 2.69 NaH_2PO_4 y 2.85 KCl.

2.4 Estrategia experimental

La Fig. 8 muestra los ensayos efectuados así como las condiciones de operación de cada uno de los sistemas. Como primera etapa se evaluó el inóculo procedente de la fermentación oscura, para ello se fijo un voltaje de 0.6 V mientras que la concentración de la mezcla base de sustratos (acetato, propionato y butirato) varió de 150 a 2500 mg DQO/L. En la segunda etapa se evaluó la biopelícula preformada sobre los electrodos de dos de los ensayos previos (500 y 2500 mg DQO/L) en estos casos se aplicó también un voltaje de 0.6 V, sin embargo, a diferencia de los ensayos de la primer etapa en éstos no se operó con microorganismos planctónicos. Una vez concluidas las primeras dos etapas se procedió a evaluar el inóculo obtenido de lixiviados de composta a dos diferentes voltajes 0.6 V y 1.0 V, en esta ocasión se dejó fija la concentración de la mezcla base de sustratos (2500 mg DQO/L). Como cuarta etapa se realizaron los cuatro ensayos en los cuales se evaluaron las mezclas de lactato y etanol, en estos ensayos las condiciones de operación fueron las siguientes: como inóculo se usó el lixiviado de composta, el voltaje impuesto fue de 1.0 V y la mezcla base de sustratos (acetato, propionato y butirato) fue de 2500 mg DQO/L. Finalmente para comparar la respuesta del sistema al variar la diversidad de sustratos adicionados a la celda se montó un ensayo alimentado solamente con acetato, dicho ensayo se inóculo con lixiviados de composta y se aplicó 1.0 V.

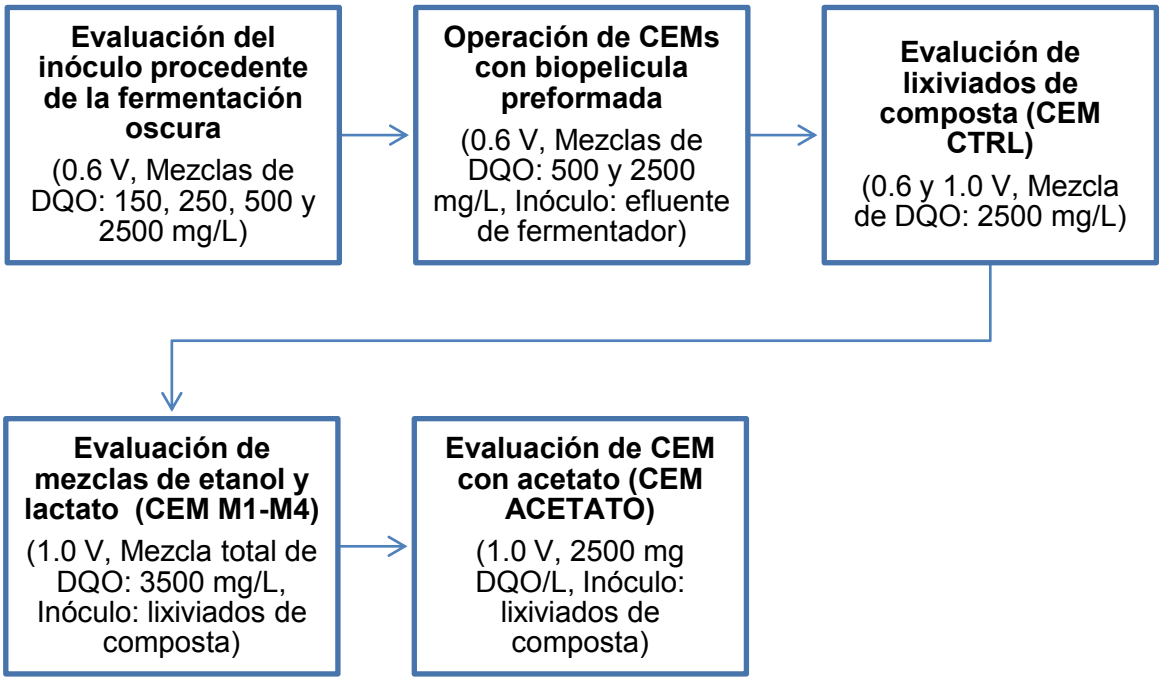

Fig. 8 Estrategia experimental.

2.5 Diseño de CEM y electrodos

Como se muestra en la Fig. 9 los ensayos se realizaron en celdas tipo H constituidas por dos cámaras de vidrio (volumen total por cámara: 170 mL, volumen de operación: 110 mL), separadas por una membrana de intercambio catiónico marca ULTREX CMI – 7000 (Membranas International Inc. New Jersey, EUA) que permite el paso de iones H^+ al cátodo. Con el objetivo de aclimatar la membrana, ésta se rehidrató con el catolito durante 24 horas previas al arranque experimental.

Para la operación de los sistemas se emplearon dos electrodos de diferentes materiales, las características de los mismos se describen a continuación:

- Cátodo: compuesto por una malla de platino (Alfa Aesar, Massachusetts, EUA) con un área proyectada de 4 cm^2.
- Ánodo: conformado por fieltro de carbono (Grupo Rooe, Estado de México, México) con un área proyectada de 4 cm^2 y un espesor de 0.5 cm.

La distancia entre ambos electrodos es de aproximadamente 10 cm y las conexiones al circuito externo se hicieron con alambre de titano (0.8 mm diámetro, Alfa Aesar, Massachusetts, EUA).

Fig. 9 Celda de electrólisis microbiana empleada; cámara anódica (izquierda) y cámara catódica (derecha).

2.6 Condiciones de operación

La CEM se operó como un sistema en lote sumergida en un baño térmico a 35 °C y conectado a un potenciostato (BioLogic Science Instrument, EC-Lab Version 10.12 software, Francia), el cual suministró un voltaje constante de 0.6 V y 1.0 V.

Para evaluar las mezclas la cámara catódica y anódica de la CEM contuvieron 110 mL del catolito y anolito respectivamente, ambas cámaras fueron burbujeadas con gas N_2 durante 10 minutos para remover el O_2 presente ya que éste compite con el electrodo por la captura de electrones.

Para cada mezcla se realizaron controles de CEM 1) en ausencia de inóculo y sustrato, para descartar la producción de H_2 por electrohidrólisis de biomasa y/o sustrato; 2) sin aplicación de voltaje, para determinar la producción de H_2 por microorganismos no electroactivos; 3) celda con medio nutritivo, para descartar la electrólisis ~~hidrólisis~~ del agua debido a los voltajes aplicados. Las CEMs se mantuvieron en operación por un periodo aproximado de 8 días para el caso del

inóculo del fermentador, mientras que las CEMs inoculadas con lixiviados de composta operaron durante 28 días aproximadamente. El volumen de gas de cada cámara se midió diariamente, la composición de los gases fue analizada usando un cromatógrafo de gases. Al inicio y término de operación de cada celda se tomaron muestras para medir pH, DQO, SSV y consumo de sustratos.

2.7 Métodos de análisis

2.7.1 Técnicas analíticas

El seguimiento del Bio-H_2 producido en la cámara catódica así como del biogás en la cámara anódica se efectuó durante el transcurso del ensayo mediante un cromatógrafo de gases (GC, 6890N Network GC System, Agilent Technologies, Waldbronn, Alemania) provisto de un detector de conductividad térmica y una columna empacada Hayesep D (Alltech, Deerfield, Illinois, EUA) con las siguientes dimensiones 10´ x 1/8´´ x 0.085´´. Las condiciones de operación del cromatógrafo fueron las siguientes: Temperatura del inyector 250°C, temperatura de detector 250°C, temperatura de columna 60°C, el volumen de inyección 500 µL, nitrógeno como gas de arrastre a un flujo de 12 mL/min, tiempo de análisis 13 min (Dávila-Vazquez *et al*., 2008).

Adicionalmente el volumen diario de Bio-H_2 y biogás producido se midió a través del método de desplazamiento de agua (Dávila-Vazquez *et al*., 2008).

Al inicio y término de cada ensayo se determinó el pH de ambas cámaras empleando un potenciómetro (Thermo Electron Corporation, Orion Star, EUA), la DQO soluble se analizó tomando como referencia el Standard Methods for Examination of Water and Wastewater (APHA, 1998) con un digestor (Bioscience, Inc. COD reactor), realizando las lecturas con un espectrofotómetro (Thermo Spectronic Aquamate).

Se efectuó la cuantificación de AGVs por comparación con estándares de alta pureza mediante un sistema de electroforesis capilar (Agilent 1600A, Waldbronn, Alemania) usado con un buffer básico de aniones (Agilent, pH = 12.1) y una

columna capilar de sílice fundida (Agilent, id = 50 µm, L = 80.5 cm, Largo efectivo = 72 cm), la temperatura y voltaje aplicados en el análisis de electroforesis capilar fue de 20 °C y -30 kV, respectivamente (Dávila *et al.,* 2008). Para la cuantificación de etanol se empleó un cromatógrafo de gases (GC, 6890N Network GC System, Agilent Technologies, Wilmington, DE) provisto de un detector de ionización de flama y de una columna capilar HP-Innowax (30 m × 0.25 mm id, espesor de la película 0.25 µm, (Agilent technologies, Wilmington, DE). Las condiciones de operación del cromatógrafo fueron las siguientes: temperatura del inyector 220 °C, temperatura del detector 250 °C, el volumen de inyección 1 µL, helio como gas de arrastre a un flujo de 1.5 mL/min. La determinación de SSV se realizó de acuerdo a la técnica estándar (APHA, 1998) empleando para ello una mufla (Thermolyne 1400 Furnace).

Una muestra del bioánodo, el cual se fijó en glutaraldehido al 2%, se almacenó al finalizar cada ensayo para posteriormente efectuar 2 lavados de 5 minutos c/u con soluciones de etanol al 30, 50, 70, 80, 90 y 100%, realizar un recubrimiento con oro (Cressington Sputter Coater 108 auto, Recubridora- Au/Pt) y finalmente observarlos al microscopio electrónico de barrido con aumentos de 100 X, 5000X, y 10000X (Microscopio de ultra alta resolución de emisión de campo Dual Beam – Helios Nanolab 600).

2.7.2 Técnicas electroquímicas

La voltamperometría cíclica (VC), y cronoamperometría (CA) se realizaron empleando el mismo potenciostato con el que se suministró el voltaje a la celda. La VC inicio en un potencial de circuito abierto (E_{OCV}) = O y se dirigió en dirección anódica hasta un potencial de inversión de + 1.0 V vs. Ag/AgCl y de ahí en dirección catódica hasta un potencial de – 1.0 V vs. Ag/AgCl para regresar al valor inicial; los ciclos se obtuvieron por duplicado a una velocidad de barrido de 10 mV/s ó 1 mV/s. La cronoamperometría es una técnica que relaciona la evolución de la corriente en un lapso de tiempo, se realizó suministrando un voltaje de 0.6 y 1.0 V según fuera el caso, registrando la corriente generada cada 10 min.

CAP. III RESULTADOS Y DISCUSIONES

3.1 Evaluación del inóculo procedente de la fermentación oscura y de la biopelícula preformada

Con el objetivo de evaluar el desempeño del consorcio microbiano procedente de la fermentación oscura para su empleo en la producción de Bio-H_2 en la CEM, se realizaron cuatro pruebas iniciales, en las cuales el inóculo procedente del efluente de un reactor fermentativo (4.5 g SSV/L) y el voltaje (0.6 V) se mantuvieron constantes mientras que la DQO soluble del sistema varió. Los valores que se probaron fueron los siguientes: 150, 250, 500 y 2500 mg DQO/L, se optó por trabajar en estos valores de DQO soluble dado que es lo que se encuentra reportado en la literatura. Las concentraciones menores (150 y 250 mg DQO/L) se han empleado en celda de combustible microbiana (Teng *et al.,* 2010) en cuyos casos se evaluaron mezclas de AGVs. Por otro lado, las concentraciones mayores de DQO soluble (500 y 2500 mg DQO/L) se han reportado en CEM alimentadas con AGVs de forma individual (Chae *et al.,* 2010). Cabe resaltar que en todas las mezclas evaluadas en el presente trabajo, la relación de los sustratos utilizados en base DQO (0.26:0.25:0.49, acetato, propionato y butirato, respectivamente) se mantuvo fija.

En los cuatro ensayos evaluados no se presentó producción de Bio-H_2, mientras que los SSV se redujeron al final de cada ensayo. Estos resultados dieron como indicio que el voltaje empleado pudo haber sido muy elevado para el inóculo y que gran parte de la comunidad microbiana se había inactivado, aunado a esto la DQO soluble final aumentó, lo que sustenta la hipótesis de que se dio una lisis celular que permitió la liberación de metabolitos solubles que aumentaron la DQO del sistema.

Por otro lado, como puede verse en la Fig. 10 la máxima densidad de corriente para todas las mezclas (CEM 150: 34 mA/m^2, CEM 250: 37 mA/m^2, CEM 500: 24.5 mA/m^2 y CEM 2500: 12.5 mA/m^2) fue muy inferior a los valores reportados en la literatura (720 mA/m^2 Lu *et al.,* 2009; 2350 mA/m^2 Ruíz *et al.,* 2014) y en cuyos

casos el voltaje aplicado fue el mismo (0.6 V vs. Ag/AgCl) que se uso en el presente ensayo, sin embargo, es importante mencionar que dado que en todos los ensayos se generó un incremento en la corriente esto indicó que efectivamente en el inóculo se encontraban presentes especies electroactivas.

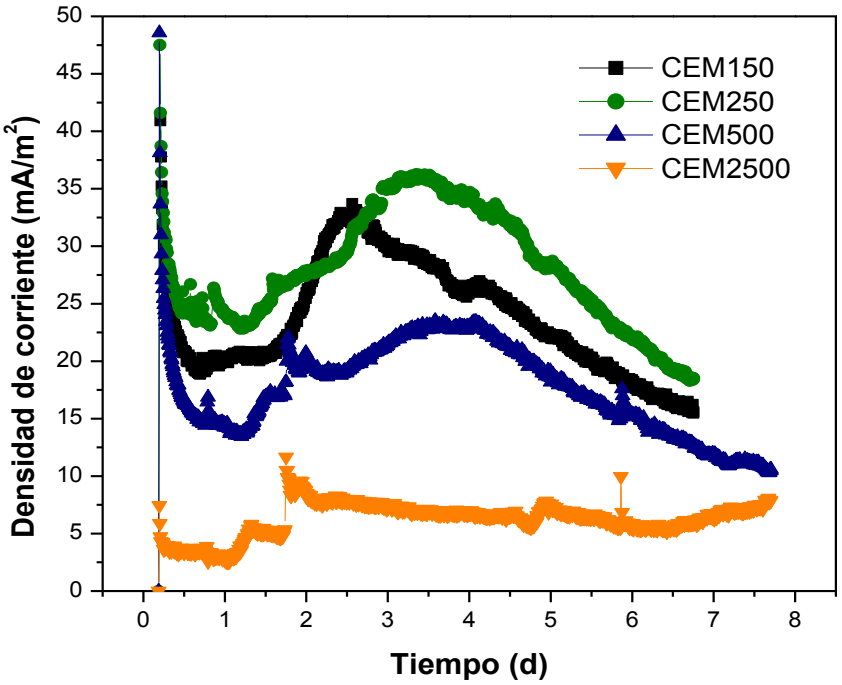

Fig. 10 Evolución de la densidad de corriente en el tiempo de las CEMs con diferentes concentraciones de DQO (mg/L) probadas.

Al término de los ensayos de 500 y 2500 mg DQO/L se optó por probar los electrodos colonizados de éstos en celdas con medios frescos, la misma concentración de sustratos para cada uno y sin microorganismos en suspensión, lo anterior considerando que la biopelícula formada en el electrodo podría incrementar tanto la generación de corriente como de Bio-H_2. Los resultados que se obtuvieron indicaron que la comunidad microbiana que no se encontraba adherida al electrodo también estaba jugando un papel importante en el desempeño del sistema, puesto que al igual que en los primeros ensayos no se observó formación de Bio-H_2, y por el contrario la generación de corriente disminuyó considerablemente (Fig. 11).

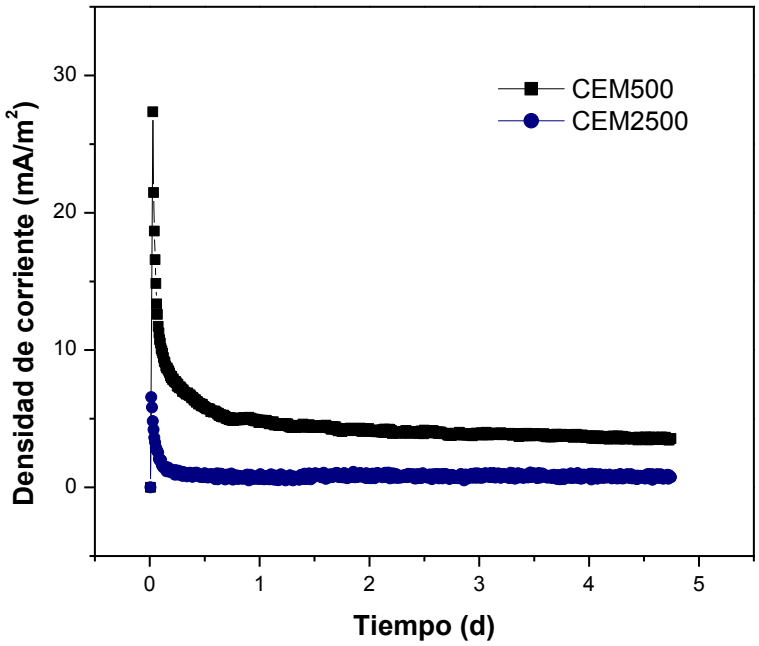

Fig. 11 Desempeño de las CEMs con electrodos previamente colonizados.

De acuerdo a los resultados obtenidos se puede plantear la hipótesis de que la mayor parte de la comunidad microbiana que se encontraba conformando el inóculo del fermentador no era del tipo electroactiva, puesto que las densidades de corriente obtenidas fueron muy bajas. De esta forma se demuestra que el efluente de un reactor fermentativo puede tener una comunidad microbiana apta para la producción fermentativa de H_2 pero no necesariamente será un inóculo adecuado para una CEM.

3.2 Evaluación del inóculo lixiviados de composta a dos diferentes voltajes

Al analizar los resultados con el efluente del fermentador productor de Bio-H_2 todo indicaba que el inóculo que se estaba empleando no contaba con la comunidad microbiana adecuada para el correcto desempeño de una CEM, por lo tanto, en su lugar se decidió utilizar lixiviados de composta, un inóculo del cual se conoce su capacidad electroactiva (Paz, 2014).

Una vez definido el nuevo inóculo se montaron dos ensayos, en los cuales se dejó fija la concentración de DQO (2500 mg/L) para la mezcla que funge como línea

base (acetato, propionato y butirato), en esta ocasión además del potencial que se había estado utilizando (0.6 V) se evaluó un potencial mayor (1.0 V), considerando que de acuerdo a lo reportado con este inóculo se ha obtenido una mejor respuesta a potenciales mayores (Paz, 2014).

3.2.1 Evolución de la densidad de corriente

La Fig. 12 muestra el desempeño en la generación de corriente de los dos ensayos en los que se aplicaron dos voltajes diferentes y la duración de los mismos, en ambos casos es claro que las máximas densidades de corriente, 2200 mA/m^2 (CEM 0.6 V) y 2180 mA/m^2 (CEM con 1.0 V) obtenidas fueron muy superiores a las alcanzadas en los ensayos con el inóculo proveniente de la fermentación oscura. Es importante destacar que aún cuando en la CEM operada a 0.6 V se generara un máximo en la densidad de corriente ligeramente mayor a la de la CEM 1.0 V, ésta última resultó más efectiva en generación de corriente, puesto que mantuvo valores de densidad de corriente de entre 500 y 2180 mA/m^2 por un periodo de 15 días.

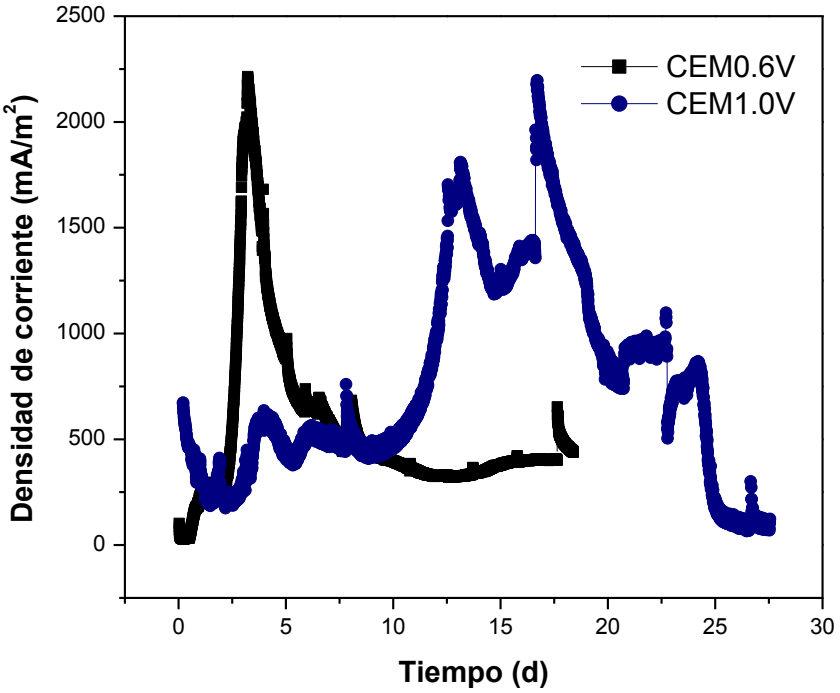

Fig. 12 Densidad de corriente generada en las CEMs en las que se empleó como inóculo lixiviados de composta a un voltaje aplicado de 0.6 y 1.0 V.

3.2.2 Producción de Bio-H_2

Aunado a la generación de corriente en estos ensayos se detectó la presencia del gas hidrógeno en la cámara catódica. Como se muestra en la Fig. 13 la producción acumulada de hidrógeno fue considerablemente mayor para el sistema operado a 1.0 V en donde se obtuvieron 35.8 mL al final del ensayo, mientras que la CEM 0.6 V generó 3.6 mL. Al considerar el tiempo y volumen del anolito a partir del cual se generó el gas de interés se calculó la velocidad volumétrica de producción de Bio-H_2 la cual para las CEM 0.6 y 1.0 V fue de 0.0110 y 0.0325 m^3/m^3 anolito-d, respectivamente. Las tasas de producción de Bio-H_2 obtenidas en estos ensayos se encuentran dentro del rango de las reportadas en sistemas con una configuración similar: 0.02 m^3/m^3-d, ánodo: fieltro de grafito, cátodo: malla de titanio con revestimiento de platino Rozendal *et al.* 2006; 0.04 m^3/m^3-d, ánodo: fibras de carbono, cátodo: tela de carbono con platino Lu *et al.,* 2009; 0.05 m^3/m^3-d, ánodo: fieltro de carbono, cátodo: placa de titanio con revestimiento de platino Chae *et al.,* 2008. Este parámetro, al igual que la densidad de corriente, nos

permite comparar entre sistemas y es un punto importante al considerar el escalamiento del proceso.

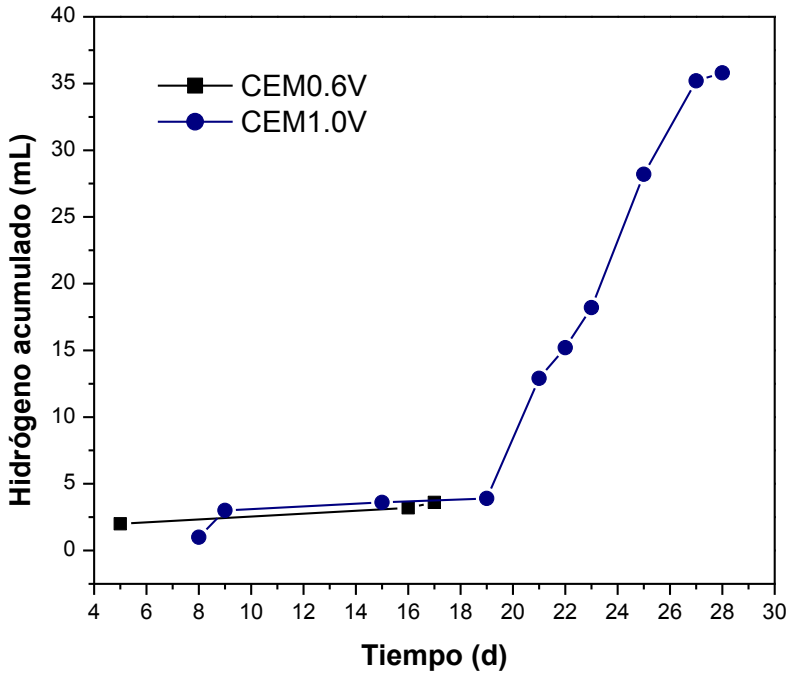

Fig. 13 Producción de Bio-H_2 acumulado como función del voltaje.

La producción de Bio-H_2 en estos sistemas está directamente relacionada con la cantidad y diversidad de microorganismos con los cuales se inocula la celda. El inóculo inicial generalmente se reporta como un porcentaje del volumen total de trabajo, sin embargo, determinar la biomasa en términos de SSV nos da una idea más clara de la cantidad de microorganismos con los que se está operando. Considerando los SSV con los que se inoculó la CEM 0.6 V (0.467 ± 0.09 g SSV/L) y CEM 1.0 V (1.633 ± 0.61 g SSV/L) la producción de Bio-H_2 para cada sistema es de 70 y 200 mL/g SSV, respectivamente.

3.2.3 Composición de biogás en la cámara anódica

La composición del biogás en la cámara anódica está estrechamente relacionada con la generación de Bio-H_2 mientras que la presencia de CO_2 es un producto qué se sabe va de la mano con la obtención de Bio-H_2. La producción de CH_4 es un

proceso no deseado, dado que esto nos indica que en la comunidad microbiana se encuentran microorganismos metanogénicos que afectan al sistema. Lo anterior puede darse a través de dos mecanismos, por un lado se consumen electrones generados durante la oxidación de la materia orgánica y de esta forma dichos electrones dejan de cruzar por el circuito eléctrico para recombinarse con los iones H^+ en la cámara catódica. Por otro lado, la comunidad metanogénica consumirá parte del sustrato, por lo que los microorganismos electroactivos tendrán una menor disponibilidad de este. Las dos maneras en las que se afecta el sistema tienen la misma consecuencia, una menor producción de Bio-H_2.

Es de esperarse que con el inóculo y las condiciones de anaerobiosis que se está trabajando al poco tiempo de operación se dé la producción de CH_4, por ello hay algunos autores que han propuesto distintos tratamientos para inhibir a la comunidad metanogénica (Chae *et al.,* 2010), sin embargo, antes de optar por alguno de estos, debe considerarse que al igual que los metanogénicos las bacterias electroactivas también pueden ser afectadas por dichos tratamientos.

En el caso de los ensayos evaluados la producción de biogás fue de 9.2 y 17.8 mL para las CEM 0.6 V y 1.0 V respectivamente, la composición del biogás fue predominantemente metano (mayor al 60% del volumen total) el cual desde que se presentó en el sistema (día de operación 4-5) permaneció hasta finalizar el ensayo.

3.2.4 Remoción de DQO y consumo de AGVs

Una de las ventajas de la CEM, independientemente de la producción de Bio-H_2, es la eficiencia de remoción de DQO que, a diferencia de los sistemas de fermentación oscura, suele alcanzar valores altos (99 ± 0.3% Wu *et al.,* 2013). Para la CEM a la que se le aplicó un voltaje de 0.6 V se obtuvo una eficiencia de remoción del 85% mientras que la CEM a 1.0 V logró una eficiencia del 92%.

Los resultados anteriores concuerdan con la determinación de AGVs de los ensayos (Tabla 7), por un lado la CEM 1.0 V en la que se tuvo una remoción de DQO mayor se logró un consumo completo de acetato y propionato, mientras que

la CEM 0.6 V al finalizar el ensayo aún presentaba remanentes de los tres AGVs suministrados (acetato, propionato y butirato).

Tabla 7 Concentración de los metabolitos presentes en las CEMs.

AGV	CEM 0.6 V Concentración (mg/L)		CEM 1.0 V Concentración (mg/L)	
	Inicio	**Final**	**Inicio**	**Final**
Acetato	1023.73	43.94	1473.55	0
Propionato	459.65	125.86	526.36	0
Butirato	652.42	49.60	654.01	73.59

De acuerdo a lo reportado por Lu & cols. (2009), el consumo de la materia orgánica suministrada a la celda aumenta conforme se incrementa el voltaje aplicado a la misma, lo cual concuerda con los resultados de la Tabla 7, en la cual puede observarse que el consumo de AGVs fue mayor para la CEM a la cual se le aplicó un voltaje mayor (1.0 V). Respecto a la remoción individual de los sustratos utilizados en el presente ensayo, puede observarse que el orden de consumo es acetato, propionato y butirato. La remoción de acetato, que es el sustrato que se consumió en mayor medida, fue de 96% para la CEM 0.6 V y de 100 % para la CEM 1.0 V. Lu & cols. (2009) observaron una tendencia igual en el orden de consumo de los AGVs, así como una remoción de acetato del 97% al aplicar 0.8 V vs. Ag/AgCl.

Es importante comprobar que la oxidación de los sustratos sea completamente efectuada por la comunidad microbiana y no por la electrólisis de los AGVs que podría efectuarse debido a la estimulación por la aplicación de energía dependiendo del valor de voltaje aplicado (Tuna *et al.,* 2009). Para descartar la degradación abiótica del medio, se realizó un ensayo control sin el inóculo y con los AGVs en el medio. Durante el transcurso de dicho ensayo no se presentó una producción de Bio-H_2, por lo que en el sistema utilizado y bajo las condiciones empleadas es posible descartar la producción de Bio-H_2 por una ruta distinta a la que es promovida o catalizada por los microorganismos.

3.2.5 Cambios de pH en el sistema

Al comenzar la operación de las celdas en las que se evaluó la mezcla base (acetato, propionato y butirato) el pH de ambas cámaras se encontró cercano al valor neutro (Tabla 8). Sin embargo, hay que considerar que el metabolismo microbiano puede originar cambios del pH del sistema a través del tiempo, al generarse o consumirse metabolitos como es el caso de los AGVs.

Tabla 8 Determinación de pH de la cámara anódica y catódica del sistema.

Cámara	CEM 0.6 V		CEM 1.0 V	
	Inicio	**Final**	**Inicio**	**Final**
Ánolito	6.79	8.64	6.86	8.26
Catolito	6.9	11.6	6.91	12.64

Un aumento de pH fue registrado para ambas cámaras en el sistema, ya se ha reportado en la literatura (Nam & Logan, 2012; Rozendal *et al.,* 2006) que el aumento de pH en estos sistemas se incentiva cuando se utilizan membranas de intercambio iónico sobre todo en el caso de las membranas de intercambio catiónico. Dado que en este estudio el anolito presenta grandes cantidades de cationes (Ca^+, K^+, Na^+) debido a su preparación, es de esperarse que estos migren en mayor medida que los H^+ hacia el compartimiento catódico, aunado a esto una mayor tasa de consumo de H^+ en la cámara catódica respecto a su producción en la cámara anódica termina ocasionando un incremento de pH importante. Por otro lado en la cámara anódica se podría estar presentando un efecto de redisolución del CO_2 generado a partir de la oxidación de la materia orgánica cual libera iones HCO_3^- al medio. Si a esto le adicionamos que a partir de las reacciones de oxidación de los AGVs se liberan éstos iones, entonces tendremos como consecuencia un aumento de pH también en la cámara anódica.

Los cambios de pH afectan generalmente a la comunidad microbiana, sin embargo, en este caso el incremento de pH del medio no detuvo la actividad microbiana ligada a la producción de Bio-H_2, pero pudo haberla limitado.

3.2.6 Análisis electroquímico de la CEM: Voltamperometría cíclica

Se realizó la técnica de VC para cada uno de los dos ensayos al inicio y final de los mismos (Fig. 14), esta técnica permite determinar la actividad catalítica de la biopelícula. Durante el barrido de potencial para la CEM 0.6 V y CEM 1.0 V al inicio de los ensayos la máxima corriente producida al evaluar el sistema hacia potenciales positivos fue de 0.06 mA y 0.5 mA, respectivamente, mientras que al finalizar éstos la máxima corriente aumentó a 1.43 mA para la CEM 0.6 V y disminuyó a 0.23 mA para la CEM 1.0 V.

Para el caso de la CEM 0.6 V en la que se dio un aumento en la corriente al final, el resultado se atribuye a la presencia de una biopelícula catalítica en el ánodo que permitió un aumento en el paso de la corriente una vez que el electrodo se encontraba colonizado. Por otro lado, la disminución de corriente para la CEM 1.0 V al finalizar el ensayo pudo ser ocasionado por un desprendimiento de la biopelícula originado posiblemente por el alto potencial suministrado, lo cual concuerda con el resultado biológico del análisis de SSV, en el cual se determinó que la biomasa plantónica aumentó.

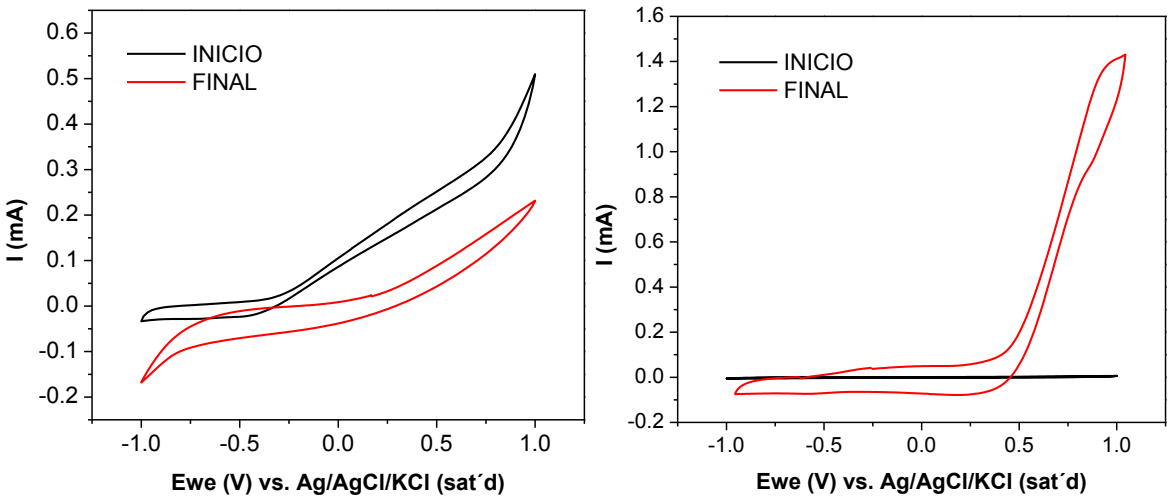

Fig. 14 Respuesta de VC, antes y después de la aplicación del voltaje, a una velocidad de barrido de 10 mV/s, en un intervalo de -1.0 a 1.0 V. CEM 1.0 V (Izquierda), CEM 0.6 V (Derecha).

3.3 Producción de gases con acetato y mezclas de AGVs, lactato y etanol

Una vez que se definió tanto la concentración de la mezcla base de AGVs (2.5 g DQO/L: acetato, propionato y butirato en proporción DQO 0.26:0.25:0.49) así como el voltaje suministrado al sistema (1.0 V), se evaluaron las cuatro mezclas de lactato y etanol (CEM M1 a M4), en las cuales la proporción de éstos dos sustratos varió, manteniendo constante la concentración de DQO (1 g/L).

La Fig. 15 muestra la producción de Bio-H_2 acumulado en la cámara catódica de cada uno de los ensayos efectuados. La CEM ACETATO produjo 66.9 mL en 25 días mientras que la CEM CTRL (mezcla base: acetato, propionato y butirato) generó un volumen total de 35.8 mL de Bio-H_2 durante un lapso de 27 días, esto indicó que al aumentar la cantidad de sustratos en la mezcla la producción de Bio-H_2 cayó en aproximadamente un 50%. En los ensayos en los que se evaluaron las mezclas de lactato y etanol (CEM M1 a M4), pudo observarse que la producción de Bio-H_2 disminuyó conforme se incrementó la proporción de etanol en la mezcla, a un grado tal que en la CEM M4 no se generó Bio-H_2. La producción de Bio-H_2 arrancó entre los días 7 y 10 de cada ensayo, a excepción de la CEM M3 en cuyo caso la formación de Bio-H_2 se presentó desde el día 3, en éste último ensayo aunque el arranque fue rápido la generación del gas fue baja (4.8 mL).

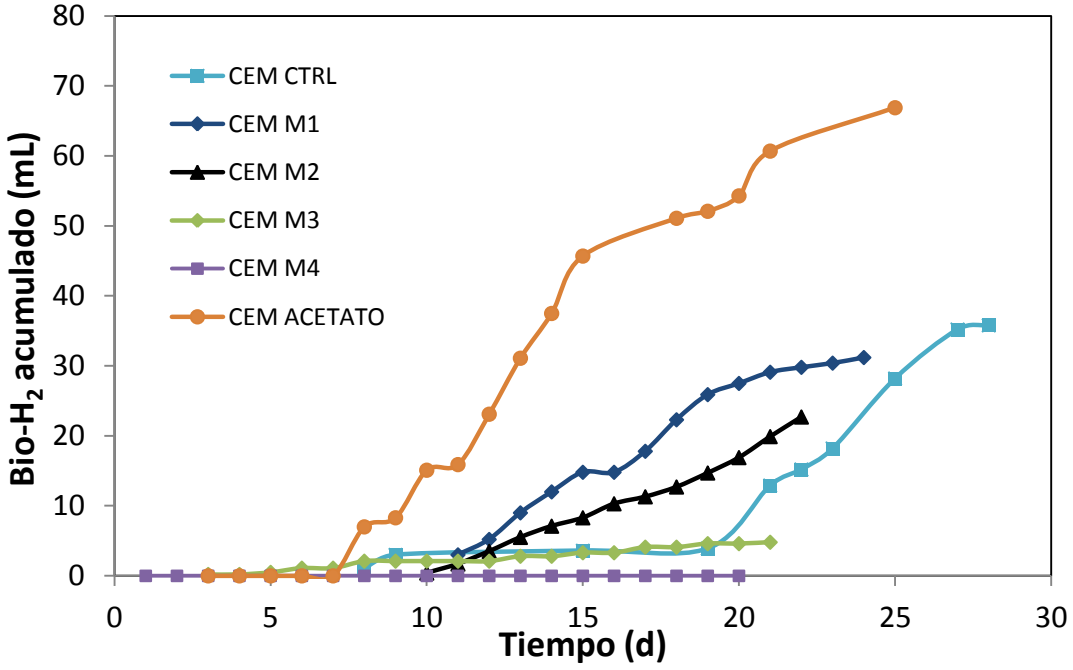

Fig. 15 Producción de Bio-H_2 acumulado en la cámara catódica.

Es interesante resaltar que la primera mezcla evaluada (CEM M1) tuvo una producción de 31.2 mL de Bio-H_2, muy similar al ensayo CEM CTRL, lo cual indicó que al aumentar la complejidad de la mezcla de 3 a 5 sustratos no repercutió de forma considerable en el sistema, lo cual si ocurrió al aumentar de 1 a 3 sustratos.

El volumen total producido es una de las respuestas más importantes de este sistema, sin embargo, al evaluar el desempeño del dispositivo, al igual que ocurre con otros procesos es importante considerar no solo la cantidad que se obtiene del producto de interés (Bio-H_2) sino también el tiempo en que se genera dicho producto. La velocidad de producción de Bio-H_2 nos permite entonces normalizar los datos obtenidos (considerando volumen de anolito y tiempo de producción del gas) y comparar entre los diferentes ensayos, de esta forma podemos observar en la Tabla 9 que la CEM ACETATO produjo una mayor cantidad de Bio-H_2 de forma más rápida.

Adicional a la CEM CTRL se realizaron dos ensayos más para descartar la producción de Bio-H_2 por otra ruta que no fuese la microbiana, a uno de ellos no se le aplicó voltaje, mientras que al otro no se le adicionó inóculo, para de esta

forma descartar la producción de Bio-H_2 por electrólisis del agua debido al voltaje suministrado a la celda. Estos últimos controles no presentaron formación del gas de interés por lo que con esto se puede confirmar que el Bio-H_2 producido en los ensayos se debe completamente a un proceso microbiano.

Tabla 9 Velocidad de producción de Bio-H_2.

ENSAYO	Q_{H2} (m^3 H_2/ m^3 anolito-d)
CEM ACETATO	0.0464
CEM CTRL	0.0325
CEM M1	0.0218
CEM M2	0.0159
CEM M3	0.0048
CEM M4	0

La formación de biogás en la cámara anódica incrementó a lo largo de los ensayos, la composición de éste fue en su mayoría de CH_4. El ensayo CEM M2 fue el que mayor volumen de biogás produjo (81.4 mL), lo cual indica que la mezcla de la CEM M2 favoreció mayormente a la comunidad metanogénica presente en el sistema (Tabla 10). Del ensayo CEM CTRL a la CEM M2 el volumen de biogás fue en aumento mientras que a la par en estos mismos ensayos la producción de Bio-H_2 disminuyó, sin embargo, en los ensayos M3 y M4 tanto el biogás como el Bio-H_2 disminuyeron, lo cual indicó que a estas concentraciones el etanol posiblemente afectó a la comunidad metanogénica mientras que a las fermentadoras y electroactivas las inhibió por completo.

Tabla 10 Volumen acumulado de Biogás en la cámara anódica.

ENSAYO	Biogás (mL)	CH_4 (mL)	CO_2 (mL)
CEM CTRL	17.8	10.3	7.5
CEM M1	56.2	37.7	18.5
CEM M2	81.4	52.9	28.5
CEM M3	11.5	8.3	3.2
CEM M4	13.7	11.8	1.9

3.4 Consumo de sustratos y cambios de pH

La eficiencia de remoción de DQO en estos sistemas es alta, hay autores que reportan remociones de DQO de prácticamente 100% (Wu *et al.,* 2013). Como se muestra en la Tabla 11 la CEM CTRL fue la que presentó la mayor remoción de DQO seguida de la CEM M1, mientras que conforme se incrementó la fracción de etanol en la mezcla las eficiencias de remoción de DQO disminuyeron (CEM M1: 88.5%, CEM M2: 66.4%, CEM M3: 61.3% y CEM M4:51%). Sin embargo, a pesar del efecto negativo en la remoción de DQO estas eficiencias son alentadoras considerando que el sustrato es una mezcla compleja. Lu & cols. (2009) emplearon un sistema cuyo sustrato era una mezcla de AGVs y reportaron una remoción total de DQO de ~30%, por otro lado existen reportes de celdas en modo continuo que se han operado con una mezcla de AGVs obteniéndose eficiencias de remoción de ~70% (Escapa *et al.,* 2013). A partir del análisis de los AGVs pudo observarse que el consumo de estos sustratos fue prácticamente completo para todas las CEMs, incluso en todos los ensayos en los análisis finales no se detectó etanol, lo cual indica que el sustrato se consumió, sin embargo, a pesar del consumo de sustratos la producción de Bio-H_2 disminuyó drásticamente. Lo anterior podría justificarse de la siguiente manera: una vez que el etanol se adicionó a la CEM éste fue transformado en acetato e H_2, lo ideal sería que los electrones generados a partir de la oxidación de estos subproductos hubiesen sido aprovechados completamente por la comunidad electroactiva, sin embargo, ya que no se suprimió a la comunidad metanogénica en el sistema éstos consumieron parte del H_2 para formar CH_4, lo cual afectó negativamente a la eficiencia coulómbica y a la formación final de H_2 en la cámara catódica (Parameswaran *et al.,* 2009). Lo anterior se puede corroborar en las secciones siguientes, conforme la cantidad de etanol aumentó en la mezcla una menor cantidad de electrones pudieron cruzar el circuito eléctrico (Fig.16).

Por otro lado, Parameswaran & cols. (2009), señalaron que los metanógenos acetoclasticos compiten con las bacterias electroactivas para oxidar el acetato, dado que la velocidad media de máxima concentración (Ks) es de 177-427 mg

DQO/L para los metanógenos acetoclasticos y de 0.64 mg DQO/L para las bacterias electroactivas, esto indica que la comunidad metanogénica acetoclastica podrá consumir el acetato en mayor medida, de aquí la importancia de remover a las arqueas metanogénicas para favorecer la producción de H_2.

De lo anterior se concluye que cuando se suministra etanol a una CEM se crea una competencia entre electrógenos y metanógenos en donde estos últimos son favorecidos si no se aplica un inhibidor (Kiely *et al.,* 2011).

Tabla 11 Remoción de la DQO en cada ensayo.

ENSAYO	DQO removida (%)
CEM ACETATO	55.5
CEM CTRL	92.0
CEM M1	88.5
CEM M2	63.4
CEM M3	61.3
CEM M4	51.0

La Tabla 12 muestra los cambios de pH que se presentaron en los sistemas, como puede observarse en ambas cámaras el pH aumentó, para el caso de la sección anódica incrementó ~ 1-2 unidades, mientras que en la cámara catódica el aumento fue más considerable llegando a valores cercanos a 13. En este sentido, Nam & cols. (2012) reportaron en sus ensayos valores finales de pH en la cámara catódica de 12.2, señalando que la alcalinización del medio es debido al rápido consumo de protones en esta cámara. El aumento de pH puede justificarse por el uso de una membrana de intercambio iónico como ya previamente se explico (Torres *et al.,* 2009), sin embargo, se puede observar una tendencia ya que, conforme se incrementó la proporción de etanol los cambios de pH se redujeron. Estos cambios de pH que tienen una tendencia ligada a las fracciones de lactato y etanol en la mezcla se deben en su mayoría a las reacciones de consumo de éstos sustratos lo cual se puede explicar de la siguiente manera: a partir de la reacción de oxidación de lactato se obtiene propionato y acetato, el primero sufre

nuevamente una oxidación para obtenerse más acetato, así como iones HCO_3^- en el caso del acetato, mientras que de la oxidación de etanol se obtiene acetato y de éste más iones HCO_3^-. La relación global que guarda el lactato y el etanol respecto a la producción de iones HCO_3^- es 3:2, esto justifica entonces un mayor aumento de pH en la cámara anódica de las primeras mezclas evaluadas que eran las que contenían una mayor concentración de lactato. Por otro lado, podemos vincular la producción de iones HCO_3^- en la cámara anódica con el aumento de pH en la cámara catódica ya que los iones HCO_3^- amortiguaron el medio consumiendo los H^+ que se generaron en la cámara anódica, lo cual limitó la transferencia de H^+ a la cámara catódica. De esta forma los protones que se estaban reduciendo para formar el gas H_2 no se estuvieron reponiendo a la misma velocidad y por lo tanto el aumento de pH fue considerable. Contrario a lo que se obtuvo en el presente estudio, hay algunos reportes que señalan una disminución de pH en la cámara anódica justificando esto con una acumulación de protones en dicha cámara, ocasionado por la baja transferencia de los mismos hacia el compartimiento catódico (Wang *et al.,* 2010). Considerando que los gradientes de pH pueden inhibir la función de los componentes biológicos, además de ocasionar perdidas de potencial, se ha optado por emplear membranas de intercambio aniónico, ya que este tipo de membranas permite el transporte de iones con carga negativa, tales como fosfatos y bicarbonatos, que pueden facilitar la transferencia de protones de un compartimiento al otro (Torres *et al.,* 2009; Liu *et al.,* 2010).

Tabla 12 Cambios de pH en los ensayos con variaciones de lactato y etanol.

ENSAYO	ÁNOLITO		CÁTOLITO	
	Inicio	Final	Inicio	Final
CEM ACETATO	7.85	7.34	7.05	10.13
CEM CTRL	6.86	8.26	6.91	12.64
CEM M1	6.8	8.46	7.01	12.02
CEM M2	7.1	7.76	6.9	11.34
CEM M3	6.9	8.3	6.93	8.55
CEM M4	6.83	8.1	6.9	8.42

3.5 Análisis electroquímico: Cronoamperometría y Voltamperometría cíclica

La cronoamperometría permite evaluar el desempeño del sistema en la generación de corriente (Fig. 16). La corriente cronoamperométrica fue detectable por periodos entre 15 y 25 días de duración, la fase de latencia fue de entre 3 y 5 días para la mayoría de los ensayos con excepción de la CEM M3 la cual no presentó un perfil semejante a los ensayos previos, prácticamente no se observó una corriente estable en los cronoamperogramas, lo cual puede atribuirse a la cantidad de biomasa y de sustrato que se suministra al sistema, posteriormente se observa una fase de declive en la que la corriente llega a la línea base, lo cual indica que el sustrato disponible para los microorganismos fue consumido. De las mezclas evaluadas la CEM M2 fue la que logró la mayor densidad de corriente (~2500 mA/m^2), sin embargo, esta no fue la que presentó la mejor producción de Bio-H_2. De acuerdo a la literatura (Liu *et al.,* 2010), la generación de corriente es proporcional al volumen de Bio-H_2 obtenido, es decir, estas respuestas del sistema se encuentran ligadas ya que no es posible la reducción de los protones en el cátodo sin electrones que estén atravesando el circuito eléctrico, por lo tanto cuanto mayor sea el paso de electrones por el circuito mayor será el H_2 que puede ser formado. Sin embargo, existen casos en donde las resistencias propias del medio (distancia entre electrodos, formación de metabolitos y biomasa, etc.) pueden limitar la transferencia de protones hacia el cátodo, por lo que a pesar de tener valores de corriente altos la producción de Bio-H_2 puede ser baja.

Por otro lado es posible relacionar los perfiles de corriente a los datos de consumo de AGVs ya que las densidades de corriente obtenidas corroboran que se estuvo efectuando una transferencia de electrones adecuada, electrones que por supuesto se liberaron de la oxidación de los sustratos. La disminución en los niveles máximos de corriente obtenida que se dio para los ensayos CEM M3 y M4 puede justificarse con el efecto negativo del etanol sobre las bacterias encargadas de transferir los electrones al ánodo. De la cronoamperometría de la CEM ACETATO destaca el tiempo de generación de corriente (15 días), el cual es menor al periodo de operación de los sistemas alimentados con las mezclas de

sustratos, lo anterior es de esperarse ya que los sustratos más complejos deben ser primeramente transformados por una comunidad fermentativa (Logan *et al.,* 2008), lo cual implica un mayor tiempo de operación. De acuerdo a Liu & cols. (2010) el acetato es el sustrato modelo en los sistemas bioelectroquímicos, tiene como ventaja, respecto a otras moléculas, un requerimiento menor de energía para sobrepasar las barreras termodinámicas que limitan la reacción de evolución de H_2.

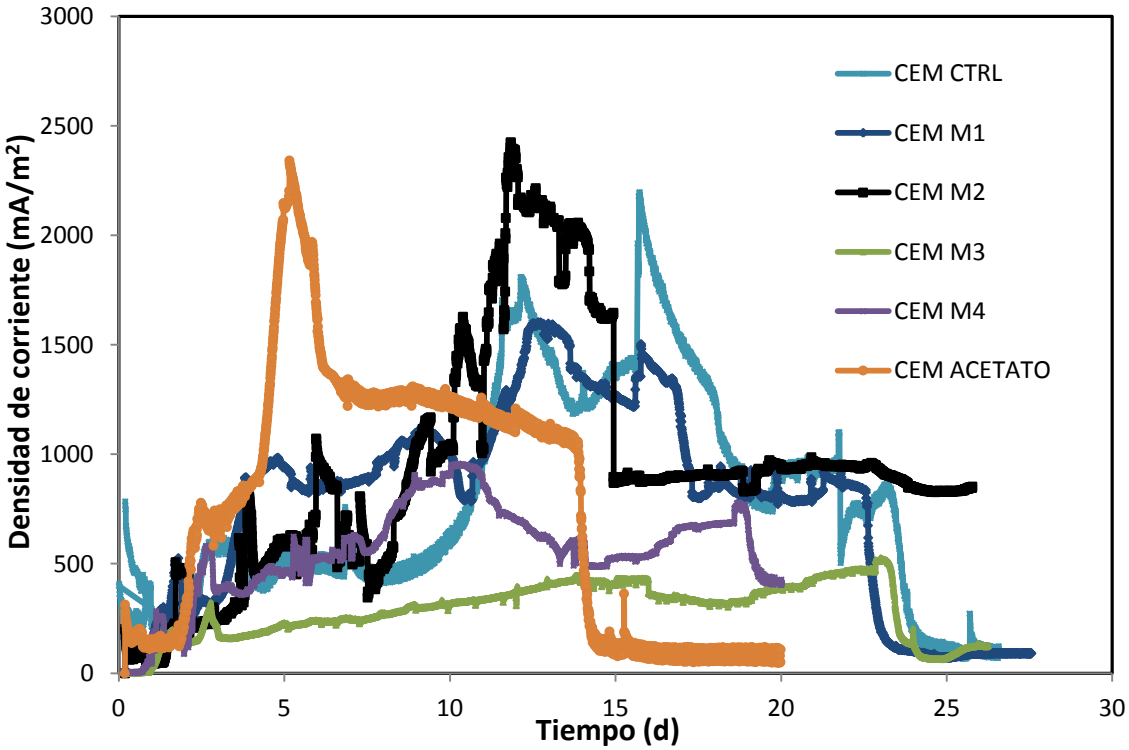

Fig. 16 Evolución de la densidad de corriente en el tiempo.

Adicional al análisis de cronoamperometría en el aspecto electroquímico se realizaron voltamperometrías cíclicas tanto al inicio como al final de cada ensayo con el objetivo de evaluar la actividad catalítica de las biopelículas formadas sobre la superficie de los electrodos. Como se observa en la Fig. 17 durante el barrido de potencial los ensayos CEM M1 y M2 obtuvieron las mayores corrientes hacía potenciales positivos (~0.2 mA), mientras que al termino de los ensayos las corrientes de cada ensayo estuvieron en el rango de 0.1-0.2 mA.

En este tipo de análisis se espera que al finalizar el ensayo la corriente máxima obtenida sea mayor a la inicial debido a la presencia de la biopelícula catalítica, pero en algunos casos la corriente final es menor que la inicial como se observa en la CEM M2 (Fig. 17-B), lo cual puede atribuirse a un posible desprendimiento de la biopelícula formada sobre el electrodo o a la pérdida de la actividad de dicha biopelícula.

Adicional a los datos obtenidos a partir de las VC, el valor del potencial de circuito abierto (E_{OCV}) puede relacionarse a la biopelícula formada sobre el electrodo, es de esperarse que el valor del E_{OCV} se vuelva más negativo al término de cada ensayo ya que esto indica la colonización de las fibras. En la Tabla 13 puede observarse los cambios en el E_{OCV} al inicio y termino de cada ensayo.

Tabla 13 Valores de potenciales de circuito abierto (E_{OCV}).

ENSAYO	E_{OCV} (V)	
	INICIO	FINAL
CEM CTRL	-0.057	-0.094
CEM M1	-0.013	-0.073
CEM M2	-0.161	-0.168
CEM M3	0.118	-0.216
CEM M4	0.115	-0.012

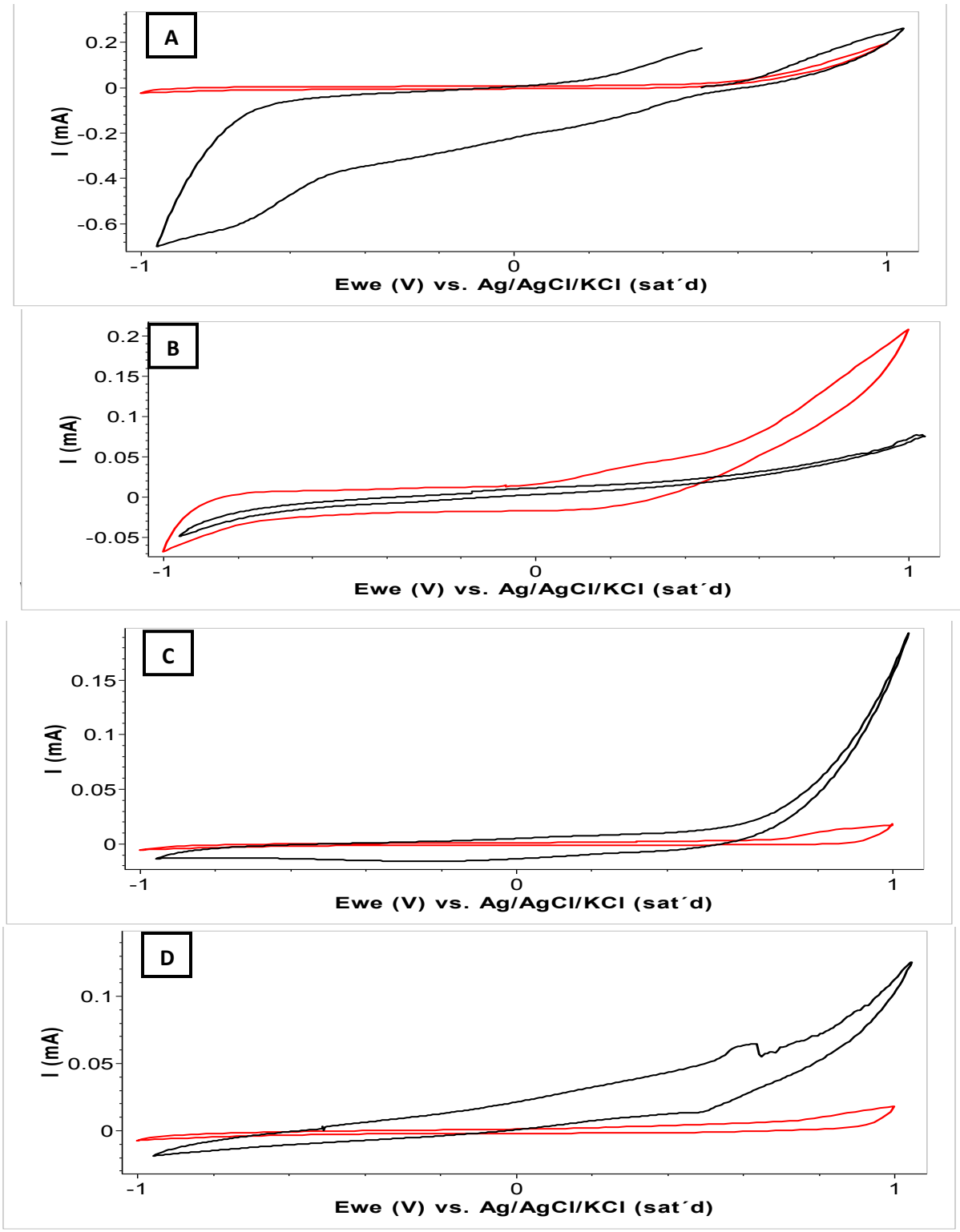

Fig. 17 VC registradas a 10 mV/s en el rango de potencial de -1 a 1 V. La línea roja representa la VC del inicio y la línea negra la VC al final del ensayo. (A) CEM M1, (B) CEM M2, (C) CEM M3 y (D) CEM M4.

Algunos autores optan por utilizar este tipo de técnicas electroquímicas para cuantificar la biopelícula depositada sobre el electrodo, correlacionando la densidad de corriente que hay en los picos de oxidación y reducción del voltamperograma (Verea Valladares, 2014), sin embargo, este tipo de cálculos se vuelve complicado cuando se trabaja con mezclas biológicas y por lo tanto no se tiene un medio definido y una cepa pura, lo cual se confirma con las VC de la Fig. 17 en donde no es posible ubicar los picos de oxidación/reducción.

3.6 Desempeño del sistema: Recuperación de energía

Para evaluar de forma global el desempeño de los sistemas se calcularon los parámetros que se muestran en la Tabla 14 de acuerdo a lo reportado por Logan *et al.,* 2008. En el aspecto electroquímico la forma en que se puede comparar entre sistemas es a través de la eficiencia coulómbica (C_E) ya que este parámetro relaciona las moles de H_2 que pueden ser formadas por la corriente producida (n_{CE}) y las moles de H_2 que se pueden generar a partir del sustrato consumido (n_{th}); la C_E obtenida en los ensayos se encuentra dentro de lo reportado por Rozendal & cols. (2008) quienes también utilizaron un sistema con membrana de intercambio catiónico aplicando 1 V vs. Ag/AgCl al sistema, a partir de lo cual obtuvieron una C_E de 23%, sin embargo, otros autores reportan C_E mayores (68% Chae *et al.,* 2008; 97% Call & Logan, 2008), lo cual puede atribuirse a un tratamiento previo al inóculo en el cual se favoreció a la comunidad electroactiva para reducir la perdida de electrones por reacciones no deseadas como es el caso de la formación de CH_4.

La recuperación de H_2 en el sistema puede ser calculada de forma específica para la sección catódica (R_{cat}) o de forma global (R_{H2}), la recuperación total relaciona los moles de H_2 obtenidos a través del volumen desplazado en la bureta (n_{H2}) y los n_{th}. En este sentido, la recuperación de H_2 disminuyó drásticamente (23.42% a 3.93%) al incrementar propionato y butirato a la mezcla, por el contrario se observó un ligero incremento (5.22-5.54%) al adicionar a la mezcla base (acetato, propionato y butirato) lactato y etanol; de acuerdo a lo reportado en la literatura

mayores valores de R_{H2} son obtenidos cuando se trabaja con sustratos individuales (23%, Rozendal *et al.,* 2007) contrario a lo que sucede al utilizar mezclas de sustratos (4%, Lu *et al.,* 2009). La carga teórica (Q_t) es la cantidad de electrones de acuerdo a la concentración del substrato consumido que pueden ser transferidos hacia el electrodo y atravesar el circuito externo desde el ánodo hacia el cátodo, mientras que la carga experimental (Q_e) es la cantidad de electrones que efectivamente fueron transferidos y es cuantificada como la corriente cronoamperométrica. Como puede verse en la Tabla 14 la mayor Q_e, obtenida en la CEM M2, fue de sólo una sexta parte de la Q_t lo cual indica nuevamente un desvió importante de electrones hacia otras reacciones, para mejorar estos resultados algunos autores sugieren adicionar un mediador redox al sistema para incrementar la transferencia de electrones al electrodo (Lovley *et al.,* 2008).

El rendimiento de Bio-H_2 respecto a la DQO consumida ($Y_{H2/S}$) indicó que la CEM ACETATO fue el sistema que tuvo la mejor eficiencia de conversión de sustrato, por lo que por cada gramo de DQO consumida es posible obtener ~457 mL cuando se opera la celda únicamente con acetato. Al comparar entre las mezclas evaluadas de lactato y etanol, la CEM M2 fue el sistema con mejor rendimiento (108 mL H_2/g DQO); al comparar los rendimiento de la CEM ACETATO y la CEM M2 es claro que el incremento en la diversidad de sustratos afecta en la producción de Bio-H_2.

La energía recuperada en el sistema (W_{H2}, W_{CH4}) es una respuesta muy importante a considerar cuando se planea escalar el proceso, ya que como en estos sistemas se suministra un cantidad considerable de energía externa es necesario identificar si los gastos de energía extra no sobrepasan a los beneficios obtenidos por la energía generada. De forma global en la Tabla 14 se muestra que los rendimientos del sistema fueron disminuyendo conforme se incrementó la cantidad de sustratos administrados, la diversidad de sustratos posiblemente originó que una comunidad microbiana más diversa se desarrollara y que ésta misma aprovechara los e^- y H^+ en mayor medida que la comunidad electroactiva. Al comparar entre las mezclas evaluadas (CEM M1 a M4) el efecto del etanol en

las mezclas fue evidente ya que los rendimientos se vieron afectados negativamente conforme la fracción de etanol aumentó en las mezclas.

Como se mencionó anteriormente, una de las direcciones de investigación de estos sistemas son las aplicaciones futuras del mismo, en este sentido los estudios que se han efectuado al momento para mejorar algunos parámetros de la CEM son importantes, sin embargo, la mayoría de estos estudios han empleado acetato como sustrato modelo y pocas son las referencias que se tienen sobre el comportamiento de una CEM alimentada con efluentes reales o mezclas de sustratos basados en éstos (Lu *et al.,* 2009; Lalaurette *et al.,* 2009; Ruíz *et al.,* 2014); dado lo anterior los resultados obtenidos en este estudio son de interés pues indican que una mezcla de AGVs, lactato y etanol puede fungir como sustrato promisorio para una CEM.

La producción de Bio-H_2 y la densidad de corriente obtenida es aun limitada en comparación con otros estudios que han empleado sustratos individuales (17.8 m^3/m^3-d y 104.5 A/m^2, Cheng *et al.,* 2011; 50 m^3/m^3-d y 22.8 A/m^2, Jeremiasse *et al.,* 2010), sin embargo, éstos se encuentran dentro de los valores reportados (0.015 m^3/m^3-d y 0.3 A/m^2, Heidrich *et al.,* 2013; 0.022 m^3/m^3-d y 0.22 A/m^2, Gil *et al.,* 2013; 0.015 m^3/m^3-d y 0.36 A/m^2, Escapa *et al.,* 2015). Para CEMs a escala que operan con efluentes reales, existe la oportunidad de mejorar estos rendimientos si se realizan cambios al sistema considerando las aportaciones que se han realizado al momento; en la configuración de la celda es posible reducir el espacio entre electrodos para disminuir las pérdidas de H^+ (Cheng & Logan, 2011), así como emplear membranas de intercambio aniónico sobre las de intercambio catiónico con el objetivo de prevenir incrementos de pH en la cámara catódica (Rozendal, 2007).

Tabla 14 Desempeño global del sistema.

Ensayo	C_E (%)	r_{cat} (%)	r_{H2} (%)	Q_t (C)	Q_e (C)	Q (m^3 H_2/ m^3 anolito-d)	$Y_{H2/S}$ mL/g DQO	$Y_{H2/X}$ mL/g SSV	W_{H2} (kJ)	W_{CH4} (kJ)
CEM ACETATO	30.15	77.69	23.42	3914.34	532.49	0.0464	456.77	-	0.5146	-
CEM CTRL	12.75	30.80	3.93	3440.24	718.73	0.0325	76.62	354.55	0.2753	0.2640
CEM M1	19.94	26.19	5.22	4770.30	736.71	0.0218	101.84	282.69	0.2399	0.9665
CEM M2	32.70	16.94	5.54	4769.04	828.68	0.0159	108.04	80.81	0.1745	1.3562
CEM M3	8.05	11.30	0.91	4768.00	262.60	0.0048	17.74	452.02	0.0369	0.2128
CEM M4	16.72	0	0	4767.19	385.10	0	0.00	0	0	0.3025

C_E : Eficiencia coulómbica, r_{cat} : Recuperación catódica, r_{H2}: Recuperación total de hidrógeno, Q_T : Carga teórica alimentada, Q_e : Carga experimental, Q: Tasa de producción de hidrógeno, $Y_{H2/S}$: Rendimiento de Bio-H_2 respecto al sustrato consumido, $Y_{H2/X}$: Rendimiento de Bio-H_2 respecto a la biomasa inoculada, W_{H2} : Energía recuperada en Bio-H_2, W_{CH4}: Energía recuperada en CH_4.

3.7 Estudio de la biopelícula por microscopía electrónica de barrido

Las tomas realizadas por MEB evidenciaron la presencia de una comunidad microbiana adherida a las fibras de fieltro de carbón, en las CEM M1 a M4 (Fig. 18). Es posible notar una alta presencia de microorganismos con morfología de bacilos cortos adheridos a las fibras del electrodo, éstos se encontraban ampliamente embebidos en una matriz de exopolisacáridos (EPS). Cuando se trabaja con mezclas de sustratos es de esperarse que la biopelícula que se desarrolla en el sistema sea mayor y más diversa, contrario a lo que suele suceder en sistemas que emplean sustratos individuales. De acuerdo a lo reportado por algunos autores (Call *et al.,* 2009; Paz, 2014; Carmona *et al.,* 2015) las CEMs con mezclas de sustratos originan biopelículas mas densas con estructuras amorfas que se encuentran envolviendo a los microorganismos, estas estructuras cubren una mayor superficie del electrodo dejando una pequeña área del mismo libre; por otro lado cuando se utilizan sustratos individuales, como es el caso del acetato, es más frecuente observar capas de microorganismos apilados unos sobre otros, originando con ello una mayor área libre en el electrodo.

De forma panorámica la CEM CTRL (Fig. 18-E) y la CEM M1 (Fig. 18-A) presentaron una baja colonización de las fibras, sin embargo, fueron precisamente estos ensayos los que generaron la mejor producción de Bio-H_2, lo cual es un indicio de que las comunidades adheridas a los electrodos en los otros ensayos (CEM M2, M3 y M4) eran en menor proporción electroactivas.

La Fig. 18-F muestra las fibras del electrodo de la celda que fungió como control de electrólisis del agua, la cual no se inóculo, por lo tanto conforme lo que se esperaba la colonización del electrodo fue prácticamente despreciable.

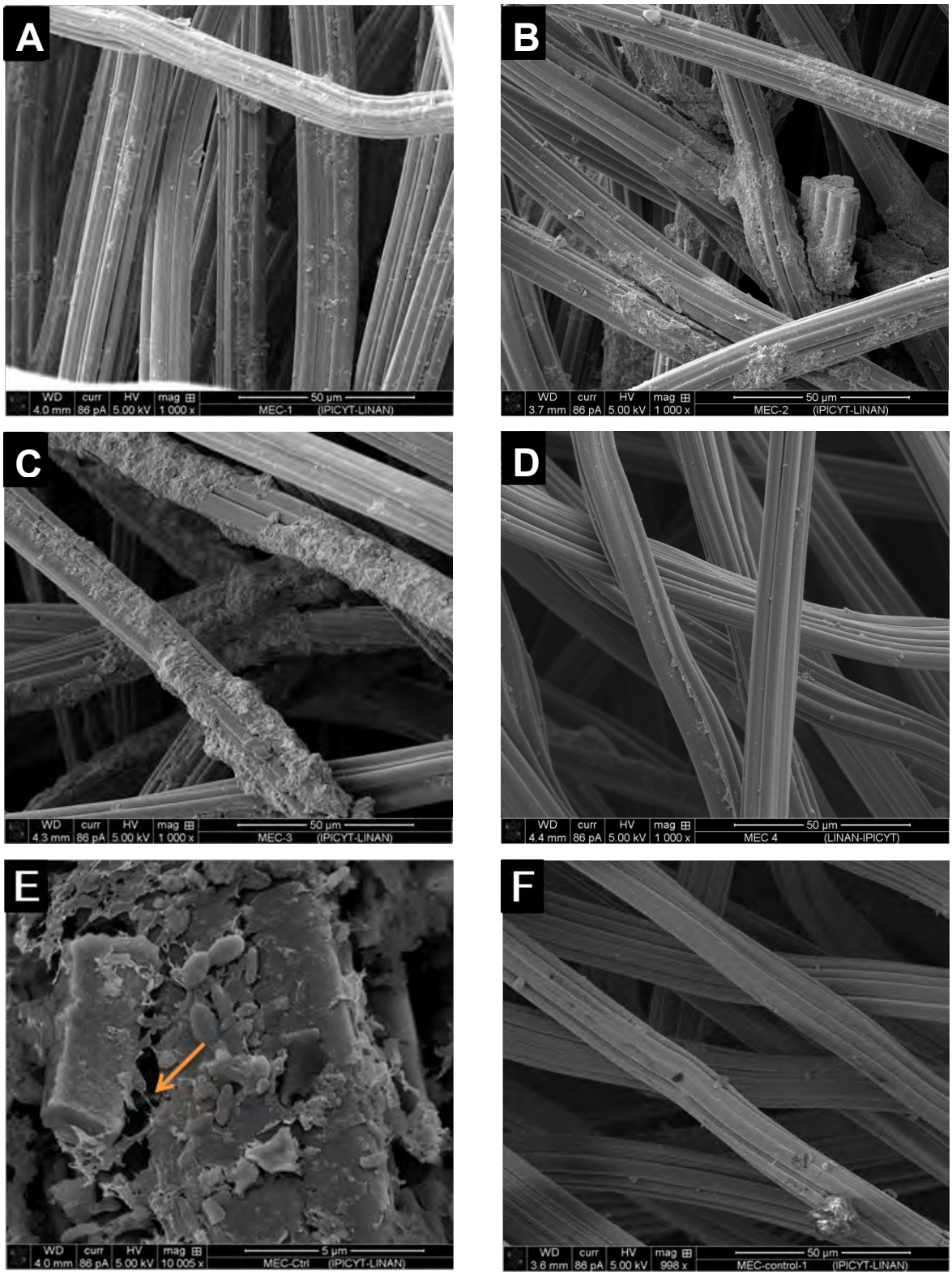

Fig. 18 Micrografía electrónica de barrido del fieltro de carbón colonizado. (A) CEM M1, (B) CEM M2, (C) CEM M3, (D) CEM M4, (E) CEM CTRL (F) CEM CTRL ELECTRÓLISIS DEL AGUA.

CAP. IV

4.1 CONCLUSIONES

El inóculo proveniente de la fermentación oscura posee microorganismos electroactivos dado que generó una respuesta en la corriente, sin embargo, esta respuesta fue muy baja y ligado a ello no se obtuvo producción de Bio-H_2 lo cual sugiere que la proporción de la comunidad electroactiva en el inóculo era baja. Por otra parte, es posible que el voltaje que se suministró al sistema fuera tan alto que ocasionó que la comunidad microbiana se inactivara, en este sentido son necesarios estudios futuros sobre la evaluación del voltaje idóneo en una CEM para los inóculos procedentes de la fermentación.

Respecto al empleo de los electrodos previamente colonizados los resultados negativos en la producción de Bio-H_2 que se obtuvieron demostraron que los microorganismos planctónicos que se retiraron del sistema jugaban un papel clave tanto en la transformación del sustrato como en la transferencia de electrones al bioánodo.

A partir de los ensayos inoculados con lixiviados de composta en los que se evaluaron dos voltajes (0.6 y 1.0 V) y a los cuales se suministró una mezcla de acetato, propionato y butirato, se pudo concluir que el suministro de 1.0 V fue más adecuado para el sistema, lográndose con éste una mayor producción de Bio-H_2, generación de corriente y remoción de DQO, respecto al ensayo de 0.6 V.

Al evaluar las mezclas de lactato y etanol se comprobó la robustez de una CEM para degradar una amplia gama de sustratos, considerando así a los efluentes de fermentación como sustratos promisorios para su empleo en estos sistemas. Sin embargo, se observó una tendencia negativa en la producción de Bio-H_2 y densidad de corriente conforme se incrementó la fracción de etanol en la mezcla a un grado tal que la producción de Bio-H_2 se detuvo, por lo cual al considerar el

acoplamiento de la fermentación oscura a una CEM se deben tener en cuenta las concentraciones de AGVs y solventes en el efluente para evitar daños permanentes a la comunidad electroactiva de la CEM.

Investigaciones futuras son necesarias para optimizar los procesos que ocurren en una CEM una vez que ésta se encuentra alimentada de otro proceso como es el caso de la fermentación oscura con el objetivo de maximizar la producción de Bio-H_2 para que estos sistemas se vuelvan una alternativa más rentable y que permita su escalamiento.

4.2 PERSPECTIVAS

Como perspectiva de este trabajo se tiene realizar controles individuales de los sustratos evaluados (etanol y lactato) con el objetivo de analizar los efectos que cada uno de éstos tiene sobre la comunidad y el desempeño del sistema.
Por otro lado se plantea el empleo de un efluente real de un fermentador como único sustrato para la CEM con el fin de optimizar la producción global de Bio-H_2.
Se tiene como perspectiva evaluar las resistencias del sistema, para de esta forma realizar las modificaciones pertinentes a la celda con el objetivo de minimizar las pérdidas de potencial por las caídas óhmicas.

Producción científica

-XVI Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería, del 22 al 26 de Julio de 2015, Guadalajara, Jalisco. Efecto de la composición de mezclas de metabolitos procedentes de la fermentación oscura para su uso en la producción de biohidrógeno en celdas de electrólisis microbianas. Modalidad cartel acreedor al tercer lugar en el área de Bioenergía y Biocombustibles.

-6° Simposio de Avances de Tesis del Posgrado en Ciencias Ambientales, IPICYT, San Luis Potosí. Efecto de la composición de mezclas de metabolitos procedentes de la fermentación oscura para su uso en la producción de biohidrógeno en celdas de electrólisis microbianas. Modalidad cartel.

REFERENCIAS

APHA, 1998, *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*, 20th ed., American Public Health Association, Ap 8010G., Washington D.C., pp. 8-20, 8-23.

Apuro Castro R. (2011). Determinación de los flujos metabólicos en la producción de hidrógeno. Tesis de maestría, Instituto politécnico nacional. Unidad profesional interdisciplinaria de biotecnología.

Argun, H., Kargi, F., Kapdan I. K. (2008). Light fermentation of dark fermentation effluent for bio-hydrogen production by different Rhodobacter species at different initial volatile fatty acid (VFA) concentrations. *International Journal of Hydrogen Energy*, 33:7405-7412.

Arreola, V.J., Celis, L.B., Buitrón, G., Razo F.E. Alatriste, M.F. (2013). Hydrogen production from acid and enzymatic oat straw hydrolysates in an anaerobic sequencing batch reactor: Performance and microbial population analysis. *International Journal of Hydrogen Energy*, 38:13884-13894.

Arreola, V.J., Alatriste, M.F., Celis, L.B., Razo F.E., López, L.A., Méndez, A.H. (2014). Continuous hydrogen production in a trickling bed reactor by using triticale silage as inoculum: effect of simple and complex substrates. *J Chem Technol Biotechnol,* DOI 10.1002/jctb.4410.

Arriaga, S., **Rosas, I., Alatriste, M.F., Razo F.E.** (2011). Continuous production of hydrogen from oat straw hydrolysate in a biotrickling filter. *International Journal of Hydrogen Energy,* 36:3442-3449.

Call, F.D., & Logan, B.E. (2008). Hydrogen production in a single chamber microbial electrolysis cell lacking a membrane. *Environ. Sci. Technol., 42*(9): 3401–3406.

Call, F.D., Wagner, R.C., Logan, B.E. (2009). Hydrogen production by Geobacter species and a mixed consortium in a microbial electrolysis cell. *Appl. Environ. Microbiol., 75*(24):7579–7587.

Carmona, M.A.A., Trably, E., Milferstedt, K., Lacroix, R., Etcheverry, L., Bernet, N. (2015). Long-term continuous production of H_2 in a microbial electrolysis cell (MEC) treating saline wastewater. *Water research*, 81:149-156.

Carrillo, R.J., Celis, L.B., Alatriste, M.F., Razo F.E. (2012). Different start-up strategies to enhance biohydrogen production from cheese whey in UASB reactors. *International Journal of Hydrogen Energy,* 37:5591-5601

Carrillo Reyes J. (2013). Producción de hidrógeno en reactores de biomasa fija, implicaciones de microorganismos hidrogenotróficos. Tesis de doctorado, Instituto potosino de investigación científica y tecnológica. División de ciencias ambientales.

Carrillo, R.J., Celis, L.B., Alatriste, M.F., Razo F.E. (2014). Decreasing methane production in hydrogenogenic UASB reactors fed with cheese whey. *Biomass and bioenergy,* 63:101-108.

Carrillo, R.J., Celis, L.B., Alatriste, M.F., Montoya, L., Razo F.E. (2014). Strategies to cope with methanogens in hydrogen producing UASB reactors: Community dynamics. *International Journal of Hydrogen Energy,* 1-10.

Chae, K.J., Choi, M.J., Lee, J., Ajayi, F.F., Kim, I.S. (2008). Biohydrogen production via biocatalyzed electrolysis in acetate-fed bioelectrochemical cells and microbial community analysis. *International Journal of Hydrogen Energy,* 33:5184–5192.

Chae, K.J., Choi, M.J., Kim, K.Y., Ajayi, F.F., Chang, I.S., Kim, I.S. (2010). Selective inhibition of methanogens for the improvement of biohydrogen production in microbial electrolysis cell. *International Journal of Hydrogen Energy*, 35(24):13379–13386.

Cheng, S., & Logan, B.E. (2007). Sustainable and efficient biohydrogen production via electrohydrogenesis. *PNAS, 104*(47):18871–18873.

Cheng, S., & Logan, B.E. (2011). High hydrogen production rate of microbial electrolysis cell (MEC) with reduced electrode spacing. *Bioresource Technology,* 102(3):3571–3574.

Cota, N. C.B., Carrillo, R.J., Davila V.G., Alatriste, M.F., Razo F.E. (2011). Continuous hydrogen and methane production in a two-stage cheese whey fermentation system. *Water Science and Technology.* 64(2): 367–374.

Das, K.C., García-Nuñez, J.A., García-Pérez, M. (2007). Overview of a biorefinery and opportunities in the Palm Oil Sector. *Palmas*, 28(1):61-69.

Dávila-Vazquez, G., Alatriste, M.F., De León, R.A., Razo, F.E. (2008). Fermentative hydrogen production in batch experiments using lactose, cheese whey and glucose: Influence of initial substrate concentration and pH. *International Journal of Hydrogen Energy,* 33:4989-4997.

Dávila-Vazquez, G., Cota, N. C.B., Rosales, C.L.M., De León R.A., Razo F.E. (2009). Continuous biohydrogen production using cheese whey: Improving the hydrogen production rate. *International Journal of Hydrogen Energy,* 34:4296-4304.

Davila, V.G., De León R.A., Alatriste, M.F., Razo F.E. (2011). The buffer composition impacts the hydrogen production and the microbial community composition in non-axenic cultures. *Biomass and Bioenergy*, 35:3174-3181.

Ditzig, J., Liu, H., Logan, B.E. (2007). Production of hydrogen from domestic wastewater using a bioelectrochemically assisted microbial reactor (BEAMR). *International Journal of Hydrogen Energy, 32*(13):2296 – 2304.

Edenhofer, O., Pichs-Madruga, R., Sokon,a Y., Seyboth, K., Matschoss, P., Kadner, S., Zwickel, T., Eickemeier, P., Hansen, G., Schlömer, S., & von Stechow, C. 2011. "Resumen para responsables de políticas", en el Informe especial sobre fuentes de energía renovables y mitigación del cambio climático del Panel Intergubernamental de Expertos en el Cambio Climático (IPCC), Cambridge University Press, Cambridge, Reino Unido, y Nueva York, Nueva York, Estados Unidos de América. Pp. 7-10.

Escapa, A., Lobato, A., García. D.M., Morán, A. (2013). Hydrogen production and COD elimination rate in a continuous microbial electrolysis cell: the Influence of hydraulic retention time and applied voltage. *Environmental Progress & Sustainable* Energy, 32(2):263-268.

Franks, A.E., Nevin, K.P. (2010). Microbial fuel cells, a current review. *Energies*, 3:889-919.

Heidrich, E.S., Dolfing, 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(15): 6979-6989.

Hu, H., Fan, Y., Liu, H. (2008). Hydrogen production using single-chamber membrane-free microbial electrolysis cells. *Water Research, 42*(15):4172-4178.

Jeremiasse, A.J., Hamelers, H.V.M., Saakes, M., Buisman, C.J.M. (2010). Ni foam cathode enables high volumetric H_2 production in a microbial electrolysis cell. *International Journal of Hydrogen Energy,* 35(23):12716-12723.

Jia, Y.H., Choi, J.Y., Ryu, J.H., Kim, C.H., Lee, W.K., Tran, H T., Ahn, D.H. (2010). Hydrogen production from wastewater using a microbial electrolysis cell. *Korean Journal of Chemical Engineering*, *27*(6):1854-1859.

Kadier, A., Simayi, Y., Kalil, M.S., Abdeshahian, P., Hamid, A.A. (2014). A review of the substrates used in microbial electrolysis cells (MECs) for producing sustainable and clean hydrogen gas. *Renewable Energy,* 71:466-472.

Kiely, P.D., Regan, J.M., Logan, B.E. (2011). The electric picnic: synergistic requirements for exoelectrogenic microbial communities. *Current Opinion in Biotechnology,* 22:378–385

Kreith, F. & Goswami, D.Y. 2007. "Handbook of Energy Efficiency and Renewable Energy", CRC Press Taylor & Francis Group, Coba Raton, Florida.pp. 25-10.

Lalaurette, E., Thammannagowdab, S., Mohagheghib A., Manessb P.C., Logan, B.E. (2009). Hydrogen production from cellulose in a two-stage process combining fermentation and electrohydrogenesis. *International Journal of Hydrogen Energy,* 34:6201-6210.

Lee, H.S., Rittmann, B.E. (2009). Evaluation of metabolism using stoichiometry in fermentative biohydrogen. *Biotechnology and Bioengineering*, 102(3):749-758.

Lee, S. & Shah, Y.T. (2013). "Biofuels and Bioenergy: Processes and Technologies", CRC Press Taylor & Francis Group, Boca raton, Florida. Pp. 1-2.

Li, Y.C., Chu, C.Y., Chien, W.C., Chang, P.L., Hsu, C.W., Wu, S.Y. (2013) Determination of developing trend for a novelty microbial electrolysis cell by a modified inventive problem solving approach. *International Journal of Hydrogen Energy,* 38:15830-15835.

Liu, H., Grot, S., Logan, B.E. (2005). Electrochemically assisted microbial production of hydrogen from acetate. *Environmental science & technology,* 39(11), 4317-4320.

Liu, H., Hu, H., Chignell, J., Fan, Y. (2010). Microbial electrolysis: novel technology for hydrogen production from biomass. *Biofuels*, 1(1):129-142. .

Logan, B.E., Call, D., Cheng, S., Hamelers, H.V., Sleutels, T.H., Jeremiasse, A.W., Rozendal, R.A. (2008). Microbial electrolysis cells for high yield hydrogen gas production from organic matter. *Environmental Science & Technology,* 42(23):8630-8640.

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

Lovley, D.R. (2012). Electromicrobiology. *Annu. Rev. Microbiol.,* 66:391-409.

Lu, L., Ren, N., Xing, D., Logan, B.E. (2009). Hydrogen production with effluent from an ethanol-H2-coproducing fermentation reactor using a single-chamber microbial electrolysis cell. *Biosens. Bioelectron, 24*:3055–3060.

Masera, O., Coralli, F., García, C., Riegelhaupt, E., Arias, T., Vega, J., Díaz, R., Guerrero, G., Cecotti, L. (2011). "La bioenergía en México. Situación actual y perspectivas", Red Mexicana de Bioenergía, A.C., México. Pp. 7-8.

Nam, J.Y. & Logan, B.E. (2012). Optimization of catholyte concentration and anolyte pHs in two chamber microbial electrolysis cells. International Journal of Hydrogen Energy, 37, 18622-18628.

Parameswaran, P., Zhang, H., Torres, C,I,, Rittmann, B.E., Krajmalnik-Brown, R. (2009). Microbial community structure in a biofilm anode fed with a fermentable substrate: the significance of hydrogen scavengers. *Biotechnol Bioeng,* 105:69-78.

Paz Mireles C.L. (2014). Estudio de Inóculos para la Producción de Biohidrógeno en Celdas de Electrólisis Microbianas. Tesis de licenciatura, Universidad Autónoma de San Luís Potosí, Facultad de Ciencias Químicas.

Prescott, L.M., Harley, J.P., Klein, D.A. 2002. "Microbiology", Fifth ed. McGraw-Hill, Boston.

Rabaey, K., Girguis, P., Nielsen, L.K. (2011). Metabolic and practical considerations on microbial electrosynthesis. *Current Opinion in Biotechnol.*, 22:371-377.

Rivera Alvarez, I. (2014). Generación de hidrógeno en una celda de electrólisis microbiana alimentada con ácidos grasos volátiles. Tesis de maestría, Universidad nacional autónoma de México. Programa de maestría y doctorado en ingeniería ambiental-agua.

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., Hamelers, H.V.M., Buisman, C.N.J. (2006). Effects of Membrane Cation Transport on pH and Microbial Fuel Cell Performance. *Environ. Sci. Technol.* 40:5206-5211.

Rozendal, R.A. (2007). Hydrogen production through biocatalyzed electrolysis. Tesis de doctorado. Wageningen University, Wageningen, the Netherlands.

Rozendal, R.A., Jeremiasse, A.W., Hamelers, H.V., Buisman, C.J. (2008). Hydrogen production with a microbial biocathode. *Environmental science & technology,* 42(2):629-634.

Ruiz, V., Ilhanb, Z.E., Kang, D.W., Krajmalnik, B. R., Buitrón G. (2014). The source of inoculum plays a defining role in the development of MEC microbial consortia fed with acetic and propionic acid mixtures. *Journal of Biotechnology*, 182-183:11-18.

Selembo, P.A., Perez, J.M., Lloyd, W.A., Logan, B.E. (2009). High hydrogen production from glycerol or glucose by electrohydrogenesis using microbial electrolysis cells. *International journal of hydrogen energy*, *34*(13):5373-5381.

Sobieszuk, P., Zamojska-Jaroszewicz, A., Kołtuniewicz, A. (2012). Harvesting energy and hydrogen from microbes. *Chemical and Process Engineering,* 33(4):603-610.

Sun, Z.Y., Liu, F.S., Liu, X.H., Sun, B.G., Sun, D.W. (2012). Research and development of hydrogen fuelled engines in China. *International Journal of Hydrogen Energy,* 37(1):664-681.

Teng, S.X., Tong, Z.H., Li W.W., Wang, S.G., Sheng, G.P., Shi, X. Y., Liu, X. W., Yu, H.Q. (2010). Electricity generation from mixed volatile fatty acids using microbial fuel cells. *Appl Microbiol Biotechnol*, 87:2365-2372.

Torres, I.C., Lee, H.S., Rittmann, B. (2009). Carbonate species as OH(-) carriers for decreasing the pH gradient between cathode and anode in biological fuel cells. *Environmental Science and Technology*, 42(23):8773-8777.

Tuna, E., Kargi, F., Argun, H. (2009). Hydrogen gas production by electrohydrolysis of volatile fatty acid (VFA) containing dark fermentation effluent. *International Journal of Hydrogen Energy*, 34:262-269.

Uyar, B., Eroglu, I., Yücel, M., Gündüz, U. (2009). Photofermentative hydrogen production from volatile fatty acids present in dark fermentation effluents. *International Journal of Hydrogen Energy,* 34:4517-4523.

Vázquez, D.R. & Quintero, R.R. 2004. "Petroleum Biotechnology Developments and Perspectives". Elsevier, Paises bajos.

Velasco, N.A., González, I., Damian, P.M., Gutiérrez, G.R. (2011). Enhanced hexadecane degradation and low biomass production by Aspergillus niger exposed to an electric current in a model system. *Bioresource Technology*, 102:1509–1515.

Verea Valladares, L.E. 2014. Caracterización y optimización de una celda de electrólisis microbiana para la producción de hidrógeno. Tesis de maestría, Universidad nacional autónoma de México. Instituto de energías renovables.

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

Wu, T., Zhu, G., Jha, A.K., Zou, R., Liu, L., Huang, X., Liu, C. (2013)**.** Hydrogen production with effluent from an anaerobic baffled reactor (ABR) using a singlechamber microbial electrolysis cell (MEC). *International Journal of Hydrogen Energy*, 38:11117-11123.