



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

CELIDAS ELECTROQUÍMICAS MICROBIANAS PARA LA PRODUCCIÓN DE HIDRÓGENO
A PARTIR DE LOS PRODUCTOS DE LA FERMENTACIÓN DE AGUAS RESIDUALES

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

PRESENTA:
M. EN I. VIANEY RUIZ LÓPEZ

TUTOR PRINCIPAL
DR. GERMÁN BUITRÓN MÉNDEZ, INSTITUTO DE INGENIERÍA
COMITÉ TUTOR
DRA. GEORGINA FERNÁNDEZ VILLAGÓMEZ, FACULTAD DE INGENIERÍA
DRA. KATY JUÁREZ LÓPEZ, INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA

MÉXICO, D.F. NOVIEMBRE 2014

JURADO ASIGNADO:

Presidente: Dra. Georgina Fernández Villagómez

Secretario: Dra. Bibiana Cercado Quezada

Vocal: Dra. Katy Juárez López

1er. Suplente: Dr. Germán Buitrón Méndez

2do. Suplente: Dr. Pedro Roquero Tejeda

Lugar donde se realizó la tesis:

INSTITUTO DE INGENIERÍA, UNAM. Laboratorio de Investigación en Procesos Avanzados de Tratamiento de Aguas, Unidad Académica del Instituto de Ingeniería. Campus UNAM Juriquilla, QRO.

TUTOR DE TESIS:

DR. GERMÁN BUITRÓN MÉNDEZ

FIRMA

Esta investigación fue financiada por el proyecto de Fondos Internacionales del Instituto de Ingeniería, DGAPA (PAPIIT IN104710).

Se agradece a la Coordinación de Estudios de Posgrado (CEP) de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) por la beca otorgada para la realización de los estudios de doctorado.

Se agradece también al Swette Center for Environmental Biotechnology de la Arizona State University, por las facilidades otorgadas para la realización de una estancia de investigación.

Además se agradece a Gloria Moreno Rodríguez y Jaime Moreno Pérez Trevilla del Laboratorio de Investigación en Procesos Avanzados de Tratamiento de Aguas (LIPATA) por el soporte técnico recibido durante los análisis químicos y biológicos.

AGRADECIMIENTOS

A mis padres, quienes siempre me han impulsado a superarme y cumplir todas mis metas y sueños. Muchas gracias por sus consejos y por respetar cada una de las decisiones que he tomado, buenas o malas. Gracias por los abrazos y cariño que día con día me entregan, a pesar de la distancia siempre están en mis pensamientos y mi corazón.

A mis hermanos Nelly y Ubaldo, por ser el ejemplo a seguir, mis grandes amigos y cómplices.

A Hiro, mi nuevo compañero de vida, gracias por tu paciencia durante todos estos años y por siempre estar conmigo a pesar de la distancia. Gracias por tu cariño, tus consejos y por impulsarme a ser una mejor persona día con día.

A mi asesor, el Dr. Germán Buitrón Méndez, por sus consejos y apoyo durante la realización de este proyecto de investigación.

A los miembros de mi comité tutorial, las Dras. Georgina Fernández Villagómez y Katy Juárez López, por el apoyo y sugerencias recibidas cada semestre para mejorar el proyecto. Así como también a la Dra. Bibiana Cercado Quezada y al Dr. Pedro Roquero Tejeda, por su revisión y valiosos comentarios para mejorar este documento.

A mis compañeros de laboratorio por hacer más amena la estancia en el LIPATA.

A la Dra. Rosa Krajmalnik-Brown, el Dr. Cesar Torres, a Esra Zehra, al Dr. Kang Dae-Wook y al Dr. Prathap Parameswaran, por su apoyo y enseñanzas durante la realización de mi estancia de investigación.

A todas aquellas personas que han compartido conmigo su cariño y amistad durante algún momento de mi vida, aún cuando no están conmigo físicamente, siempre las recuerdo con alegría.

El presente proyecto tuvo como objetivo acoplar un sistema Fermentador-Celda Electroquímica Microbiana-Celda de Combustible Microbiana para utilizar los ácidos grasos volátiles contenidos en el efluente del fermentador y generar una cantidad adicional de hidrógeno. La energía necesaria para llevar a cabo las reacciones de óxido-reducción de la Celda Electroquímica Microbiana (CEM) fue suministrada por medio de una Celda de Combustible Microbiana (CCM), volviendo autosustentable el proceso global.

El trabajo de investigación se dividió en varias etapas experimentales, las cuales consistieron en utilizar un agua residual sintética conteniendo una mezcla de ácido acético, propiónico y butírico como sustrato adicionado en la cámara anódica de las CEMs, el uso del efluente de un fermentador y finalmente el acoplamiento del sistema.

Como primera etapa experimental se realizaron pruebas utilizando una mezcla de ácido acético y propiónico a diferentes concentraciones y combinaciones, arregladas en un diseño experimental central compuesto, para conocer el efecto de ambos ácidos en la producción de hidrógeno y la dinámica poblacional en las CEMs. El estudio se realizó utilizando celdas con una configuración de dos cámaras operadas en lotes e inoculadas con agua residual. Se midieron las concentraciones de ambos ácidos al inicio y final de cada ciclo de operación, la demanda química de oxígeno, el volumen de biogás producido en la cámara catódica de las celdas y la concentración de hidrógeno para dar seguimiento al proceso de tratamiento. Al final de esta etapa experimental se removió la biopelícula adherida en la superficie del ánodo de las celdas y se realizó la caracterización de las comunidades de bacterias anodofílicas por medio de las técnicas de pirosecuenciación y PCR en tiempo real. Bajo las condiciones estudiadas, se obtuvo una producción máxima de hidrógeno de 265 mL/d/L_{reactor} y una tasa de rendimiento máxima de 33.62 mmolH₂/gDQO_{rem} cuando se utilizó una mezcla de ácido acético en una concentración de 1500 mg/L y ácido propiónico de 250 mg/L. Ambos ácidos fueron removidos eficientemente con un porcentaje total de hidrógeno recuperado en el cátodo de las CEMs del 53.8% (moles de hidrógeno producidos en el cátodo de las celdas con respecto a los moles teóricos totales de hidrógeno producidos con base en la materia orgánica removida). Los análisis estadísticos demostraron que no existe un efecto significativo de estos ácidos en el funcionamiento de las celdas. Además, por medio de los análisis microbiológicos realizados se comprobó que la ecología microbiana y en específico la diversidad bacteriana tienen un efecto significativo en la eficiencia de las celdas, siendo un factor importante la fuente de inóculo y la presencia y abundancia de ciertas especies en el rendimiento de las mismas.

Posteriormente, se realizaron pruebas utilizando una mezcla de ácido acético, propiónico y butírico adicionadas como fuente de sustrato en la cámara anódica de las CEMs. Los resultados mostraron que al utilizar esta mezcla, el ácido propiónico se remueve en un mayor porcentaje seguido del ácido butírico y finalmente el ácido acético. Las mejores eficiencias se presentaron cuando se utilizó únicamente una mezcla de ácido acético y ácido butírico como sustrato, debido a que al adicionar el ácido propiónico existe una mayor probabilidad de generar metano u otros subproductos durante el tratamiento.

Finalmente, se llevaron a cabo pruebas adicionando el efluente de un fermentador en las CEMs. La energía requerida por las CEMs se adicionó en dos diferentes formas, la primera de ellas por medio de una fuente de poder y la segunda por medio de una CCM, esto con el objeto de comparar los rendimientos de las celdas en ambos casos y poder recomendar el uso del sistema acoplado para pruebas posteriores. Durante esta etapa se observó que las CEMs pueden ser utilizadas eficientemente como sistema de post tratamiento del efluente del fermentador. Los mejores resultados se obtuvieron cuando se utilizó una mezcla de efluente con buffer de fosfatos en una relación 50:50, debido a que de esta manera se regulan adecuadamente las variaciones de pH y con ello se evitan problemas posteriores en el funcionamiento de la membrana de intercambio iónico y efectos dañinos en la microbiota adherida al ánodo que pueden llegar a ser irreversibles si no se controlan a tiempo. Además, se comprobó que al utilizar una CCM puede adicionarse la energía necesaria para llevar a cabo el proceso en la CEM, siendo comparables e inclusive mejores en algunos casos los resultados obtenidos con el sistema acoplado, con respecto a los registrados al utilizar una fuente de poder como suministro de energía.

This project had as main objective to coupling a dark fermentation-microbial electrolysis cell-microbial fuel cell system to use the volatile fatty acids contained in the effluent from the dark fermentation system and generate an additional amount of hydrogen. The energy required to perform the redox reactions in the microbial electrolysis cell (MEC) was supplied by a microbial fuel cell (MFC), becoming self-sustaining the overall process.

The research was divided into several experimental stages, which consisted of using a synthetic wastewater containing a mixture of acetic, propionic and butyric acids as substrate added in the anode chamber of the MECs, the use of an effluent from a dark fermentation system and finally the coupling of the system.

As a first experimental step, tests were conducted using a mixture of acetic and propionic acids at different concentrations and combinations, arranged in a central composite design, to determine the effect of both acids in hydrogen production and population dynamics in the MECs. The study was performed using a two chamber cells in batch operation and inoculated with wastewater. The concentrations of both acids at the beginning and end of each operating cycle, the chemical oxygen demand, volume of biogas produced in the cathode chamber of the cells and the hydrogen concentration were measured in order to follow the treatment process. At the end of this experimental stage, the biofilm adhered on the anode surface of the cells was removed and the characterization of the anodophilic bacterial communities was performed by pyrosequencing and QPCR techniques. Under the conditions studied, a maximum hydrogen production of 265 mL/d/L_{reactor} and maximum hydrogen yield of 33.62 mmolH₂/gCOD_{rem} was obtained when a mixture of acetic acid in a 1500 mg/L concentration and propionic acid of 250 mg/L was used. Both acids were removed efficiently with an overall hydrogen production at the cathode of the MECs of 53.8% (moles of hydrogen produced at the cathode chamber of the MECs with respect to the overall theoretical moles of hydrogen produced by organic matter consumption). Statistical analysis demonstrated that there was not a significant effect of these acids in the performance of the cells. In addition, through the microbiological analyzes conducted it was possible to confirm that the microbial ecology and specifically the bacterial diversity have a significant effect on the efficiency of the cells, being an important factor the source of the inoculum and the presence and abundance of certain species in their performance.

Subsequently, tests were conducted using a mixture of acetic, propionic and butyric acids as a source of substrate in the anode chamber of the MECs. The results showed that by using this mixture, the propionic acid was removed in a higher percentage followed by the butyric acid and finally the acetic acid. The best efficiencies were obtained when only a mixture of acetic and butyric acids was used as substrate, due to the fact that when propionic acid was added, the probability of generate methane or some other byproducts during the treatment increase.

Finally, tests were performed by adding the effluent of a dark fermentation system into the MECs. The energy required for the MECs was added in two different ways, the first one by means of a

power source and the second by a MFC, this in order to compare the performance of the cells in both cases and recommend the use of the coupled system for further experiments. During this stage it was observed that MECs could be used effectively as post treatment system of the effluent generated in a dark fermentation reactor. The best results were obtained when using a mixture of phosphate buffer solution and effluent in a 50:50 ratio, because in this way variations of the pH in the cell can be properly regulated and some later problems in the operation of the ion exchange membrane and toxic effects in the microbiota attached to the anode that can become irreversible if they are not controlled on time, can be avoid. Furthermore, it was found that when using a MFC the energy required by the MEC can be added suitably, being comparable or even better the results obtained by the coupled system with those obtained by using a power source as a power supply.

ÍNDICE

RESUMEN	5
ABSTRACT	7
ÍNDICE	9
LISTA DE FIGURAS	12
LISTA DE TABLAS	15
NOMENCLATURA	16
1. INTRODUCCIÓN	21
2. OBJETIVOS	25
2.1. General	25
2.2. Específicos	25
2.3. Hipótesis	25
2.4. Alcances y limitaciones	26
3. ANTECEDENTES	28
3.1. Proceso de Fermentación Oscura (<i>Digestión anaerobia</i>)	28
3.2. Procesos bioelectroquímicos para la producción de hidrógeno	30
3.2.1. Procesos de transferencia de electrones	32
3.2.2. Características de los electrodos	36
3.2.3. Problemas asociados al funcionamiento de los sistemas	38
3.2.4. Celdas de Combustible Microbianas (CCM)	41
3.2.5. Celdas Electroquímicas Microbianas (CEM)	44
3.3. Sistemas acoplados de producción de hidrógeno	50
4. METODOLOGÍA	55
4.1. Diseño y construcción de la CEM	55
4.2. Primer etapa experimental: Pruebas variando la concentración de ácido acético y ácido propiónico	56
4.2.1. Inoculación y puesta en marcha	56
4.2.2. Pruebas variando las concentraciones de ácido acético y ácido propiónico	57
4.3. Segunda etapa experimental: Pruebas con una mezcla de ácido acético, propiónico y butírico	59
4.3.1. Inoculación y puesta en marcha	59
4.3.2. Pruebas con la mezcla de ácidos	60
4.4. Tercer etapa experimental: Acoplamiento del sistema fermentador-CEM-CCM	61
4.5. Técnicas Analíticas	63

4.5.1. Demanda química de oxígeno (DQO)	63
4.5.2. Determinación de la concentración de gases (H ₂ , CH ₄ y CO ₂)	63
4.5.3. Concentración de ácidos grasos volátiles	63
4.5.4. Extracción del ADN	64
4.5.5. Análisis de pirosecuenciación gen	64
4.5.6. Análisis de PCR en tiempo real	65
4.5.7. Voltamperometría cíclica	66
4.5.8. Cálculos	66
5. RESULTADOS	69
5.1. <i>Primer etapa experimental: Pruebas variando la concentración de ácido acético y ácido propiónico</i>	69
5.1.1. Remoción de materia orgánica medida como DQO	69
5.1.2. Consumo de ácido acético y ácido propiónico en las mezclas	71
5.1.3. Densidad de corriente, eficiencia coulombica y porcentaje total de hidrógeno recuperado	73
5.1.4. Tasas de producción y rendimiento de hidrógeno	77
5.1.5. Análisis de optimización de respuestas múltiples	80
5.1.6. Análisis de ecología microbiana	80
5.1.7. Presencia de <i>homo-acetogénicos</i> , <i>Geobacteraceae</i> y <i>Archaeas</i> en la biopelícula adherida al ánodo de las CEMs	88
5.2. <i>Segunda etapa experimental: Pruebas con una mezcla de ácido acético, propiónico y butírico</i>	92
5.2.1. Remoción de materia orgánica medida como DQO	92
5.2.2. Consumo de ácidos grasos volátiles en las mezclas	93
5.2.3. Densidad de corriente, eficiencia coulombica y porcentaje total de hidrógeno recuperado	96
5.2.4. Tasas de producción y rendimiento de hidrógeno	99
5.3. <i>Tercer etapa experimental: Acoplamiento del sistema fermentador-CEM-CCM</i>	101
5.3.1. Balance energético del proceso	101
5.3.2. Puesta en marcha y operación del sistema acoplado	106
5.3.3. Remoción de materia orgánica medida como DQO	109
5.3.4. Consumo de ácidos grasos volátiles en las mezclas	110
5.3.5. Densidad de corriente, eficiencia coulombica y porcentaje total de hidrógeno recuperado	113
5.3.6. Tasas de producción y rendimiento de hidrógeno	116
6. CONCLUSIONES GENERALES	121
7. RECOMENDACIONES PARA TRABAJOS FUTUROS	125
REFERENCIAS	127
ANEXOS	141

<i>Anexo 1. Análisis estadístico de cada una de las variables de respuesta durante la primer etapa experimental</i>	142
<i>Anexo 2. Datos obtenidos para la diversidad alfa utilizando el programa QIIME 1.6.0 (Pruebas variando la concentración de ácido acético y propiónico)</i>	149
<i>Anexo 3. Productividad académica durante el Proyecto de Investigación</i>	150

LISTA DE FIGURAS

Figura 3.1. Transferencia indirecta de electrones que involucra la oxidación microbiana de los productos generados durante el metabolismo de las bacterias	32
Figura 3.2. Transferencia indirecta de electrones mediante el uso de mediadores electroquímicos	33
Figura 3.3. Transferencia directa de electrones	34
Figura 3.4. Tratamiento del agua residual utilizando sistemas bioelectroquímicos	40
Figura 3.5. Configuración en circuito cerrado de un sistema bioelectroquímico microbiano, en el cual el efluente del ánodo fluye directamente hacia el cátodo	40
Figura 3.6. Esquema representativo del funcionamiento de una CCM	41
Figura 3.7. Esquema representativo del funcionamiento de una CEM	44
Figura 3.8. Esquema representativo del acoplamiento CEM-CCM para la producción de hidrógeno y generación de electricidad	51
Figura 4.1. Diagrama de bloques de la metodología a seguir durante este proyecto de investigación.....	55
Figura 4.2. Prototipo de CEM o CCM utilizado en las diferentes etapas experimentales	56
Figura 5.1. Diagrama de Pareto para el porcentaje de materia orgánica removida como DQO	70
Figura 5.2. Gráfico de superficie de respuesta para el porcentaje de materia orgánica removida como DQO	71
Figura 5.3. Diagramas de Pareto para: (a) el porcentaje de remoción de ácido acético y (b) el porcentaje de remoción de ácido propiónico	72
Figura 5.4. Gráficos de superficie de respuesta para: (a) el porcentaje de remoción de ácido acético y (b) el porcentaje de remoción de ácido propiónico	73
Figura 5.5. Gráfico de superficie de respuesta correspondiente a la densidad de corriente	74
Figura 5.6. Diagrama de Pareto correspondiente a la densidad de corriente	75
Figura 5.7. Gráficos correspondientes a la eficiencia coulombica: (a) Superficie de Respuesta y (b) Diagrama de Pareto	76
Figura 5.8. Gráficos correspondientes al porcentaje total de hidrógeno recuperado en el cátodo de las CEMs: (a) Superficie de Respuesta y (b) Diagrama de Pareto	77
Figura 5.9. Gráficos de superficie de respuesta para: (a) la tasa de rendimiento de hidrógeno y (b) la tasa de producción de hidrógeno	78
Figura 5.10. Diagramas de Pareto para: (a) la tasa de rendimiento de hidrógeno y (b) la tasa de producción de hidrógeno	79
Figura 5.11. Gráfico de superficie de respuesta para la deseabilidad global d_i considerando a las tasas de rendimiento y producción de hidrógeno como las variables a ser optimizadas	80
Figura 5.12. Distribución filogenética de las muestras de biopelícula anódica para el primer y segundo bloques experimentales. A un nivel de <i>filos</i> , hubo una disminución en la abundancia de <i>Firmicutes</i> , <i>Bacteroidetes</i> y <i>Tenericutes</i> en el segundo bloque de experimentos en comparación con el primer bloque. Las <i>Proteobacteria</i> dominaron las comunidades presentes en el segundo bloque de experimentos	82
Figura 5.13. Distribución de los 11 órdenes más abundantes en las muestras de biopelícula adherida a	

los ánodos de las CEMs para el primer y segundo bloques experimentales. A nivel de orden, las muestras del primer bloque de experimentos fueron enriquecidas con <i>Clostridiales</i> en el caso de las <i>Firmicutes</i> y <i>Camplobacteriales</i> y <i>Rhodocyclales</i> en el caso de las <i>Proteobacteria</i>	82
Figura 5.14. Distribución correspondiente a los 10 géneros más abundantes presentes en las muestras de la biopelícula anódica para el primer y segundo bloques experimentales. <i>Azovibrio</i> o <i>Arcobacter</i> fueron los géneros más abundantes en el segundo bloque de experimentos	84
Figura 5.15. Análisis Unifrac sin ponderación para las muestras de biopelícula anódica de las CEMs que fueron operadas con diferentes mezclas de ácido acético y propiónico. Las muestras se agruparon principalmente por el periodo de inoculación. El color verde representa al primer bloque experimental y el azul al segundo bloque experimental	85
Figura 5.16. Análisis de Coordenadas Principales sin ponderación para las muestras de biopelícula anódica de las CEMs. Los números colocados en los puntos representan la producción de H ₂ (mL/d/L _{reactor}). Las muestras fueron agrupadas con base en producciones de hidrógeno similares	86
Figura 5.17. Análisis de Coordenadas Principales ponderadas para el primer y segundo bloques experimentales. El primer bloque de experimentos se encuentra representado en color verde y el segundo bloque en azul. Las muestras del primer bloque se encuentran agrupadas mientras que las del segundo bloque se encuentran dispersas	87
Figura 5.18. Distribución de <i>Geobacteraceae sp.</i> , <i>FTHFS</i> y <i>Bacteria</i> presentes en las muestras de biopelícula anódica (las copias del gen reportadas fueron calculadas con base en el área total del electrodo (50 cm ²))	89
Figura 5.19. Distribución de <i>Archaea</i> de las muestras de biopelícula anódica de las CEMs (el número de copias del gen reportadas se encuentran calculadas con base en el área total de los electrodos (50 cm ²))	90
Figura 5.20. Porcentaje de remoción de materia orgánica medida como DQO durante las pruebas experimentales realizadas con mezclas de ácido acético, propiónico y butírico	92
Figura 5.21. Porcentaje de remoción de ácido acético en las dos CEMs utilizadas	93
Figura 5.22. Porcentaje de remoción de ácido butírico en las CEMs durante los últimos seis ciclos de operación	94
Figura 5.23. Porcentaje de remoción de ácido acético y butírico en la CEM1 durante los doce ciclos de operación	95
Figura 5.24. Porcentaje de remoción de ácido acético, propiónico y butírico en la CEM2 durante los doce ciclos de operación	96
Figura 5.25. Densidad de corriente en mA/m ² obtenida durante la operación de las CEMs	97
Figura 5.26. Eficiencia coulombica de las CEMs durante la fase experimental	98
Figura 5.27. Porcentaje total de recuperación de hidrógeno obtenido durante los diferentes ciclos de operación de las CEMs	98
Figura 5.28. Tasas de rendimiento de hidrógeno alcanzadas en los sistemas experimentales	99
Figura 5.29. Producción de hidrógeno durante los doce ciclos de operación de las CEMs	100
Figura 5.30. Diferentes configuraciones utilizadas para la producción de hidrógeno.....	105
Figura 5.31. Esquema representativo del balance global energético para cada uno de los escenarios analizados	106
Figura 5.32. Voltamperometría cíclica en dirección anódica de una de las CEMs inoculadas; la línea azul corresponde al inicio de la inoculación; la línea roja hace referencia a un punto intermedio del	

periodo de inoculación; la línea verde se obtuvo al final del periodo de inoculación	108
Figura 5.33. Porcentaje de remoción de materia orgánica medida como DQO durante las pruebas realizadas con el efluente de un fermentador	110
Figura 5.34. Concentraciones medidas de ácido acético en el influente y efluente de las CEMs	111
Figura 5.35. Concentraciones medidas de ácido propiónico en el influente y efluente de las CEMs	111
Figura 5.36. Concentraciones medidas de ácido isobutírico en el influente y efluente de las CEMs	112
Figura 5.37. Concentraciones medidas de ácido butírico en el influente y efluente de las CEMs	113
Figura 5.38. Concentraciones medidas de ácido isovalérico en el influente y efluente de las CEMs	113
Figura 5.39. Densidad de corriente en A/m^2 durante las pruebas con el efluente del fermentador	114
Figura 5.40. Eficiencia coulombica de las CEMs durante las pruebas con el efluente del fermentador ...	115
Figura 5.41. Porcentaje total de recuperación de hidrógeno en las CEMs medido en cada uno de los ciclos de operación	116
Figura 5.42. Tasa de rendimiento en $mmolH_2/gDQO_{rem}$ obtenidas en las pruebas con el efluente del fermentador	117
Figura 5.43. Producción de hidrógeno en $mL/d/L_{reactor}$ durante las pruebas realizadas con el efluente de un fermentador	117

LISTA DE TABLAS

Tabla 3.1. Resultados obtenidos utilizando CCMs con diferentes características	45
Tabla 3.2. Resultados obtenidos utilizando CEMs para la generación de hidrógeno	48
Tabla 3.3. Investigaciones realizadas hasta la fecha utilizando sistemas acoplados	53
Tabla 4.1. Matriz del diseño experimental variando las concentraciones de ácido acético y ácido propiónico	57
Tabla 4.2. Concentraciones de ácido acético, propiónico y butírico utilizadas en la solución anódica de las Celdas Electroquímicas Microbianas en mg/L	60
Tabla 4.3. Sondas y primers utilizados durante los diferentes análisis realizados de PCR	65
Tabla 5.1. Resultados obtenidos durante los dos bloques experimentales para cada una de las variables de respuesta seleccionadas	69
Tabla 5.2. Balance global energético en tres sistemas diferentes de producción de hidrógeno	106
Tabla 5.3. Concentraciones promedio en mg/L de los ácidos grasos presentes en el efluente del fermentador	109
Tabla 5.4. Resultados de la operación de la CCM utilizada para adicionar el voltaje a la CEM1	109

NOMENCLATURA

ABREVIATURA	DESCRIPCIÓN
CCM	Celda de Combustible Microbiana
CEM	Celda Electroquímica o de Electrólisis Microbiana
DQO	Demanda Química de Oxígeno
S	Sustrato
DBO	Demanda biológica de oxígeno
TRH	Tiempo de Retención Hidráulico
NHE	Electrodo normal de hidrógeno
CEM	Membrana de éster de celulosa
AEM	Membrana de intercambio aniónico
PEM	Membrana de intercambio protiónico
EC	Eficiencia coulombica
NJ	New Jersey
MA	Massachussets
NTA	Ácido Nitrotriacético
CCD	Diseño Central Compuesto
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
AGV	Ácido graso volátil
DC	Densidad de corriente
SBR	Reactor biológico secuencial
ADN	Ácido desoxirribonucleico
QUIIME	Quantitative Insights into Microbial Ecology
OTU	Unidades taxonómicas operacionales
PyNASt	Python Nearest Alignment Space Termination tool
RDP	Ribosomal Database Project
MBT	<i>Methanobacteriales</i>
MMB	<i>Methanomicrobiales</i>
MSC	<i>Methanosarcinaceae</i>
MST	<i>Methanosaetaceae</i>
FTHFS	Formil tetrahidrofolato sintetasa
PCoA	Análisis de coordenadas principales
BIOM	Biological Observation Matrix
NCBI	National Center of Biotechnology Information
LIPATA	Laboratorio de Investigación en Procesos Avanzados de Tratamiento de Aguas
SBR	Reactor Discontinuo Secuencial, por sus siglas en inglés
BES	Bromoetilsulfonato

SÍMBOLO	DESCRIPCIÓN
H ₂	Hidrógeno
C ₆ H ₁₂ O ₆	Glucosa
H ₂ O	Agua
CH ₃ COOH	Ácido acético
CO ₂	Dióxido de carbono
CH ₃ CH ₂ CH ₂ COOH	Ácido butírico
HCO ₃ ⁻	Bicarbonato

pO_2	Presión parcial del oxígeno
CH_3COO^-	Acetato
H^+	Protón
e^-	Electrón
O_2	Oxígeno
ΔG	Cambio de energía de Gibbs
fem	Fuerza electromotriz
H_2S	Ácido sulfhídrico
HS^-	Bisulfuro
TiO_2	Óxido de titanio
pH	Potencial de hidrógeno
$CaCO_3$	Carbonato de calcio
ΔE	Diferencia de potencial
Ag/AgCl	Plata/Cloruro de plata
Pt	Platino
Ti	Titanio
NiMo	Níquel-Molibdeno
NiW	Níquel-Tungsteno
NiO	Óxido de níquel
I_A	Densidad de corriente
r_{H_2}	Porcentaje total de hidrógeno recuperado
n_w	Eficiencia energética
Q_{H_2}	Tasa de producción de hidrógeno
E_N	Energía Neta
E_{H_2}	Energía recuperada equivalente al volumen de hidrógeno generado
E_C	Energía necesaria para calentar el reactor
T_a	Temperatura ambiente
T_f	Temperatura de fermentación
V	Volumen
C	Concentración
V_{H_2}	Volumen de hidrógeno
LHV	Poder calorífico inferior
ρ_{H_2O}	Densidad del agua
ρ_{H_2}	Densidad del hidrógeno
T_f	Temperatura final
T_c	Temperatura de calentamiento
W_E	Energía adicionada al circuito por una fuente de poder
R_{ext}	Resistencia externa
E_{ap}	Voltaje aplicado
Δt	Incremento del tiempo
n	Número de datos
W_s	Cantidad de energía adicionada por el sustrato
ΔH_s	Calor de combustión del sustrato
n_s	Moles de sustrato
n_E	Eficiencia energética
n_{H_2}	Moles de hidrógeno
ΔH_{H_2}	Calor de combustión del hidrógeno
N_s	Eficiencia energética con respecto al sustrato
n_{E+s}	Energía promedio recuperada

Y_{H_2}	Tasa de rendimiento de hidrógeno
M	Peso molecular
F	Constante de Faraday
b	Número de moles intercambiados por mol de O_2
v_{NA}	Volumen de solución anódica
ΔDQO	Remoción de materia orgánica
t	Tiempo
P_v	Potencia volumétrica
dt	Diferencial del tiempo
v/v	Volumen/ Volumen
NH_4Cl	Cloruro de amonio
KCl	Cloruro de potasio
$NaH_2PO_4 \cdot H_2O$	Fosfato monosódico hidratado
Na_2HPO_4	Fosfato disódico
NaCl	Cloruro de sodio
$MgSO_4$	Sulfato de magnesio
$MnSO_4 \cdot H_2O$	Sulfato de manganeso hidratado
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	Sulfato de hierro heptahidratado
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	Cloruro de calcio dihidratado
$CoCl_2 \cdot 6H_2O$	Cloruro de cobalto hexahidratado
$ZnCl_2$	Cloruro de zinc
$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	Sulfato de cobre heptahidratado
$AlK(SO_4)_2 \cdot 12H_2O$	Sulfato de aluminio y potasio dodecahidratado
H_3BO_3	Ácido bórico
Na_2MoO_4	Molibdato de sodio
$NiCl_2 \cdot 6H_2O$	Cloruro de níquel hexahidratado
$Na_2WO_4 \cdot 2H_2O$	Wolframato de sodio dihidratado
B12	Cianocobalamina o Vitamina B12
H_2	Hidrógeno
N_2	Nitrógeno
CH_4	Metano
d_i	Deseabilidad
HCl	Ácido clorhídrico
y_i	Variable de respuesta
NaOH	Hidróxido de sodio
N	Normal
DQO_{rem}	Demanda Química de Oxígeno removida
A	Área
V_{celda}	Volumen de la celda
n_{th}	Moles teóricos totales de hidrógeno
n_{CE}	Moles de hidrógeno recuperados calculados con base en la corriente medida
I	Corriente
PM_{O_2}	Peso molecular del oxígeno
p_{value}	Valor p
R^2	Coeficiente de determinación
Cp	Calor específico

UNIDAD	DESCRIPCIÓN
MJ	Mega Joule
kg	Kilogramos
g	Gramos
L	Litros
h	Hora
°C	Grados centígrados
atm	Atmósfera
kW	Kilowatts
V	Volt
mM	Milimolar
K	Kelvin
kJ	Kilo Joule
A	Ampere
m ²	Metros cuadrados
cm	Centímetros
m ³	Metros cúbicos
μW	Microwatts
W	Watts
mS	Milisiemens
mg	Miligramos
mW	Miliwatts
d	Días
cm ²	Centímetros cuadrados
mL	Mililitros
mV	Milivolt
mA	Miliampere
Ω	Ohm
kΩ	Kilo ohm
J	Joule
s	Segundo
C	Coulomb
W	Watt
mmol	Milimol
min	Minutos
nm	Nanómetros
μm	Micrómetros
kPa	Kilopascal
μL	Microlitros
ng	Nanogramos
bps	Pares de bases

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

El uso constante de combustibles fósiles ha generado grandes daños de contaminación ambiental, por ello en la actualidad, varias investigaciones se han enfocado en la búsqueda de energías más limpias y renovables, como por ejemplo el hidrógeno, el cual no es una fuente energética directa (por lo que se le denomina vector energético), pero la energía que logra desprenderse de la combustión de un motor que funciona a base de él llega a ser tres veces más potente que la producida por un motor a gasolina. El hidrógeno puede ser producido mediante métodos químicos, electroquímicos, como subproducto del procesamiento de aceite/carbón o por métodos biológicos como la Biofotólisis (directa o indirecta), Foto-Fermentación o Fermentación Oscura (Valdez-Vázquez *et al.*, 2005 *a y b*). Ha cobrado interés el realizar el acoplamiento estos procesos al tratamiento de aguas, es decir, considerar el agua residual como materia prima para obtener hidrógeno y agua limpia que pueda reutilizarse.

El hidrógeno es considerado un importante vector energético, debido a su alto poder calorífico (120 MJ/kg comparado con la gasolina la cual tiene un contenido de energía de 44 MJ/kg), su facilidad de transportación y el hecho de que puede obtenerse mediante tecnologías que no generan compuestos tóxicos para el ambiente, como aquellas que son utilizadas para el procesamiento de combustibles fósiles. Además del uso que se le puede dar como combustible, también puede ser utilizado como materia prima en diversos procesos de la industria química y puede ayudar en la desintoxicación de una amplia gama de contaminantes del agua. También es considerado como el donador de electrones ideal para reducir compuestos como nitrato, perclorato, selenato y una gran gama de otros compuestos oxidantes que se encuentran presentes en aguas contaminadas. Así pues, debido a estos múltiples usos que tiene el hidrógeno, se considera a la industria de su producción como un sector consolidado y en aumento.

Las aguas residuales industriales, domésticas y de la agricultura, contienen diversos compuestos orgánicos disueltos que requieren ser removidos antes de ser descargadas al ambiente (Agnent *et al.*, 2004). Comúnmente, estos contaminantes orgánicos se remueven utilizando tratamientos aerobios, los cuales consumen grandes cantidades de energía eléctrica debido a los dispositivos de aireación con los que cuentan, convirtiéndolas en tecnologías costosas. Sin embargo, se ha reconocido el hecho de que estas aguas residuales pueden ser utilizadas como un recurso renovable para la producción de biogás (Lettinga, 1980), electricidad (Pham *et al.*, 2006), combustibles (Aiyuk *et al.*, 2006) y recientemente en químicos (Rozendal, 2008a), además del tratamiento de las mismas.

De las diversas tecnologías que se pueden aplicar para obtener hidrógeno de manera biológica, la más utilizada y probada a gran escala es la Fermentación Oscura. En años recientes, grandes avances se han presentado en cuanto a la generación de hidrógeno mediante esta técnica. Entre

ellos se encuentran el estudio de diferentes configuraciones de los reactores, el uso de diferentes cultivos microbianos y variaciones en los parámetros operacionales para encontrar las condiciones óptimas a las cuales se genere la mayor cantidad de hidrógeno. Entre las ventajas que presenta esta tecnología con respecto a otras, se mencionan las siguientes: tiempos cortos de reacción, tolerancia a variaciones operacionales, tiempos de retención hidráulica cortos (TRH) y se considera una tecnología mediante la cual se pueden obtener combustibles de una manera limpia (*Lise et al., 2008*).

Sin embargo, aún cuando teóricamente se pueden generar 12 moles de hidrógeno por cada mol de glucosa, realmente se produce una mezcla de ácidos grasos volátiles, alcoholes e hidrógeno. El máximo rendimiento observado en fermentadores es de 4 moles de hidrógeno por cada mol de glucosa, cuando se obtiene ácido acético como producto primario de la Fermentación (*Hallenbeck y Ghosh, 2009*). Esta producción tan baja se debe a que durante el proceso de Fermentación, algunas arqueobacterias metanogénicas pueden consumir cierta cantidad de hidrógeno y, además a las limitaciones termodinámicas que no permiten el que se lleven a cabo de manera espontánea algunas de las reacciones involucradas en el proceso. Debido a estas limitaciones, la mayoría del sustrato es convertido a productos secundarios como ácidos grasos volátiles, los cuales podrían ser transformados posteriormente a hidrógeno. La Fermentación Oscura por sí sola no es capaz de lograr esto, por ello, se han realizado estudios que permitan encontrar una tecnología que pueda unirse a este sistema, de tal manera que ayude a completar las reacciones de transformación de los ácidos grasos volátiles presentes en el efluente generado de la fermentación a hidrógeno.

Una de las alternativas son los llamados sistemas bioelectroquímicos los cuales son una tecnología relacionada con el uso de Celdas de Combustible Microbianas (CCM) o Celdas Electroquímicas Microbianas (CEM) (*Rabaey y Verstraete, 2005*). Estos sistemas bioelectroquímicos utilizan microorganismos electroquímicamente activos (también conocidos como bacterias anodófilas), que convierten la materia orgánica disuelta en bicarbonato, protones y electrones. Estos últimos son transferidos hacia la superficie de un electrodo para generar una corriente eléctrica (*Kim et al., 1999 a*). Acoplado este ánodo biológico a un cátodo reductor de protones por medio de una fuente de energía eléctrica, se puede transformar la materia orgánica disuelta en hidrógeno (*Ditzing et al., 2007*).

Diversas investigaciones se han realizado hasta la fecha probando las tres tecnologías mencionadas con anterioridad (Fermentación Oscura, Celdas de Combustible Microbiana y Celdas Electroquímicas Microbianas) de manera individual y algunas como sistemas acoplados, observándose que al ensamblar los sistemas puede mejorarse la eficiencia en cuanto a la producción de hidrógeno.

Hasta el momento únicamente se han realizado pruebas conectando dos de estos sistemas, ya sea, Fermentación Oscura-CEM ó CEM-CCM, obteniéndose resultados favorables. Por ello, este

proyecto de investigación se enfoca en realizar estudios exploratorios del acoplamiento de los tres sistemas, Fermentación Oscura-CEM-CCM, con el objeto de explotar los atributos que presentan cada uno de ellos. De tal manera que, sean aprovechados los productos de la fermentación que no han sido transformados a hidrógeno (ácidos grasos), alimentándolos a una CEM para dar paso a la formación de una cantidad adicional de hidrógeno. Además, debido a que las CEMs requieren de energía adicional para llevar a cabo las reacciones de óxido-reducción, se utilizará el voltaje generado mediante CCMs como fuente de energía para la CEM, evitando con ello un costo adicional en el tratamiento global.

CAPÍTULO 2

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

2.1. General

Evaluar el desempeño de celdas electroquímicas microbianas alimentadas con los productos de la fermentación de aguas residuales para la remoción de materia orgánica y la producción simultánea de hidrógeno.

2.2. Específicos

- 1) Identificar, con base en una revisión bibliográfica, los parámetros que afectan el desempeño de las Celdas Electroquímicas Microbianas y Celdas de Combustible Microbianas.
- 2) Diseñar un piloto de Celda Electroquímica Microbiana (CEM) para su utilización en el tratamiento de una mezcla de ácidos grasos volátiles y efluente de un fermentador.
- 3) Evaluar el efecto que tiene el uso de una mezcla de ácido acético y ácido propiónico, con diferentes concentraciones, sobre la producción de hidrógeno y la dinámica poblacional de una Celda Electroquímica Microbiana.
- 4) Determinar el comportamiento de las Celdas Electroquímicas Microbianas al utilizar una mezcla de ácido acético, ácido propiónico y ácido butírico.
- 5) Estimar la factibilidad de utilizar el efluente de un Fermentador en las Celdas Electroquímicas Microbianas para la producción de hidrógeno.
- 6) Evaluar la operación del sistema acoplado (Celda de Combustible Microbiana-Celda Electroquímica Microbiana) en el tratamiento del efluente de Fermentación y producción de hidrógeno.

2.3. Hipótesis

- 1.- Las Celdas Electroquímicas Microbianas pueden ser utilizadas para tratar una mezcla de ácidos grasos volátiles y el efluente de un fermentador para generar hidrógeno.
- 2.- El sistema acoplado Celda Electroquímica Microbiana-Celda de Combustible Microbiana permitirá tratar el efluente proveniente de la Fermentación Oscura de manera eficiente para la generación de hidrógeno.

3.- La Celda de Combustible Microbiana proporcionará la energía necesaria para llevar a cabo las reacciones de óxido-reducción en la Celda Electroquímica Microbiana.

2.4. Alcances y limitaciones

Para cumplir con los objetivos planteados en este proyecto de investigación, se diseñará primeramente un prototipo de Celda Electroquímica Microbiana para realizar las pruebas utilizando como sustrato un agua residual sintética conteniendo una mezcla de ácidos grasos volátiles, con lo cual se encontrarán las mejores condiciones de operación para la producción de hidrógeno.

Posteriormente, se utilizará el efluente de un fermentador, el cual está siendo utilizado en el laboratorio como parte de otro proyecto de investigación, y prototipos de Celdas de Combustible Microbianas como fuente de voltaje; con ello, se realizará el acoplamiento del sistema Celda Electroquímica Microbiana-Celda de Combustible Microbiana y se conocerá su eficiencia en el tratamiento de dicho efluente y generación de hidrógeno.

Como inóculo de las celdas microbianas se utilizará agua residual proveniente de la planta de tratamiento del Campus Juriquilla adicionada con una solución de nutrientes (vitaminas y minerales) y buffer de fosfatos salino.

El monitoreo del tratamiento se realizará mediante la medición de los siguientes parámetros: demanda química de oxígeno (DQO), voltaje, concentración de gases (H_2 , CH_4 y CO_2), concentración de ácidos grasos volátiles y medición del volumen de gas producido.

CAPÍTULO 3

ANTECEDENTES

3. ANTECEDENTES

En este apartado se hace una descripción de dos de los procesos biológicos asociados a la obtención de hidrógeno que resultan de interés para esta investigación (Fermentación oscura y Sistemas Bioelectroquímicos), contemplando aspectos como su principio de operación, componentes del sistema, resultados obtenidos en diferentes investigaciones con el uso de los mismos, ventajas y desventajas y posibles puntos de investigaciones futuras.

3.1. Proceso de Fermentación Oscura (Digestión anaerobia)

El proceso de producción de bio-hidrógeno mediante Fermentación Oscura se lleva a cabo utilizando principalmente dos enzimas, la piruvato ferredoxin hidrogenasa o la piruvato formiato hidrogenasa, y como donador de electrones un compuesto orgánico tal como la glucosa. Debido a que la fuente de los compuestos orgánicos es la biomasa, este proceso puede considerarse como renovable, ya que la biomasa en sí misma es originada a partir de la fotosíntesis.

Las reacciones que se llevan a cabo durante el proceso de fermentación, en el cual se liberan $2e^-$ para formar hidrógeno, pueden ser de dos tipos, la primera ruta es la oxidación del piruvato para formar acetil-CoA y CO_2 y, la segunda de ellas es la oxidación de piruvato a formiato y CO_2 .

Las bacterias anaerobias que participan en este proceso pueden clasificarse ya sea como anaerobias estrictas o facultativas. Algunas especies representativas de las primeras son *Clostridium*, *Ethanoligenens* y *Desulfovibrio*, mientras que, las especies *Enterobacter*, *Citrobacter*, *Klebsiella*, *Escherichia coli* y *Bacillus* son representativas de las segundas.

Las bacterias anaerobias estrictas obtienen los electrones mediante la oxidación del piruvato; estos son transferidos posteriormente a la enzima ferredoxin y finalmente a la hidrogenasa, la cual se encarga de catalizar la formación de hidrógeno. En cambio, las bacterias anaerobias facultativas siguen la ruta catalizada por la enzima formiato-hidrogenoliasa para lograr el rompimiento del ácido fórmico y finalmente producir hidrógeno (Lee et al., 2010).

En comparación con algunas otras tecnologías de producción de bio-hidrógeno, la ventaja más significativa que presenta la Fermentación Oscura es el hecho de que, la velocidad de producción de hidrógeno (volumen de H_2 /volumen de reactor-tiempo), puede ser varios órdenes de magnitud mayor a la de los otros sistemas.

Además, las concentraciones de biomasa pueden llegar hasta un valor mayor a 25 g de sólidos suspendidos volátiles/L, lo cual puede ayudar a obtener velocidades de producción de hidrógeno mayores a $7.9 LH_2/L-h$ (35 °C, 1 atm), a bajos tiempos de retención hidráulica de aproximadamente 0.5 h (Lee et al., 2010). De acuerdo a esta velocidad de producción, el volumen requerido del reactor para generar 1-kW de H_2 es únicamente de 73 L, realizando el cálculo con base en una

eficiencia de conversión del 50%, un 95% de hidrógeno utilizado y aproximadamente 0.78 V producidos. Este volumen resulta ser mucho menor al necesario para lograr los mismos resultados mediante sistemas fotosintéticos o CEMs, ya que estos últimos requerirían un volumen de 3000 a 6000 L.

Algunas ventajas de la Fermentación Oscura son que: a) las bacterias fermentativas pueden utilizar sustratos orgánicos complejos para la producción de hidrógeno; como por ejemplo, celulosa, desperdicios de comida, desperdicios de papel o desechos municipales; b) la construcción y operación de los reactores es sencilla y; c) presenta bajas demandas de energía, principalmente para el mezclado.

Para lograr una producción biológica de hidrógeno eficiente, se requiere la inhibición de algunos microorganismos que pueden consumirlo, tal es el caso de organismos homoacetogénicos y metanogénicos. Esta inhibición puede lograrse dando un tratamiento térmico al inóculo, que permita eliminar aquellos microorganismos presentes en el mismo, capaces de competir con las bacterias formadoras de esporas encargadas de llevar a cabo la fermentación (por ejemplo, especies de la familia *Clostridiaceae*, *Streptococcaceae*, *Sporolactobacillaceae*, *Lachnospiraceae* y *Thermoacaerocateriacea*) (Fang et al. 2001; Fang et al. 2002; Ueno et al., 2001). Algunos otros métodos que pueden ser utilizados incluyen la operación de los reactores a valores de dilución altos (Cheng et al., 2001) y bajos pHs (Oh et al., 2003).

Desafortunadamente, la optimización en la producción de bio-hidrógeno mediante este proceso se enfoca solamente a una pequeña fracción del hidrógeno total que puede ser producido mediante el tratamiento del agua residual. Por ejemplo, la optimización en la producción de hidrógeno utilizando como sustrato principal la glucosa contenida en el agua residual, resulta en tan solo 4 moles de hidrógeno por cada mol de glucosa consumida y 2 moles de acetato, como se aprecia en la siguiente reacción:



Cuando se lleva a cabo la oxidación completa a dióxido de carbono e hidrógeno, se puede alcanzar una producción de hasta 12 moles de hidrógeno por mol de glucosa. Sin embargo, de experimentos realizados, los resultados reales son menores a los 4 moles teóricos esperados, encontrándose valores que van de 1 hasta aproximadamente 2.5 moles de hidrógeno por mol de glucosa.

Así mismo, cuando se produce ácido butírico como producto principal de la fermentación, únicamente 2 moles de hidrógeno se pueden generar, de acuerdo a la siguiente reacción:



La cantidad de hidrógeno formado es aún menor cuando se tienen productos de la fermentación con cadenas reducidas; tales como, ácido láctico, ácido propiónico y etanol, debido a que éstos se obtienen como productos intermedios en las reacciones de fermentación de carbohidratos.

Tal parece que, incluso bajo condiciones óptimas, no se puede esperar recuperar más del 15% como electrones equivalentes a hidrógeno en un agua con un alto contenido de carbohidratos, por ello, varios grupos de investigadores se han enfocado en utilizar procesos de dos fases que permitan el aprovechamiento de los productos de la Fermentación Oscura para incrementar la cantidad de hidrógeno que se puede obtener del tratamiento del agua residual (*Ginkel et al. 2001; Logan et al. 2002*).

3.2. Procesos bioelectroquímicos para la producción de hidrógeno

Recientemente, los tratamientos bioelectroquímicos de aguas residuales han surgido como una tecnología interesante que puede ser utilizada para la generación de energía eléctrica o combustibles como el hidrógeno, a partir de las aguas residuales. El principio de funcionamiento de estos sistemas se basa en el uso de microorganismos electroquímicamente activos (*Logan et al., 2006; Lovley, 2006; Rabaey et al., 2007*), los cuales son capaces de transferir electrones extracelularmente hacia un ánodo mientras oxidan la materia orgánica contenida en el agua residual (*Gorby et al., 2006; Newman et al., 2000; Rabaey et al., 2005 a; Reguera et al., 2005; Stams et al., 2006*). Estos microorganismos funcionan como catalizadores durante las reacciones de oxidación del material orgánico, por lo que se le da el nombre de bio-ánodo microbiano al electrodo (*Cohen, 1931; Potter, 1911; Kim et al. 1999 a*). El tratamiento bioelectroquímico del agua residual se completa acoplando este bio-ánodo microbiano a un contra electrodo (cátodo) en el cual se lleva a cabo una reacción de reducción. Como resultado de esta conexión eléctrica entre el ánodo y el cátodo, se llevan a cabo varias reacciones de oxidación y reducción, finalizando así el proceso de tratamiento del agua residual.

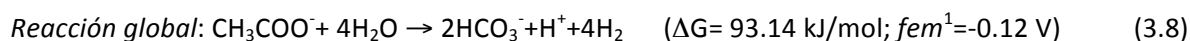
Los sistemas bioelectroquímicos pueden funcionar en dos diferentes modalidades dependiendo de la forma en la que se operen, así, se clasifican en Celdas de Combustible Microbianas (CCM) o Celdas Electroquímicas Microbianas (CEM), siendo los componentes de ambas los mismos.

El cambio en la energía libre de Gibbs de la reacción global (*Heijnen, 1999*) determina la forma en la que funciona el sistema bioelectroquímico (CCM o CEM). Cuando el valor de la energía libre de Gibbs de la reacción global es negativo, se tiene una reacción espontánea, y por lo tanto, el sistema bio-electroquímico actuará como una CCM (*Logan et al., 2006; Rabaey et al., 2005 a*). Por ejemplo, si se utiliza acetato como sustrato en la cámara anódica ($[\text{CH}_3\text{COO}^-]=[\text{HCO}_3^-]=10 \text{ mM}$, pH 7, 298.15 K, $p\text{O}_2 = 0.2 \text{ bar}$), las reacciones que tienen lugar tanto en el ánodo como en el cátodo son las siguientes:





Por el contrario, cuando el valor de la energía libre de Gibbs del sistema es positivo, se requiere la adición de energía eléctrica, lo que convierte al sistema en una CEM (*Call y Logan, 2008; Cheng y Logan, 2007 a; Ditzing et al., 2007; Liu et al., 2005 a; Rozendal et al., 2006; Rozendal et al., 2007; Rozendal et al., 2008 b y c*). En este caso las reacciones que tendrán lugar tanto en el ánodo como en el cátodo, utilizando acetato como sustrato, son las siguientes ($[\text{CH}_3\text{COO}^-] = [\text{HCO}_3^-] = 10 \text{ mM}$, pH 7, 298.15 K, $p\text{O}_2 = 1 \text{ bar}$):



En las reacciones anteriores, el valor de *fem* denota el mejor voltaje que se puede presentar en la celda en algún sistema determinado, esto es, el máximo voltaje que puede generarse en una CCM y el mínimo voltaje requerido necesario para operar una CEM. Sin embargo, bajo condiciones prácticas de trabajo el funcionamiento de la celda varía debido a pérdidas electroquímicas; tales como, pérdidas de potencial de la celda, que se originan por sobretensión de activación, óhmica y difusional. Lo cual se traduce en una menor generación de voltaje, en el caso de las CCM y un mayor requerimiento de energía en las CEM (*Logan et al., 2006*).

Durante los últimos años, la eficiencia de los sistemas bioelectroquímicos ha mejorado significativamente gracias a los diferentes estudios y avances obtenidos en los mismos, esto ha permitido que se esté considerando su aplicación para casos reales y a una mayor escala. Por ejemplo, con el uso de sistemas bioelectroquímicos a nivel laboratorio, se han obtenido valores de corriente de hasta aproximadamente 10 Am^{-2} de área superficial del ánodo (*Fang et al., 2007; Torres et al., 2007*). Suponiendo un espesor mínimo de la celda de aproximadamente 1 cm para permitir el flujo adecuado del agua residual a través de la misma, se esperaría que los sistemas bioelectroquímicos a gran escala puedan llegar a generar una corriente de hasta aproximadamente 1000 Am^{-3} de volumen del reactor. Esto representa una capacidad volumétrica de tratamiento de aproximadamente $7.1 \text{ kg de DQO/m}^3$ volumen del reactor/día, el cual se encuentra en un rango similar al de los sistemas convencionales utilizados para el tratamiento de aguas; tales como, lodos activados ($\approx 0.5\text{-}2 \text{ kg de DQO/m}^3$ volumen del reactor/día) y sistemas anaerobios de alta tasa ($\approx 8\text{-}20 \text{ kg de DQO/m}^3$ volumen del reactor/día) (*Logan et al., 2006*). Sin embargo, para que los sistemas bioelectroquímicos puedan ser considerados para su aplicación en

¹ *fem* hace referencia al voltaje teórico o fuerza electromotriz de la celda, este valor determina si durante la reacción global que se lleva a cabo en el sistema bioelectroquímico, se produce electricidad o si es necesario aplicar cierto voltaje para que se lleve a cabo la reacción.

casos reales, deberán ser escalados varios órdenes de magnitud con respecto a los sistemas utilizados en el laboratorio (10^{-6} hasta 10^{-3} m³) hasta alcanzar dimensiones de 1 a 10^3 m³.

3.2.1. PROCESOS DE TRANSFERENCIA DE ELECTRONES

La transferencia de electrones por medio de los microorganismos que se encuentran en el ánodo (tanto en las CCM como en las CEM), puede llevarse a cabo de manera: a) *indirecta*, ya sea mediante la oxidación de los productos generados durante el metabolismo de las bacterias o utilizando mediadores, los cuales pueden ser secretados directamente por las bacterias o adicionados a la solución electrolítica; o b) *directamente*, a través de los componentes de la membrana celular.

De esta manera, se han identificado cuatro mecanismos diferentes, los cuales se describen a continuación:

- i) **Oxidación de los productos generados durante el metabolismo de las bacterias.** Los primeros estudios realizados en las biopelículas formadas en el ánodo de las celdas, mostraron que se puede obtener bioelectricidad mediante la oxidación de los productos que se generan durante el metabolismo de las bacterias; tales como H₂, alcoholes, amonio o H₂S o HS⁻ (Figura 3.1).

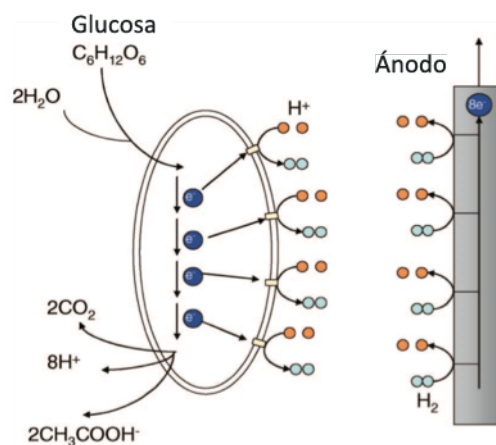


Figura 3.1. Transferencia indirecta de electrones que involucra la oxidación microbiana de los productos generados durante el metabolismo de las bacterias (Erable et al., 2010).

- ii) **Transferencia de electrones mediante el uso de mediadores electroquímicos.** Algunas bacterias no-fermentativas pueden utilizar el electrodo como un aceptor de electrones para lograr las conversiones deseadas; sin embargo, requieren del uso de mediadores que las ayuden a llevar a cabo esta transferencia. Los mediadores electroquímicos, son moléculas que pueden ser oxidadas o reducidas y reciclarse sucesivamente. En su forma oxidada, son capaces de atravesar la membrana celular, aceptar electrones de al menos un donante de electrones dentro de la célula y posteriormente ser transferidos a través de

la célula en su forma reducida para, finalmente, oxidar y transferir los electrones en el ánodo (Figura 3.2).

Los mediadores más utilizados han sido la tionina, el rojo neutro, la 2-hidroxi-1,4-naftoquinona y algunos compuestos derivados de las fenanzinas. Sin embargo, existen varias desventajas en el uso de este tipo de compuestos. En primer lugar, no se ha demostrado que los microorganismos sean capaces de mantener su crecimiento durante su uso. En segundo lugar, la mayoría de las CCMs se han operado de manera continua, por lo que requieren la adición constante de mediadores, aumentando su costo de operación y mantenimiento. Finalmente, los mediadores electroquímicos son por lo general tóxicos haciendo necesario su tratamiento antes de ser dispuestos en el ambiente. Algunas bacterias tales como *Pseudomonas sp.*, *Shewanella putrefaciens* o *Geothrix fermentans* son capaces de generar sus propios mediadores para incrementar la transferencia de electrones extracelularmente. Las bacterias del tipo *Pseudomonas aeruginosa*; por ejemplo, producen moléculas de fenanzina, las cuales incrementan la transferencia de electrones en el ánodo (potencia obtenida de $116 \mu\text{Wm}^{-2}$). Por el contrario, algunas cepas mutantes de esta misma bacteria que no sintetizan sus propios mediadores, únicamente han alcanzado una producción de $6 \mu\text{Wm}^{-2}$, lo cual representa un 5% de lo obtenido con las cepas anteriores (Bond y Lovley, 2005; Hernández et al., 2006; Kim et al., 1999 b; Kim et al., 2002; Rabaey et al., 2005 a). Otro ejemplo se presenta en el caso de las bacterias *Shewanella oneidensis*, las cuales pueden crecer en condiciones tanto aerobias como anaerobias, utilizar una gran variedad de aceptores de electrones y secretar sus propios mediadores de electrones mejorando con ello la potencia obtenida y, por lo tanto, haciéndola una especie altamente seleccionada para ser aplicada en ambientes tanto aerobios como microaerofílicos (Biffinger et al., 2008).

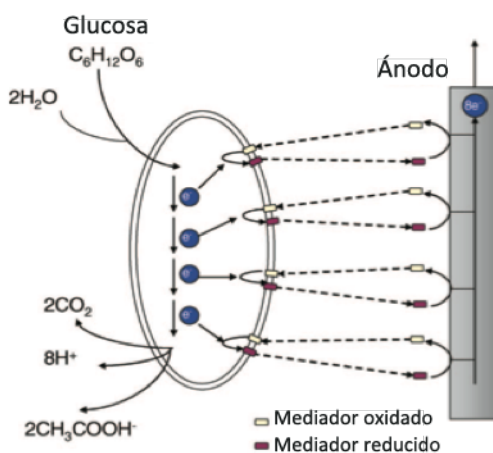


Figura 3.2. Transferencia indirecta de electrones mediante el uso de mediadores electroquímicos (Erable et al., 2010).

iii) **Transferencia directa de electrones.** El principal elemento en la transferencia directa de electrones, es la habilidad que tienen ciertas células bacterianas de transferir electrones desde un donante de electrones soluble (por ej., hidrógeno, glucosa, acetato) hacia un aceptor (por ej., oxígeno, nitrato, fumarato) por un donante o aceptor de electrones sólido que se encuentre en la superficie del electrodo (Figura 3.3).

Algunas de las bacterias que han sido identificadas por tener esta propiedad de llevar a cabo la transferencia directa de electrones son las *Desulforomonas acetoxidans*, *Geobacter Sulfurreducens*, *Geobacter metallireducens*, *Rhodofera ferrireducens*, *Desulfobulbus propionicus* y *Enterococcus gallinarum* (Bond et al., 2002; Holmes et al., 2004; Kim et al., 2005).

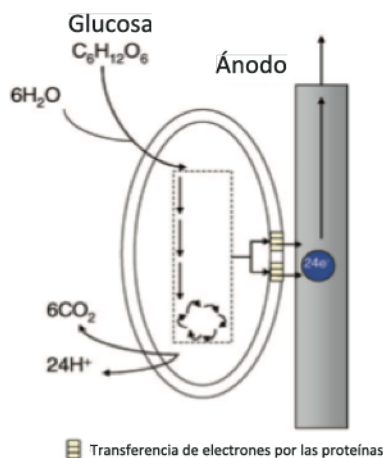


Figura 3.3. Transferencia directa de electrones (Erable et al., 2010).

La eficiencia de operación de los sistemas bioelectroquímicos se ve beneficiada con la utilización de consorcios mixtos de microorganismos en lugar de comunidades puras. Por ejemplo, un grupo de investigadores encontraron que, inoculando el ánodo de las CCM con grupos mixtos de microorganismos, se podía generar una corriente seis veces mayor a la generada cuando se utilizaba un cultivo puro (Park y Zeikus, 2002 b).

Así, las comunidades de microorganismos que se desarrollan en la cámara anódica pueden tener funciones similares a aquellas que se encuentran presentes en los reactores de Fermentación Oscura, con la excepción de que en las primeras, los microorganismos encargados de transferir electrones de la superficie del ánodo, sustituyen a los microorganismos metanogénicos que se forman en los segundos. Rabaey y col. (2003) llamaron a los microorganismos que crecen en los sistemas electroquímicos “consorcios anodófilos”. Algunos de estos microorganismos (bacterias anodófilas) que pueden llevar a cabo la transferencia de electrones, pertenecen a las familias de *Geobacteraceae*, *Desulfuromonaceae*, *Alteromonadaceae*, *Enterobacteriaceae*, *Pasteurellaceae*, *Clostridiaceae*, *Aeromonadaceae* y *Comamonadaceae* (Bond et al., 2002; Bond y Lovley, 2003;

Chaudhuri y Lovley, 2003; Kim et al. 2000; Park y Zeikus, 2000; Park et al., 2001; Park y Zeikus 2002 a y b; Pham et al., 2003).

Varios estudios se han enfocado en conocer los mecanismos metabólicos por los que estas bacterias pueden realizar la transferencia de electrones para la generación de electricidad en el caso de las CCM e hidrógeno en las CEM. En algunas pruebas realizadas con acetato; por ejemplo, se ha encontrado una relación simbiótica entre las bacterias Gram Positivas y Gram Negativas, lo cual ha permitido identificar y crear algunas rutas metabólicas. Además, se ha observado que la mayoría de los estudios realizados en sistemas bioelectroquímicos, exhiben una disminución en su eficiencia cuando se utiliza agua residual real en comparación con el uso de aguas residuales sintéticas que contienen sustratos fácilmente biodegradables (por ej., acetato). Esto es un indicativo de que: a) la comunidad microbiana del ánodo no es capaz de degradar moléculas más complejas a niveles similares con los que se degradan sustratos más simples o bien, b) algunos procesos competitivos pueden ocurrir como es el caso de la metanogénesis (*Pham et al., 2008*).

Las arqueobacterias metanogénicas, microorganismos que convierten la materia orgánica a metano, compiten con los microorganismos electroquímicamente activos por el material orgánico contenido en el agua residual. Por lo tanto, al menos que el metano formado pueda ser de alguna manera reoxidado y reutilizado para la generación de energía eléctrica, la actividad de estas arqueobacterias metanogénicas disminuye la recuperación de los electrones y, por lo tanto, la eficiencia de los sistemas.

Recientemente se observó que aún cuando los microorganismos electroquímicamente activos presentes en el ánodo son capaces de competir con las arqueobacterias metanogénicas por el acetato como donante de electrones, la presencia de glucosa en el agua residual a tratar, genera grandes cantidades de metano (*Freguia et al., 2007 a; Lee et al., 2008*). El mismo efecto se identificó cuando el agua residual contenía etanol (*Torres et al., 2007*). Así pues, aún cuando la glucosa y el etanol son sustratos que pueden llegar a fermentarse para obtener como producto final hidrógeno, la competencia existente entre los microorganismos electroquímicamente activos y las arqueobacterias metanogénicas, no permite su conversión al 100%, ocasionando la disminución en la eficiencia de los sistemas bioelectroquímicos. Una posible razón por la cual ocurre este fenómeno, es el hecho de que los metanógenos, en comparación con los microorganismos electroquímicamente activos, no dependen del contacto directo con el electrodo para llevar a cabo sus reacciones metabólicas (*Freguia et al., 2007 a; Lee et al., 2008; Torres et al., 2007*).

Además de que los metanógenos pueden disminuir la recuperación de electrones en el ánodo de cualquier sistema electroquímico (ya sea CCM o CEM), también disminuyen la recuperación de hidrógeno en el cátodo en el caso de una CEM, ya que éste puede ser aprovechado por las arqueobacterias metanogénicas como sustrato para la generación de metano. Esta situación puede surgir, por ejemplo, cuando se utiliza un bio-cátodo (*Rozendal et al., 2008 b*), cuando se utiliza una CEM sin membrana (*Call y Logan, 2008*), o cuando se emplea un cátodo no esterilizado

(Clauwaert *et al.*, 2008). Operando el sistema de tal manera que la disponibilidad de bicarbonato, el cual es necesario para la producción de metano a partir del hidrógeno, sea limitada o aireando el sistema periódicamente para evitar el crecimiento y proliferación de las arqueobacterias metanogénicas, resulta necesario para prevenir este tipo de pérdidas de hidrógeno (Call y Logan, 2008; Fang *et al.*, 2007).

Por otro lado, los microorganismos en el ánodo crecen en multicapas (biopelículas), siendo las arqueobacterias metanogénicas las que colonizan la superficie de estas biopelículas, lo cual tiene como consecuencia el consumo de hidrógeno en el momento que se produce durante el proceso de fermentación, antes de llegar a los microorganismos electroquímicamente activos que se encuentran en las primeras capas de la biopelícula o ser extraído de la CEM. Desde una perspectiva operacional, esto implica que al encontrarse presentes sustratos fermentables en el agua residual, se deba realizar primeramente un proceso de Fermentación Oscura y posteriormente, utilizar un sistema bioelectroquímico para tratar los productos de la fermentación que no fueron convertidos a hidrógeno y con ello generar una mayor cantidad de gas. Así, durante el proceso de fermentación se convertirán los sustratos fermentables a no fermentables (como acetato) con los cuales los organismos electroquímicamente activos tienen una mayor posibilidad de competir con los metanogénicos (Rozendal *et al.*, 2008a).

3.2.2. CARACTERÍSTICAS DE LOS ELECTRODOS

Los materiales que son utilizados para la construcción de los bioelectrodos deben contar con ciertas propiedades como una alta bio-compatibilidad, alta estabilidad, un bajo costo y una alta conductividad (Rosenbaum *et al.*, 2007). Se debe prestar especial atención en utilizar materiales que no resulten tóxicos para las bacterias que crecerán en la superficie de los mismos.

El material considerado como el más prometedor para ser utilizado en la construcción de bio-ánodos es el carbón, ya que es económico y más fácil de utilizar, además de que su área superficial puede incrementarse fácilmente. También, su naturaleza inerte permite que su tiempo de vida útil sea mayor en comparación con otros materiales propuestos (Logan *et al.*, 2006).

Algunos otros materiales que han sido utilizados como ánodos son por ejemplo: nanotubos de carbón, grafito flexible y carbón activado. El carbón activado y el grafito flexible permiten obtener densidades de potencia muy altas, las cuales son mayores en un 31.8 y 22.6%, respectivamente, en comparación con el carbón activado. Recientemente se sintetizó un material nanoestructurado mesoporoso de polianilina con TiO_2 , el cual fue utilizado como ánodo en una CCM inoculada con *E. Coli*. Los resultados mostraron una alta densidad de potencia (1495 mWm^{-2}), siendo dos veces mayor a la que se obtuvo en otro tipo de CCMs inoculadas con esta misma bacteria (Liang *et al.*, 2008; Qiao *et al.*, 2008).

Realizando una modificación química de los materiales empleados en la construcción de los electrodos, puede incrementarse la generación de potencia en las CCMs. Por ejemplo, si se da un

tratamiento con amonio a un electrodo de papel carbón, utilizado como bio-ánodo, aumenta la superficie cargada de este electrodo, y por lo tanto mejora el funcionamiento de la celda. Otra opción es el utilizar una solución de fosfato en el anolito, la cual permite aumentar la potencia hasta un valor de 1640 mWm^{-2} o de 1970 mWm^{-2} , utilizando un tratamiento con amonio en el electrodo (*Cheng y Logan, 2007 b*). La combinación de ambos tratamientos ha permitido aumentar la potencia generada en las CCMs en un 48% aproximadamente, en comparación con aquellas que utilizan cátodos aireados sin este tipo de modificaciones. Además, el tiempo de arranque del sistema se reduce hasta en un 50%.

La mayoría de los sistemas bioelectroquímicos utilizan como cátodo un electrodo de platino, sin embargo, los valores de pH tan bajos a los que son operados los sistemas y las altas temperaturas en los mismos, ocasionan que tengan un mal funcionamiento. Como consecuencia, para mejorar su funcionamiento y factibilidad económica, es necesario encontrar una buena alternativa que permita reemplazar el platino como cátodo. Hasta la fecha, tres estrategias se han explorado: el uso de i) materiales con un alta área superficial (por ej., grafito granular) (*Freguia et al., 2007b*), ii) electrocatalizadores químicos de bajo costo (*Cheng et al., 2006 a; HaoYu et al., 2007; Zhao et al., 2005*) y iii) bio-cátodos (*Bergel et al., 2005; Clauwaert et al., 2007; Freguia et al., 2008; Rozendal et al., 2008 b*). El desarrollo de estos últimos en particular, se ha convertido en un tema de interés en lo que respecta al estudio de los sistemas bioelectroquímicos.

Los bio-cátodos utilizan microorganismos electroquímicamente activos, los cuales pueden operar de manera eficiente bajo las condiciones presentes en las CCMs o CEMs. Bergel y col. (2005) demostraron que un consorcio electroquímicamente activo enriquecido en agua de mar, era capaz de catalizar la reacción de reducción de oxígeno en un cátodo de acero inoxidable. Posteriormente, varios grupos de investigación demostraron que este mismo consorcio microbiano podía ser enriquecido en agua dulce (*Clauwaert et al., 2007; Freguia et al., 2008*). Recientemente se observó que estos consorcios microbianos presentes en el cátodo, son capaces de catalizar la producción de hidrógeno cuando se encuentran adheridos en un electrodo de grafito (*Rozendal et al., 2008 b*).

Los bio-cátodos pueden ser utilizados en lugar de electro catalizadores metálicos costosos, teniendo la ventaja de ser regenerados en un material no muy costoso, como por ejemplo, papel carbón o grafito. Además, permiten llevar a cabo la remoción de nitrógeno contenido en el agua residual a tratar, dándole un valor adicional a los sistemas bioelectroquímicos en comparación con otras técnicas de obtención de hidrógeno, como por ejemplo, la Fermentación Oscura.

En la mayoría de los trabajos reportados en la literatura, el material más utilizado para la construcción de bio-cátodos ha sido el grafito. Sin embargo, recientemente se han empleado nuevos materiales de manera exitosa, como por ejemplo, acero inoxidable y níquel. Dumas y col. (2008) probaron placas de acero inoxidable como cátodo para llevar a cabo la reducción de fumarato en una CCM que contenía una biopelícula de *G. Sulfurreducens* obteniendo una corriente máxima por arriba de los 20 Am^{-2} , la cual es 25 veces mayor a la reportada en estudios utilizando

grafito. Wang y col. (2008) reemplazaron los materiales de carbón por espuma de níquel como matriz del bio-cátodo obteniendo valores de potencia de aproximadamente 4 Wm^{-3} .

3.2.3. PROBLEMAS ASOCIADOS AL FUNCIONAMIENTO DE LOS SISTEMAS

Durante la operación de los sistemas bioelectroquímicos pueden presentarse algunos problemas tales como, pérdidas de potencial en los electrodos, pérdidas óhmicas y variaciones de pH que perjudican el funcionamiento de las membranas de intercambio iónico.

Las pérdidas de potencial en los electrodos limitan significativamente la generación de corriente en las celdas, por lo que es muy importante evitarlas al máximo. Una de las razones por las que se presentan es el hecho de que la velocidad de reacción con la que se reduce el oxígeno es muy baja.

Por otra parte, las pérdidas óhmicas que se presentan en los sistemas bioelectroquímicos se clasifican como: (i) pérdidas óhmicas en el electrolito y ii) pérdidas óhmicas en el electrodo. Las primeras se refieren a la pérdida de voltaje ocasionado por el movimiento de los iones a través del electrolito (incluyendo el agua residual y la membrana), y las segundas se refieren al movimiento de los electrones a través de los electrodos, los contactos eléctricos y las conexiones eléctricas de los sistemas.

Debido a que la conductividad de muchas aguas residuales es baja, las pérdidas óhmicas del electrolito suelen ser considerables. En estudios realizados a nivel laboratorio, estos valores de conductividad son razonablemente altos debido a las altas concentraciones de sales y soluciones buffer utilizadas; sin embargo, en el caso de aguas residuales domésticas y muchas aguas industriales, la conductividad suele ser más baja encontrándose en el orden de 1 mS/cm . Para llevar a cabo el escalamiento de los sistemas bioelectroquímicos de manera tal que se llegue a producir una corriente de aproximadamente 10 Am^{-2} de superficie del ánodo, las pérdidas óhmicas que se presenten a estos bajos valores de conductividad deberán ser de aproximadamente 1 V por cada cm de distancia existente entre el ánodo y el cátodo. Debido a que esta es una pérdida significativa en comparación con los valores teóricos esperados, es importante minimizar el espacio existente entre los electrodos en las celdas (*Heijne et al., 2006; Logan et al., 2006; Liu et al., 2005 b; Taylor et al., 2007*).

En sistemas de una sola cámara, estas pérdidas óhmicas se minimizan debido a que los electrodos se colocan más próximos uno de otro, siendo separados en algunas ocasiones únicamente por una membrana. Sin embargo, debido a la gran distancia que los electrones tienen que recorrer a través del ánodo, posteriormente a través del circuito eléctrico y finalmente a través del cátodo para poder ser consumidos en las reacciones que se llevan a cabo en el cátodo, también pudiera darse el caso de que se presenten pérdidas óhmicas si el material utilizado en el electrodo no es lo suficientemente conductivo. En este sentido, el grafito y el carbón, son los dos materiales más utilizados como bio-cátodos y bio-ánodos, debido a su compatibilidad con los microorganismos

electroquímicamente activos que forman la biopelícula, a que no presentan demasiadas pérdidas de potencial y tienen un bajo costo (Logan et al., 2006).

Para reducir las pérdidas óhmicas, estos electrodos de grafito o carbón pueden ser soportados con un material altamente conductivo; como por ejemplo, malla de acero inoxidable, o emplearse ánodos en forma de cepillo, construidos con cerdas de grafito montadas sobre un alambre de titanio como los utilizados en un estudio realizado por Logan y col. (2007). Sin embargo, debido a que el uso de metales incrementa el costo de construcción de los sistemas, es necesario evaluar la factibilidad de su aplicación.

Los electrones que fluyen del ánodo hacia el cátodo en un sistema bioelectroquímico, pueden generar un flujo de carga negativa. Para mantener la electro neutralidad en el sistema, este flujo de cargas negativas debe de ser compensado mediante el transporte de cationes del ánodo hacia el cátodo o aniones del cátodo hacia el ánodo (Figura 3.4). Con este propósito la mayoría de los sistemas bioelectroquímicos utilizan membranas de intercambio iónico que ayudan al flujo de los iones a través de la membrana mientras se mantienen separadas las reacciones que se llevan a cabo en el ánodo y el cátodo.

El uso de membranas de intercambio iónico genera cambios de pH en las celdas debido a que las reacciones que ocurren en el ánodo producen protones y aquellas que ocurren en el cátodo consumen electrones, lo cual ocasiona una disminución en el pH de la cámara anódica y un aumento de pH en la cámara catódica. Una alternativa para evitar estos cambios, sugiere el operar los sistemas como un sistema cerrado en el cual el efluente de la cámara anódica no es removido del sistema, tal como ocurre en los sistemas tradicionales (Figura 3.4), en lugar de esto, pasa directamente a la cámara catódica (Figura 3.5), solucionando el problema debido a que los protones generados en el ánodo son transportados hacia el cátodo, los cuales compensan los protones consumidos en las reacciones que se llevan a cabo en el cátodo y por lo tanto mantienen el pH del mismo en un valor bajo (Freguia et al., 2008; Logan et al., 2007).

Las reacciones que ocurren en el ánodo generan protones que acidifican la biopelícula formada y afectan negativamente el funcionamiento de las celdas. Este aspecto hace necesario el agregar una solución tampón, como por ejemplo, buffer de fosfatos. Se ha observado que cuando la concentración de fosfato aumenta, por ejemplo de 12.5 a 100 mM, la corriente generada es casi cuatro veces mayor y se aproxima a 10 Am^{-2} de área superficial del ánodo, este efecto no fue ocasionado por el aumento de la conductividad que resulta de adicionar una solución tampón, ya que al aumentar la conductividad adicionando cloruro de sodio, la densidad de corriente sólo aumentó en un 15%.

Las aguas residuales domésticas y muchas de tipo industrial, tienen una alcalinidad en el orden de 50 a 200 mgL^{-1} de CaCO_3 , lo cual equivale de 1 a 4 mM de fosfato como amortiguador. Como consecuencia, estos bajos niveles de amortiguamiento pueden limitar el funcionamiento de los bio-ánodos y del sistema global. Una alternativa para solucionar este problema es el diseñar los

sistemas de tal manera que el agua residual fluya a través del electrodo y no únicamente alrededor de él. Esto aumentará el grado de amortiguamiento para los microorganismos electroquímicamente activos y estabilizará el pH de la biopelícula formada. Sin embargo, es importante el considerar que al adicionar cierta cantidad de solución tampón al agua residual que se desee tratar, aumentará el costo de operación de los sistemas cuando se realice su escalamiento para su aplicación en condiciones reales (Cheng et al., 2006 b; Fan et al., 2007; Tchobanoglous et al., 2003).

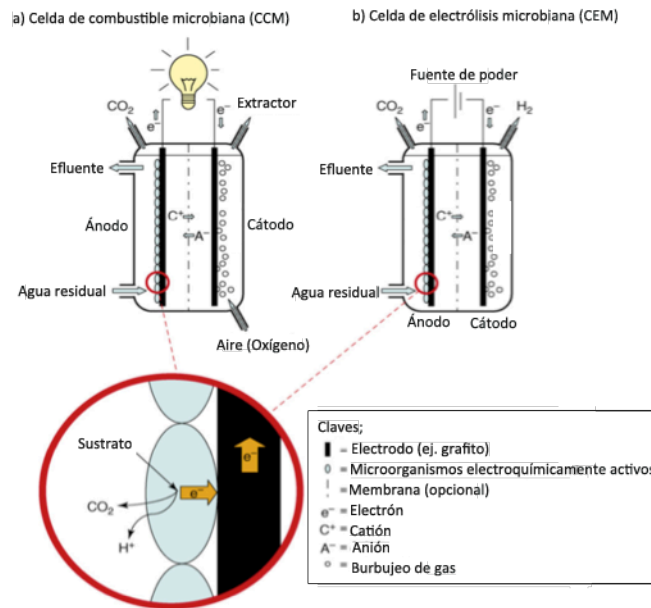


Figura 3.4. Tratamiento del agua residual utilizando sistemas bioelectroquímicos (Rozendal et al., 2008 a).

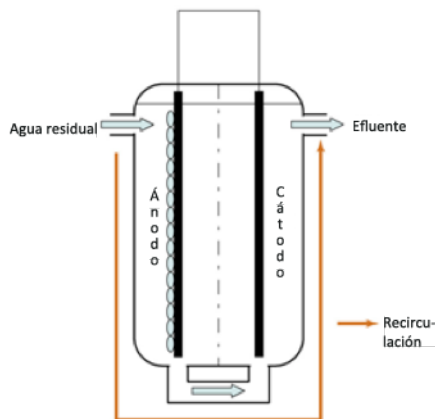


Figura 3.5. Configuración en circuito cerrado de un sistema bioelectroquímico microbiano, en el cual el efluente del ánodo fluye directamente hacia el cátodo (Rozendal et al., 2008 a).

A continuación se realiza una descripción con mayor detalle de las Celdas de Combustible Microbianas y las Celdas Electroquímicas Microbianas, mencionando el principio de operación y algunos resultados obtenidos en diversas investigaciones.

3.2.4. CELDAS DE COMBUSTIBLE MICROBIANAS (CCM)

Las CCMs son similares a una Celda de Combustible de Hidrógeno, las cuales transportan protones del ánodo hacia el cátodo a través de una membrana electrolítica.

Una CCM está formada por dos cámaras, ánodo y cátodo, separadas entre sí por una membrana de intercambio iónico (Figura 3.6). En ella, los microorganismos electroquímicamente activos que crecen adheridos en el ánodo y aquellos que se encuentran suspendidos en la solución anódica, oxidan el sustrato formando protones y electrones en la cámara anódica de la CCM. Posteriormente, los electrones acumulados en el ánodo son transportados hacia el cátodo mediante un circuito externo, accionando el sistema eléctrico y, los protones son transferidos a través de la membrana interna. Por lo tanto, se genera una diferencia de potencial entre las cámaras anódica y catódica debido a las diferentes soluciones líquidas. Los electrones y protones son consumidos en el cátodo utilizando oxígeno disuelto. Se ha observado que la formación de células electro activas en ambas cámaras, tiene un efecto favorable en el funcionamiento de la CCM, aumentando la eficiencia coulombica y la generación de potencia.

Utilizando CCMs para el tratamiento de una gran variedad de sustratos como por ejemplo glucosa, acetato, butirato, cisteína, proteínas y lignocelulosa, así como también, sustratos más complejos como por ejemplo, agua residual doméstica, una mezcla de estiércol porcino, lixiviados de un vertedero y agua residual de una empacadora de carne, se ha generado energía eléctrica de manera satisfactoria (Cheng et al., 2006 c; Heilmann y Logan, 2006; Liu et al., 2005 b; Logan et al., 2005; Min et al., 2005; Rismani-Yazdi et al., 2007; You et al., 2006).

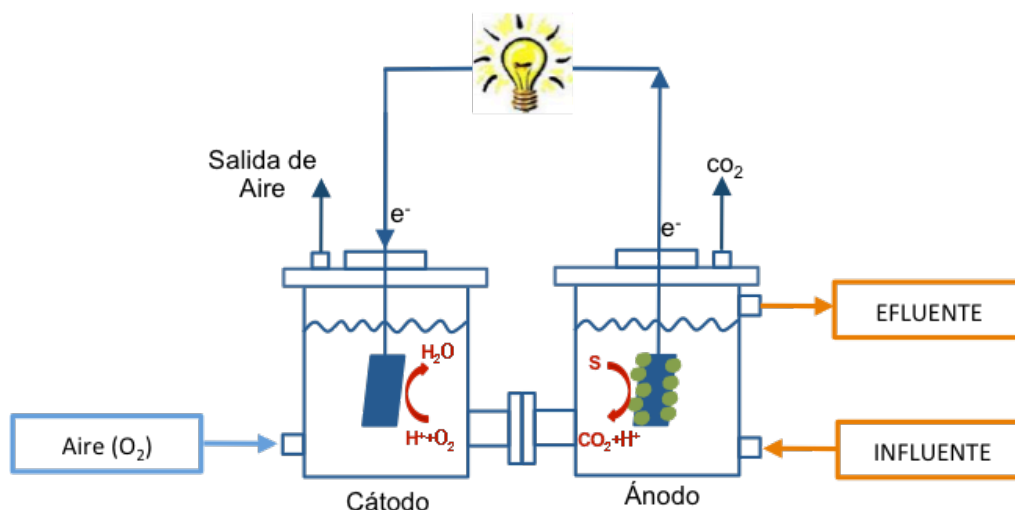


Figura 3.6. Esquema representativo del funcionamiento de una CCM. (S=Sustrato)

La recuperación de esta energía eléctrica varía considerablemente dependiendo de la configuración de la celda, los materiales utilizados como electrodos, y las especies anodofílicas empleadas, además de las condiciones de operación de los sistemas. Por ejemplo, estudios realizados con CCMs reportan voltajes mayores a 0.7 V, con rangos de potencia que van de 20 mWm^{-2} hasta 2000 mWm^{-2} de superficie del ánodo y potencias por unidad de volumen entre 2060 mWm^{-3} hasta 102,000 mWm^{-3} (Kim et al., 2007; Rosenbaum et al., 2006). También se observó que entre menor es el tamaño de la CCM mayor es la generación de electricidad de las mismas cuando se recuperan adecuadamente los electrones (Ringeisen et al., 2006).

El funcionamiento de una CCM no solo depende de las especies de microorganismos que se encuentran adheridos en el ánodo, sino además, se ve influenciado por el tipo de sustrato que deberá ser oxidado por los mismos. Por lo general, se han realizado pruebas con sustratos simples como es el caso de glucosa, acetato, sacarosa, etanol o butirato, que pueden ser consumidos fácilmente por estos microorganismos; sin embargo, el uso de sustratos más complejos como aguas sintéticas conteniendo glutamato, efluentes de hospitales, sustratos que contienen compuestos fácilmente degradables tales como aminoácidos y proteínas, ha aumentado en la actualidad. En este sentido, se ha observado que las CCM que trabajan con sustratos simples generan mayor potencia que aquellas en las que se utilizan sustratos complejos (Logan y Regan, 2006).

Además, la eficiencia de una CCM puede variar dependiendo de los avances tecnológicos con los que se cuente. Uno de los cambios más significativos que se ha realizado en estos sistemas con la finalidad de reducir la resistencia interna en los mismos, ha sido la remoción de la membrana de intercambio iónico. Una CCM de doble cámara con membrana de intercambio iónico, inoculada con un agua residual de tipo doméstico, podía generar una potencia de 262 mWm^{-2} ; sin embargo, con la eliminación de la membrana se observó un aumento de potencia hasta alcanzar un valor de 494 mWm^{-2} (Liu y Logan, 2004).

Otros estudios se han enfocado en optimizar las reacciones que tienen lugar en el cátodo. Por lo general, la reducción del oxígeno se llevaba a cabo utilizando cátodos de platino sumergidos en una solución acuosa, sin embargo, actualmente se ha aumentado la concentración de oxígeno en el compartimento del cátodo suministrando aire, incluyendo el uso de cátodo al aire en el que la reducción ocurre directamente en la fase gaseosa. Recientemente, un nuevo diseño que permite trabajar bajo condiciones ácidas en el cátodo ha mejorado la reducción del oxígeno (Cheng et al., 2006 b; Erable y Bergel, 2009; Gil et al., 2003; He et al. 2007; Liu y Logan, 2004; Liu et al., 2004; Nielsen et al. 2004 a).

Otras pruebas consistieron en reemplazar la reducción del oxígeno por una reducción del ferricianuro a ferrocianuro, obteniéndose así potencias en el orden de 860 mWm^{-2} hasta 4310 mWm^{-2} (Heijne et al., 2006; Rabaey et al., 2003; Rabaey et al. 2004). Sin embargo, el uso de este

compuesto representa un peligro para el ambiente debido a su alto grado de toxicidad, por lo que se ha limitado su uso en pruebas a nivel laboratorio.

Algunas otras estrategias tales como, el control de la temperatura o el aumento en la transferencia de masa mediante el burbujeo o mezclado del catolito, también han sido sugeridas para optimizar el proceso. Por ejemplo, en pruebas realizadas con una CCM manteniendo la temperatura constante a 55 °C, se obtuvo una potencia de 1030 mWm⁻² (Du et al., 2007; Jong et al., 2006). Sin embargo, estas dos opciones han sido desechadas debido a que el uso de un dispositivo adicional como bombas, compresores, potenciómetros y calentadores, consumen más energía de la que las CCM pueden generar, aumentando con ello el costo de operación de las mismas.

En cuanto al tratamiento de aguas residuales con estos sistemas, se han llegado a obtener porcentajes de eliminación de materia orgánica (medida como DQO) en el orden de un 93 al 95%. La literatura reporta casos en los que se han tratado satisfactoriamente aguas residuales sintéticas conteniendo compuestos químicos puros, y también, aguas residuales industriales complejas. Por ejemplo, en un caso en el que se trató un agua residual que contenía desechos de pescado, peptonas y almidón, utilizando una CCM con un cátodo aireado, los porcentajes de eliminación de materia orgánica fueron de un 93 al 95% (Shimoyama et al., 2008). Mientras que, en otro estudio realizado con una CCM de una sola cámara tratando lixiviados, únicamente se observó un 53% de reducción de DBO (Demanda biológica de oxígeno) con un tiempo de retención hidráulico (TRH) de 4.7 h (Greenman et al., 2009). Con un TRH de 33 h, Liu y col. (2004) obtuvieron eliminaciones de materia orgánica de un 80% durante el tratamiento de aguas residuales de tipo doméstico y, disminuyendo el TRH a 12 h la eliminación de materia orgánica estuvo en el rango de 50-70%. Min y Logan (2004) reportan valores de eliminación de materia orgánica de hasta un 72% en una CCM durante el tratamiento de aguas residuales domésticas; mientras que, tratando aguas residuales de tipo porcino, el porcentaje de eliminación de materia orgánica llegó hasta un valor de 91% con TRH de 72 h (Min et al., 2005). Con lo cual se concluye que el porcentaje de eliminación de materia orgánica dependerá del tipo de contaminantes presentes en el agua y el tiempo de retención hidráulico utilizado durante el tratamiento.

Algunas limitaciones que presentan las CCM como opción de tratamiento de aguas residuales, son los bajos niveles de potencia obtenidos y el hecho de que hasta la fecha, sea un sistema estudiado únicamente a escala de laboratorio. Basándose en la diferencia de potencial, ΔE , que puede generarse entre el aceptor y el donador de electrones, los voltajes máximos esperados mediante el uso de esta tecnología no sobrepasan a 1 V, estando el valor máximo alcanzado en las diferentes pruebas reportadas en la literatura (0.7 V), por debajo de este valor (Park y Zeikus, 2003). Operando varias CCM en serie, el voltaje producido puede aumentar, aún así, la corriente y el voltaje generados, siguen estando por debajo de los valores teóricos esperados y el comportamiento de las celdas varía considerablemente.

Finalmente, para que el tratamiento de agua residual mediante CCMs pueda ser considerado como una opción viable a nivel real, los costos de construcción y operación de las mismas deberán disminuir (Liu *et al.*, 2004; Rabaey *et al.*, 2003). Además, deberán de mejorar los niveles de transporte de electrones dentro de las celdas, esto puede lograrse seleccionando una comunidad de microorganismos anodófilicos bien adaptados y optimizando las condiciones de operación de las CCM. Aún cuando se logre la optimización del proceso, será importante considerar el hecho de que el tamaño del reactor sea lo suficientemente pequeño como para hacer la producción de bioelectricidad o biohidrógeno económicamente factible.

En la Tabla 3.1 se presenta un concentrado de los mejores resultados que se han obtenido al utilizar CCMs para la generación de electricidad, con diferentes sustratos, configuraciones de la celda y fuentes de inóculo.

3.2.5. CELDAS ELECTROQUÍMICAS MICROBIANAS (CEM)

Una posible alternativa para la producción de biohidrógeno consiste en el uso de Celdas Electroquímicas Microbianas (CEM), en las cuales la materia orgánica es transformada a hidrógeno por electrólisis microbiana. Durante la operación de una CCM, las bacterias oxidan la materia orgánica en el ánodo para producir protones y electrones que fluyen hacia el cátodo utilizando un camino diferente y son consumidos en un mecanismo de reducción. Si la presencia de compuestos reducibles en el cátodo se omite, la producción de corriente no es espontánea. Aplicando un pequeño voltaje entre el ánodo y el cátodo, se fuerza la generación de corriente, resultando en la formación de hidrógeno en el cátodo debido a la reducción de los protones (Figura 3.7).

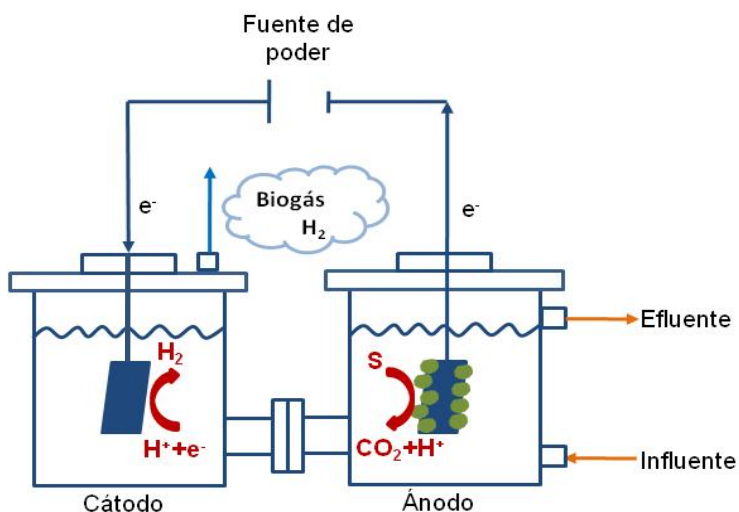


Figura 3.7. Esquema representativo del funcionamiento de una CEM. (S=Sustrato)

Tabla 3.1. Resultados obtenidos utilizando CCMs con diferentes características.

TIPO DE SUSTRATO	CONCENTRACIÓN	FUENTE DE INÓCULO	TIPO DE CCM (CON ÁREA SUPERFICIAL DEL ELECTRODO Y/O VOLUMEN DE LA CELDA)	DENSIDAD DE CORRIENTE (mAcm ⁻²) A MÁXIMA POTENCIA	REFERENCIA
Acetato	1 g/L	Bacterias pre-aclimatadas de una CCM	Forma cúbica, una sola cámara con ánodo de cepillo de grafito (7170 m ² /m ³ volumen del cepillo)	0.8	(Logan et al., 2007)
Arabitol	1220 mg/L	Bacterias pre-aclimatadas de una CCM	Una sola cámara, cátodo aireado (12 mL), con ánodo de papel carbón (2 cm ²) y cátodo de papel carbón (7 cm ²)	0.68	(Catal et al., 2008a)
Galactitol	1220 mg/L	Bacterias pre-aclimatadas de una CCM	Una sola cámara, cátodo aireado (12 mL), con ánodo de papel carbón (2 cm ²) y cátodo de papel carbón (7 cm ²)	0.78	(Catal et al., 2008a)
Glucosa	6.7 mM	Cultivo mixto de bacterias el cual se mantuvo durante un año en acetato de sodio (<i>Rhodococcus</i> y <i>Paracoccus</i>)	Una sola cámara, cátodo aireado (12 mL), con ánodo de papel carbón (2 cm ²) y cátodo de papel carbón (7 cm ²)	0.70	(Catal et al., 2008b)
Ácido glucurónico	6.7 mM	Cultivo mixto	Una sola cámara, cátodo aireado (12 mL), con ánodo de papel carbón (2 cm ²) y cátodo de papel carbón (7 cm ²)	1.18	(Catal et al., 2008b)
Manitol	1220 mg/L	Bacterias pre-aclimatadas de una CCM	Una sola cámara, cátodo aireado (12 mL), con ánodo de papel carbón (2 cm ²) y cátodo de papel carbón (7 cm ²)	0.58	(Catal et al., 2008a)
Formiato de sodio	20 mM	Lodo de digestión anaerobia proveniente de una planta de tratamiento de aguas residuales	Celda de dos cámaras con electrodos de tela de grafito (4.5 cm ²)	0.22	(Ha et al., 2008)
Sorbitol	1220 mg/L	Bacterias pre-aclimatadas de una CCM	Una sola cámara, cátodo aireado (12 mL), con ánodo de papel carbón (2 cm ²) y cátodo de papel carbón (7 cm ²)	0.62	(Catal et al., 2008a)
Agua residual de la industria chocolatera	1459 mg/L de DQO	Lodo activado	Dos cámaras, con electrodos de barras de grafito (16.485 cm ²) y ferrocianuro como catolito	0.302	(Patil et al., 2009)
Almidón	10 g/L	Cultivo puro de <i>Clostridium butyricum</i>	Dos cámaras con ánodo de grafito (7 cm ²) y ferrocianuro como catolito	1.3	(Niessen et al., 2004)
Fumarato de sodio	25 mM	Cultivo puro de <i>G. sulfurreducens</i>	Cátodo de acero inoxidable (2.5 cm ²), medias celdas con un potencial fijo de -600 mV Vs. Ag/AgCl	2.05	(Dumas et al., 2008)

Hasta la fecha, se han realizado varias investigaciones utilizando CEMs para la generación de hidrógeno. Por ejemplo, Rozendal y col. (2006) utilizaron acetato para producir hidrógeno. En condiciones normales utilizando este compuesto como sustrato es necesario aplicar $104.6 \text{ kJ mol}^{-1}$ de energía externa para que se pueda llevar a cabo la reacción en el cátodo. Con base en esto, se necesita un voltaje externo de aproximadamente 0.14 V Vs. NHE para generar hidrógeno. En la práctica, debido a las pérdidas internas en la célula y a que los microorganismos consumen cierta cantidad de sustrato para su crecimiento y mantenimiento, se requiere un voltaje mayor al teórico. Diferentes estudios realizados sugieren que los voltajes que deben aplicarse se encuentran en un rango de 0.2 a 0.3 V (Call y Logan, 2008; Liu et al., 2005 c), los cuales son más bajos en comparación con los voltajes necesarios para llevar a cabo el proceso de electrólisis del agua.

Rozendal y col. (2006) obtuvieron un valor de $0.02 \text{ m}^3 \text{H}_2 \text{m}^{-3} \text{d}^{-1}$ con una eficiencia del 53%, utilizando una CEM de doble cámara y aplicando un voltaje de 0.5 V . Después de optimizar el proceso, el volumen de hidrógeno generado se incrementó hasta aproximadamente $10 \text{ m}^3 \text{H}_2 \text{m}^{-3} \text{d}^{-1}$ con una eficiencia del 90%, suministrando un voltaje relativamente bajo (0.3 - 0.4 V). Un año después, Cheng y Logan (2007 a) probaron que ésta tecnología podía ser eficiente en la generación de biohidrógeno utilizando diversos compuestos orgánicos complejos como glucosa, celulosa, y diferentes ácidos grasos volátiles como sustrato, obteniendo una eficiencia máxima del 99% con un voltaje externo de 0.8 V .

Se ha asociado el uso de membranas de intercambio iónico con pérdidas de potencial en las CEM, por ello, con el objeto de incrementar la eficiencia de las celdas reduciéndose estas pérdidas internas, Hu y col. (2008), diseñaron y probaron un sistema de una sola cámara, libre de membrana. El experimento se llevó a cabo utilizando un consorcio microbiano mixto y aplicando un voltaje externo de 0.6 V , con lo cual obtuvieron un volumen máximo de hidrógeno de $0.63 \text{ m}^3 \text{H}_2 \text{m}^{-3} \text{d}^{-1}$.

En otro estudio, Call y Logan (2008) reportaron una alta recuperación de hidrógeno utilizando también una CEM de una sola cámara sin membrana y concluyeron que existe una relación lineal entre el voltaje aplicado a la celda y la cantidad de hidrógeno producido en la misma. Haciendo la comparación de la CEM con otros sistemas comúnmente utilizados para la generación de hidrógeno, ellos concluyeron que las CEMs utilizadas durante sus pruebas, presentaban una eficiencia de energía mucho mayor (en un 400%) que el proceso convencional de electrólisis.

La generación de hidrógeno mediante CEMs sin membrana requiere únicamente la aplicación de 0.9 kWhm^{-3} de hidrógeno; mientras que, el proceso clásico de electrólisis requiere de 5.6 kWhm^{-3} de hidrógeno, considerándose una ventaja en cuanto al uso de las CEM sobre la electrólisis.

Otra ventaja que presentan las CEM con respecto a otras tecnologías de producción de biohidrógeno, son las altas tasas de recuperación de hidrógeno, las cuales varían en un rango de 67% a 91% dependiendo del sustrato que sea utilizado como donador de electrones (por ej.,

celulosa, glucosa, ácido láctico, ácido propiónico, etanol o acetato). Estos altos porcentajes de recuperación ofrecen un doble beneficio, por un lado maximizan los niveles de energía deseados y por el otro disminuyen la DBO del influente hasta alcanzar los niveles esperados en el efluente. Además, pueden ser acopladas perfectamente con los sistemas de digestión anaerobia, generando cantidades de hidrógeno mayores a los que se pueden alcanzar utilizando cada uno de estos sistemas por separado.

Para poder considerar esta tecnología como una alternativa viable de tratamiento de aguas residuales a nivel real, uno de los mayores retos consiste en proporcionar a la celda la energía necesaria para su operación. Debido a que pueden presentarse pérdidas de energía en diversas partes de la celda, es difícil determinar con exactitud el voltaje que se debe aplicar para su funcionamiento. Por lo tanto, si el voltaje que se necesita aplicar es demasiado alto, el proceso se vuelve no redituable debido a que el costo de la energía necesaria para la generación de hidrógeno superará a los beneficios obtenidos con el aprovechamiento del gas. Con el objetivo de alcanzar un balance positivo de energía en la CEM, el voltaje aplicado deberá ser menor a 0.6 V, lo que implica que la suma de las pérdidas no deberá superar los 0.5 V (*Lee et al., 2010*).

Otro aspecto importante a considerar es el lograr una producción de hidrógeno alta, lo cual permitirá que los costos de capital del proceso sean bajos. La producción volumétrica de hidrógeno (ej. $\text{LH}_2\text{L}^{-1}\text{h}^{-1}$) depende de la densidad de corriente en el ánodo (Am^{-2}) y el área superficial específica del mismo (m^2m^{-3}), debido a que la velocidad de producción de H_2 es proporcional a la corriente. El mayor valor reportado hasta la fecha es de $3.12 \text{ m}^3\text{H}_2\text{m}^{-3}\text{d}^{-1}$ aplicando un voltaje de 0.8 V, siendo muy bajo en comparación con el máximo obtenido de $189.6 \text{ m}^3 \text{H}_2\text{m}^{-3}\text{d}^{-1}$ mediante Fermentación Oscura (*Lee et al., 2010*).

Con el objeto de obtener una alta producción de hidrógeno aplicando un voltaje bajo a la CEM, será necesario desarrollar nuevos materiales que permitan construir electrodos y membranas más eficientes, encontrar una configuración adecuada de las CEMs e identificar a los microorganismos anodófilos que puedan consumir los compuestos orgánicos presentes en las aguas residuales con mayor eficiencia y rapidez.

Además, se deberán de enfocar esfuerzos en la búsqueda de alternativas que permitan separar el ánodo y el cátodo sin que se generen pérdidas internas en las celdas por fluctuaciones en el pH o el transporte de electrones (*Lee et al., 2010*). En la Tabla 3.2 se enlistan algunos de los resultados obtenidos al utilizar diferentes materiales de los electrodos y tipos de sustrato, al realizar pruebas con CEMs de una sola cámara y dos cámaras.

Tabla 3.2. Resultados obtenidos utilizando CEMs para la generación de hidrógeno.

ÁNODO	CÁTODO/Pt (mg/cm ²)	MEMBRANA	SUSTRATO	E _{ap} (V)	VOL. LÍQUIDO (mL)	I _A (A/m ²)	C _E (%)	r _{H2} (%)	n _w (%)	Q _{H2} (m ³ /d/m ³)	REF.
SISTEMAS DE DOS CÁMARAS											
Tela de carbón	Papel Carbón/0.5	Nafion	Acetato	0.6	200		78	72			(Liu et al., 2005a)
Filtro de grafito	Malla de Ti/0.5	Nafion	Acetato	0.5	6600	0.5		53		0.02	(Rozendal et al., 2006)
	Malla de Ti/0.5	CEM	Acetato	1	3300	2.4	23	23	148	0.33	(Rozendal et al., 2007)
	Filtro de grafito, biocátodo	CEM	Acetato	-0.7*	250	1.2		<49 ⁺		0.63	(Rozendal et al., 2008b)
		CEM	Acetato	-0.7*	250	3.3		<21 ⁺		0.04	(Selemba et al., 2009a)
	Placa de Ti/0.5	Nafion	Acetato	0.8	360	2.8	62	53		0.052	(Chae et al., 2008)
Gránulos de grafito	Tela de carbón/0.5	AEM	Celulosa	0.6	42			68	268	0.11	(Cheng y Logan, 2007 a)
		AEM	Acetato	0.6	42		96	91	261	1.1	(Cheng y Logan, 2007 a)
Papel carbón	Papel carbón/0.5	Nafion	Agua residual doméstica	0.5	512	0.2	23	9.9			(Ditzig et al., 2007)
	Papel carbón/2	PEM	Acetato	0.35	900	0.4	33	32		0.015	(Sun et al., 2009)
Tela de Carbón	Papel carbón/0.5		Acetato	1	50	4.7	95	97.5		6.32	(Tartakovsky et al., 2009)
SISTEMAS DE UNA SOLA CÁMARA											
Papel carbón	Papel carbón/0.5		Acetato	0.6	300	9.3	75	63	204	0.53	(Hu y col., 2008)
	Papel carbón+NiMo		Acetato	0.6	18	12	75	65	182	2.0	(Hu y col. 2009)
	Papel carbón+NiW		Acetato	0.6	18	9	73	55	114	1.5	(Hu y col. 2009)
Cepillo de grafito	Cepillos de acero inoxidable		Acetato	0.6	28	88 A/m ^{3c}		<83	221	1.7	(Call y col. 2009)
			Acetato	0.6	28	131 A/m ^{3c}	108	56	137	0.76	(Jeremiasse y col. 2009)

ÁNODO	CÁTODO/Pt (mg/cm ²)	MEMBRANA	SUSTRATO	E _{ap} (V)	VOL. LÍQUIDO (mL)	I _A (A/m ²)	C _E (%)	r _{H2} (%)	n _w (%)	Q _{H2} (m ³ /d/m ³)	REF.
Cepillo de grafito	Papel carbón/0.5		Acetato	0.6	28	7.4	96	92	254	1.99	(Call y Logan 2008)
	Papel carbón/0.5		Acetato	0.8	28	11.6	98	94	194	3.12	(Call y Logan, 2008)
	Papel carbón/0.5		Agua residual porcícola	0.5	28	4.2	29	17	190	0.9	(Wagner y col. 2009)
	Papel carbón/0.5		Glicerol	0.9	28	8.8	104	82	139	2.0	(Selembó y col. 2009 b)
	Papel carbón/0.5		Celulosa	0.5	28		73	63	270	1.11	(Lalurette y col. 2009)
	Papel carbón/0.5		Efluente de fermentación	0.6	26	5.6	87	83	252	1.41	(Lu y col. 2009)
Gránulos de grafito	Tela de carbón		Acetato	1.06	140	50 A/m ^{3c}	60	59		0.57	(Lee y col. 2009)

*Potencial catódico Vs. Ag/AgCl

[†]Porcentaje de hidrógeno recuperado en el cátodo, el cual corresponde al porcentaje de corriente utilizada para producir hidrógeno en el cátodo

[‡]Densidad volumétrica de corriente, calculada con base en el volumen de la solución

I_A: Densidad de corriente, calculada con base en el área superficial del cátodo o el ánodo

C_E: Eficiencia coulombica, porcentaje de sustrato utilizado en la generación de corriente

r_{H2}: Porcentaje de hidrógeno recuperado, porcentaje de sustrato utilizado para generar hidrógeno en el cátodo

n_w: Eficiencia energética, cantidad de energía recuperada como hidrógeno con respecto a la energía eléctrica alimentada

Q_{H2}: Producción de hidrógeno, calculada con base en el volumen de líquido

AEM: Membrana de intercambio aniónico (por sus siglas en inglés)

CEM: Membrana de éster de celulosa (por sus siglas en inglés)

PEM: Membrana de intercambio protónico (por sus siglas en inglés)

E_{ap}: Voltaje aplicado

3.3. Sistemas acoplados de producción de hidrógeno

Debido a las deficiencias que presentan tanto el proceso de Fermentación Oscura como las Celdas Electroquímicas Microbianas en sus niveles alcanzados de producción de hidrógeno, recientes investigaciones han sugerido el acoplar ambos sistemas, de tal manera que los productos de la Fermentación Oscura que aún pueden ser aprovechados por los microorganismos presentes en las CEMs, sean reducidos hasta generar hidrógeno.

Por otra parte, ya que las CEMs requieren de una fuente de energía externa para su operación de aproximadamente 0.6 V y, a que en varias pruebas realizadas con CCMs se han logrado voltajes superiores a los 0.8 V, algunos autores han sugerido el acoplar ambos sistemas para la generación de hidrógeno.

En la Figura 3.8 se muestra un esquema representativo de la conexión y funcionamiento del sistema acoplado CEM-CCM. El ánodo de la CEM estaría conectado con el cátodo de la CCM. A su vez, el ánodo de la CCM se conectaría a una resistencia y posteriormente al cátodo de la CEM para con ello completar el circuito. Existe la opción de que se utilice la misma fuente de sustrato tanto en el ánodo de la CEM como en el ánodo de la CCM, o también podrían utilizarse dos sustratos diferentes.

Hasta el momento, son pocos los trabajos reportados en la literatura en los que se utilizan sistemas acoplados, ya sea Fermentación Oscura-CEM ó CEM-CCM. Por ejemplo, Sun y col. (2008), desarrollaron un sistema acoplado CEM-CCM para la producción de hidrógeno a partir de acetato, utilizando una CEM de doble cámara, con un ánodo de papel carbón y un cátodo de papel carbón con Pt y, una CCM de una sola cámara, con ánodo y cátodo de los mismos materiales que la CEM. Las bacterias presentes en ambos ánodos fueron inoculadas a partir de lodo anaerobio. El sistema fue operado variando las concentraciones de una solución de fosfato utilizada como solución tampón para ayudar a incrementar la producción de hidrógeno. El volumen máximo de hidrógeno fue de $14.9 \pm 0.4 \text{ mLH}_2\text{L}^{-1}\text{d}^{-1}$ obtenido con una concentración de fosfato de 100 mM.

Otro estudio utilizando un sistema CEM-CCM para el tratamiento de acetato, permitió demostrar que la producción de hidrógeno puede ser manipulada variando la cantidad de corriente que se aplica a la CEM. Este voltaje puede ser regulado aplicando diferentes resistencias conectadas al sistema, así, cuando se presentó un cambio de resistencia de 10 Ω hasta 10 k Ω , la corriente y el volumen de hidrógeno producidos por el sistema variaron en un rango de 78 ± 12 a $9 \pm 0 \text{ mA m}^{-2}$ y 2.9 ± 0.2 a $0.2 \pm 0.0 \text{ mLH}_2\text{L}^{-1}\text{d}^{-1}$, respectivamente. Además, con el objeto de aplicar un mayor voltaje a la CEM, se conectaron varias CCM en serie, observándose un incremento tanto en el voltaje suministrado a la CEM como en la cantidad de hidrógeno producido por la misma (*Sun et al., 2009*). Pruebas similares se realizaron utilizando propionato como sustrato; sin embargo, en este caso la corriente y el volumen de hidrógeno obtenidos fueron mayores variando en un rango de

343 a 81 mA^m⁻² y 11.9 a 3.6 mLH₂L⁻¹d⁻¹, respectivamente. Comparado con el acetato, el propionato puede ser convertido a hidrógeno con una velocidad similar pero con un mayor rendimiento (Sun et al., 2010).

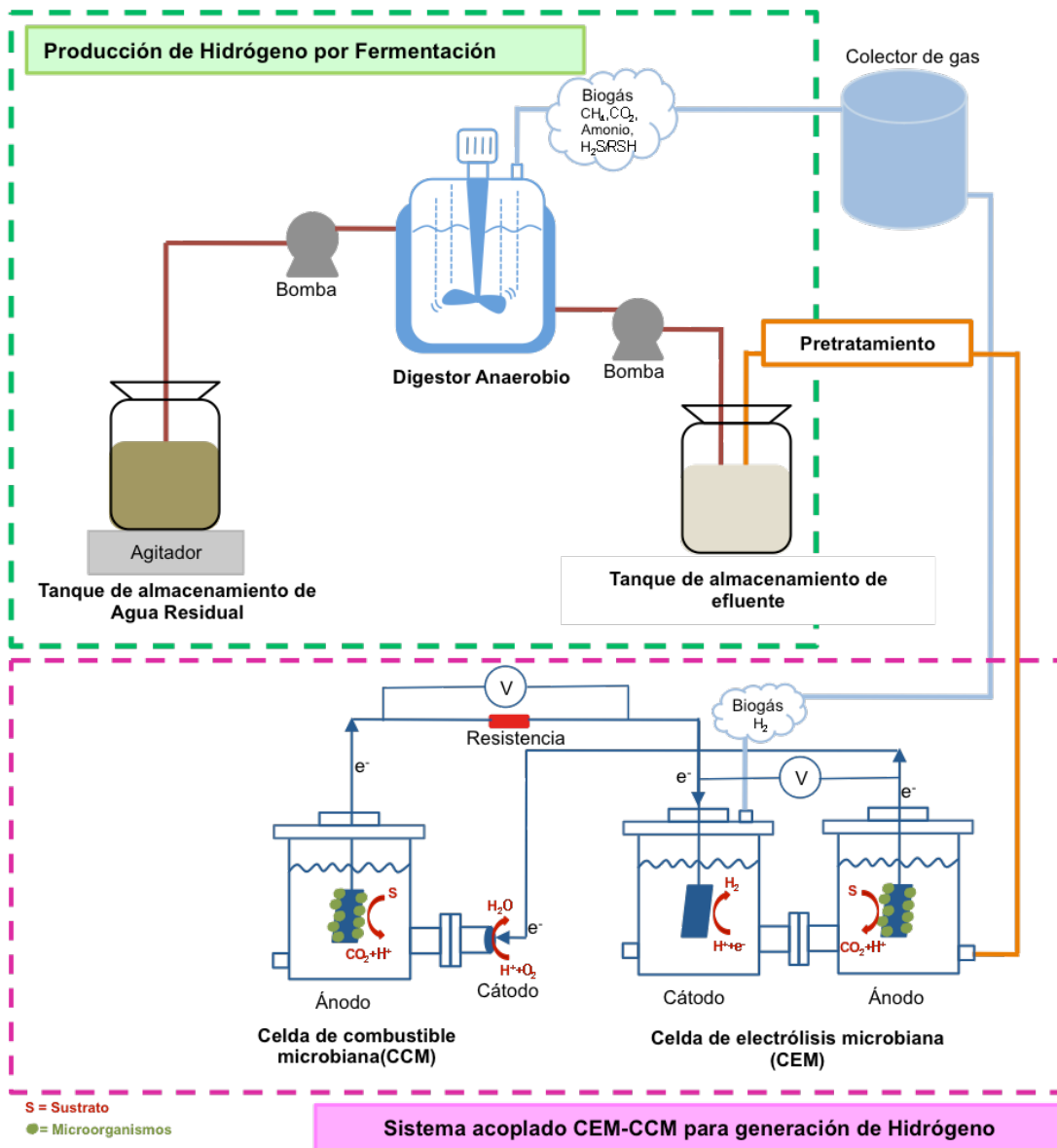


Figura 3.8. Esquema representativo del acoplamiento CEM-CCM para la producción de hidrógeno y generación de electricidad. (S=Sustrato, V= Medición de voltaje)

En una CEM, una considerable cantidad de electricidad es requerida. Esto disminuye su eficiencia de funcionamiento debido a la gran demanda de energía durante los procesos de electrólisis. En comparación con los sistemas convencionales (CEM y CCM), el sistema acoplado CEM-CCM tiene dos ventajas principales: a) se puede obtener hidrógeno a partir del sustrato contenido en la CEM y CCM sin necesidad de una fuente alterna de energía; y b) la energía eléctrica producida en la

CCM es utilizada *in situ* y, esto se ve reflejado en un ahorro en cuanto a la compra de equipo para el almacenamiento de electricidad y además disminuye la pérdida de voltaje de la misma.

Para que estos sistemas acoplados puedan llegar a desarrollarse a gran escala, se deben realizar mayores pruebas que permitan su optimización. Algunos problemas que se presentan son los siguientes: la producción de hidrógeno se opera bajo circunstancias inestables, resultando en la variación de la corriente e hidrógeno producidos en el sistema; hay muchos factores que afectan la estabilidad de las CCM, tales como el tipo de sustrato y su concentración, la actividad catalítica de los organismos presentes en el ánodo, la resistencia interna del sistema, entre otros; en una CEM, el voltaje adicional aplicado puede fijarse y mantenerse constante a lo largo de las pruebas, sin embargo, en un sistema acoplado, la CEM puede influir en el comportamiento de la CCM y viceversa, por lo que, cualquier cambio en los factores mencionados con anterioridad, pueden ocasionar la inestabilidad del sistema global. Por lo tanto, se requiere un gran esfuerzo y un mayor número de investigaciones para lograr la estabilidad a largo plazo de estos sistemas acoplados CEM-CCM.

También se han realizado algunos estudios acoplando un sistema de Fermentación Oscura con CEMs, por ejemplo, Lalaurette y col. (2009), utilizaron los productos de la fermentación tanto de un agua residual conteniendo lignocelulosa, como de un agua residual con celobiosa, para ser adicionados en una CEM. En ambos casos, los principales componentes de este efluente fueron: ácido acético, láctico, succínico, fórmico y etanol. Mediante la Fermentación Oscura los volúmenes de hidrógeno obtenidos fueron: en el caso de la lignocelulosa $250 \text{ mLH}_2 \text{ L}^{-1}\text{d}^{-1}$ y $1650 \text{ mLH}_2 \text{ L}^{-1}\text{d}^{-1}$ para la celobiosa. Con la CEM, se logró un volumen adicional de hidrógeno de $1000 \text{ mLH}_2 \text{ L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ para la lignocelulosa y $960 \text{ mLH}_2 \text{ L}^{-1}\text{d}^{-1}$ para la celobiosa.

Sharma y Li (2010), probaron que al acoplar un sistema de Fermentación Oscura con una CCM, se puede lograr un aumento en la eficiencia de conversión de energía y en la eliminación de materia orgánica de un agua residual, llegándose a obtener hasta un 29% de eficiencia de conversión y un 71% de eliminación de materia orgánica. Realizando una simulación de la cinética de reacción de este sistema híbrido Fermentación Oscura-CCM, la máxima producción de hidrógeno calculada fue de $2.85 \text{ molH}_2\text{mol}^{-1}$ de glucosa, con una máxima recuperación de energía de 559 JL^{-1} y un 97% de remoción de DQO.

En la Tabla 3.3 se presenta un resumen de los resultados y estudios realizados con sistemas acoplados.

Tabla 3.3. Investigaciones realizadas hasta la fecha utilizando sistemas acoplados.

SISTEMA UTILIZADO	TIPO DE SUSTRATO	FUENTE DEL INOCULO	CONFIGURACIÓN Y MATERIALES UTILIZADOS PARA SU CONSTRUCCIÓN	PRODUCCIÓN DE HIDRÓGENO	REFERENCIA
CEM-CCM acoplado	Acetato	Bacterias pre-aclimatadas en una CCM con lodo anaerobio	CEM: Doble cámara, membrana (GEFC-10N), cátodo de papel carbón con Pt, ánodo de papel carbón. CCM: Una sola cámara, cátodo de papel carbón con grafito, ánodo de papel carbón.	≈14.9 mLH ₂ L ⁻¹ d ⁻¹ (con una concentración de solución tampón de fosfato 100 mM)	(Sun et al., 2008)
CEM-CCM acoplado	Acetato	Bacterias pre-aclimatadas en una CCM con lodo anaerobio	CEM: Doble cámara, membrana (GEFC-10N), cátodo de papel carbón con Pt, ánodo de papel carbón. CCM: Una sola cámara, cátodo de papel carbón con grafito, ánodo de papel carbón.	2.9±0.2 a 0.2±0.0 mL H ₂ L ⁻¹ d ⁻¹ (con una resistencia de 10 kΩ)	(Sun et al., 2009)
CEM-CCM acoplado	Propionato	Bacterias pre-aclimatadas en una CCM con lodo anaerobio	CEM: Doble cámara, membrana (GEFC-10N), cátodo de papel carbón con Pt, ánodo de papel carbón. CCM: Una sola cámara, cátodo de papel carbón con grafito, ánodo de papel carbón.	11.9 a 3.6 mL H ₂ L ⁻¹ d ⁻¹ (con una resistencia de 10 kΩ)	(Sun et al., 2010)
Fermentación CEM	Oscura- Lignocelulosa y celobiosa	Efluente de la fermentación	CEM: Una sola cámara, ánodo de cepillos de grafito, cátodo de papel carbón	Fermentación Oscura: 250 mLH ₂ L ⁻¹ d ⁻¹ para lignocelulosa y 1650 mLH ₂ L ⁻¹ d ⁻¹ para la celobiosa Volumen adicional producido con la CEM: 1000 mLH ₂ L ⁻¹ d ⁻¹ para la lignocelulosa y 960 mLH ₂ L ⁻¹ d ⁻¹ para la celobiosa	(Lalurette et al., 2009)
Fermentación CCM	Oscura- Glucosa	Agua residual doméstica	CCM: Una sola cámara, ánodo y cátodo de cepillos de grafito	2.85 mol H ₂ /mol de glucosa (proyectada mediante simulaciones)	(Sharma y Li, 2010)

CAPÍTULO 4

METODOLOGÍA

4. METODOLOGÍA

La metodología que se siguió durante el desarrollo de esta investigación se dividió en tres etapas experimentales, las cuales se visualizan en el siguiente diagrama de bloques:

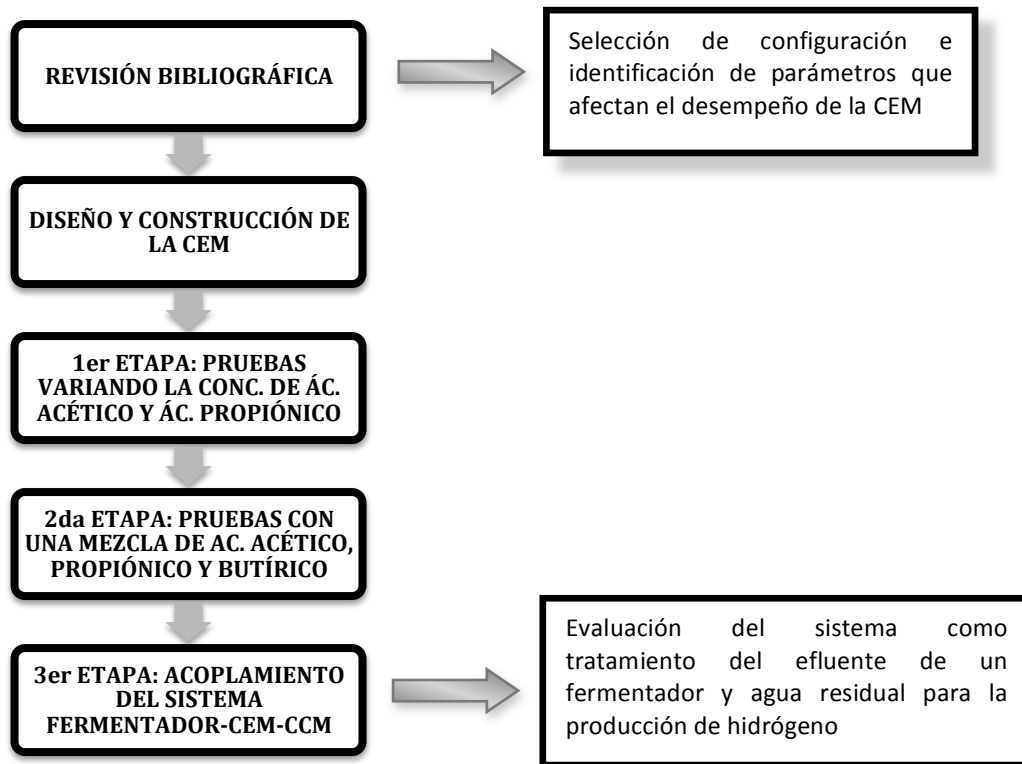


Figura 4.1. Diagrama de bloques de la metodología a seguir durante este proyecto de investigación.

4.1. Diseño y construcción de la CEM

Para realizar las pruebas correspondientes a cada una de las etapas antes mencionadas se utilizaron celdas con una configuración de dos cámaras de 450 mL cada una y separadas por una membrana de intercambio aniónico (5 x 5 cm, AMI 7001, Membranes International, Glen Rock, NJ) y/o catiónico (5 x 5 cm, NAFION TM 117, ElectroChem, Inc, MA). La celda se fabricó de acrílico con espacios disponibles para toma de muestras, conexión de electrodos y salida de gas producido.

Como cátodo se utilizó un electrodo de papel carbón con Pt (5 x 5 cm, 0.5 mg/cm², ElectroChem, Inc, MA). Para el ánodo se utilizó papel carbón (5 x 5 cm, Toray TM, ElectroChem, Inc, MA). Los electrodos se conectaron con alambre de Ti al circuito externo. En la Figura 4.2 se presenta una imagen de la celda que se utilizó ya sea como CEM o como CCM.

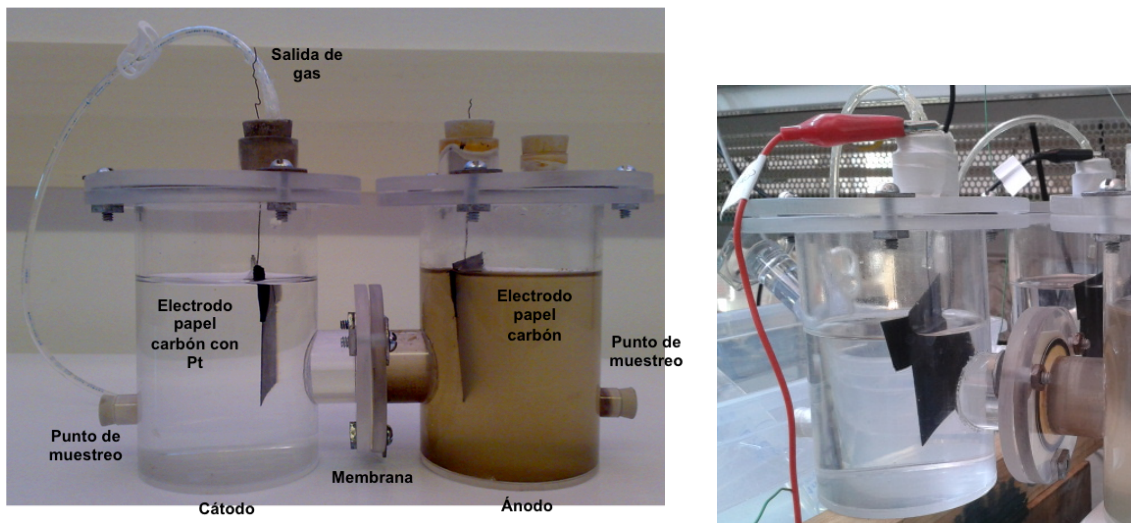


Figura 4.2. Prototipo de CEM o CCM utilizado en las diferentes etapas experimentales.

4.2. Primer etapa experimental: Pruebas variando la concentración de ácido acético y ácido propiónico

4.2.1. INOCULACIÓN Y PUESTA EN MARCHA

Para realizar la inoculación del ánodo de las CEMs, se utilizaron 300 mL de una solución preparada con una mezcla de agua residual proveniente de la Planta de Tratamiento de Aguas Residuales del Campus Juriquilla de la UNAM (75:25 v/v), buffer de fosfatos salino en una concentración 50 mM y nutrientes (vitaminas y minerales). La solución anódica se preparó de la siguiente manera: acetato de sodio, 1.64 g/L; NH_4Cl , 0.31 g/L; KCl , 0.13 g/L; $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 2.69 g/L; Na_2HPO_4 , 4.33 g/L; NaCl , 2.85 g/L; minerales, 12.5 mL/L y 12.5 mL/L de vitaminas.

La solución mineral estuvo compuesta por (g/L): MgSO_4 3.0; $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0.5; NTA 1.5; NaCl 1.0; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.1; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.1; $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.1; ZnCl_2 0.13; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0.01; $\text{AlK}(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 0.01; H_3BO_3 0.01; Na_2MoO_4 0.025; $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.024; $\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.025 (Lovley y Phillips, 1988).

La solución de vitaminas se preparó como sigue (mg/L): biotina 2.0; ácido fólico 2.0; clorhidrato de piridoxina 10.0; riboflavina 5.0; tiamina 5.0; ácido nicotínico 5.0; ácido pantoténico 5.0; B12 0.1; ácido p-aminobenzóico 5.0 y ácido tiocínico 5.0 (Lovley y Phillips, 1988).

Como solución catódica se utilizaron 300 mL de buffer de fosfatos salino en una concentración 50 mM con un pH de 7.0. Las CEMs se operaron por lotes, trabajando a temperatura ambiente y cubriéndolas con papel aluminio para evitar el paso de la luz y con ello el crecimiento de bacterias fototróficas.

Al inicio de cada ciclo de operación las CEMs se sellaron perfectamente y burbujearon con N_2 durante 10 min para tener condiciones anaerobias en ambas cámaras. Se aplicó un voltaje

constante de 0.6 V utilizando una fuente de poder (GWInstek, modelo GPS-4303), conectando el polo positivo de la fuente de poder al ánodo y el negativo al cátodo. La corriente generada por las celdas se midió por medio de un multímetro al final de cada ciclo de operación. Para cuantificar el gas producido por la celda se utilizó el método de desplazamiento de agua por medio de una probeta invertida, manguera y una aguja conectada en la parte superior de la cámara catódica.

4.2.2. PRUEBAS VARIANDO LAS CONCENTRACIONES DE ÁCIDO ACÉTICO Y ÁCIDO PROPIÓNICO

Una vez inoculado el ánodo de las celdas (se consideró que las celdas se encontraban inoculadas una vez que se observó un consumo de corriente constante), se evaluó el efecto del tipo y concentración de ácidos grasos volátiles sobre la producción de hidrógeno. Para ello se utilizaron dos ácidos grasos volátiles: acético y propiónico y tres niveles de concentración (acético (mg/L): 1843, 1500, 1106; propiónico (mg/L): 325, 250, 195) en un diseño CCD (Central Composite Design), con 14 experimentos en total divididos en dos bloques (Tabla 4.1).

Tabla 4.1. Matriz del diseño experimental variando las concentraciones de ácido acético y ácido propiónico.

RANGO Y NIVEL					
FACTORES	- α	Bajo (-1)	Medio (0)	Alto (+1)	+ α
Conc. Ác. Acético (mg/L)	950	1106	1500	1843	2000
Conc. Ác. Propiónico (mg/L)	160	195	250	325	360

DISEÑO EXPERIMENTAL						
Corrida	Bloque	Factor Acético	Factor Propiónico	Conc. Acético (mg/L)	Conc. Propiónico (mg/L)	ID de las muestras
1	B1	0	0	1500	250	A1500/P250C1
2	B1	1	1	1843	325	A1843/P325
3	B1	-1	1	1106	325	A1106/P325
4	B1	1	-1	1843	195	A1843/P195
5	B1	0	0	1500	250	A1500/P250C2
6	B1	0	0	1500	250	A1500/P250C3
7	B1	-1	-1	1106	195	A1106/P195
8	B2	0	0	1500	250	A1500/P250C4
9	B2	α	0	2000	250	A2000/P250
10	B2	0	0	1500	250	A1500/P250C5
11	B2	0	0	1500	250	A1500/P250C6
12	B2	0	α	1500	360	A1500/P360
13	B2	0	- α	1500	160	A1500/P160
14	B2	- α	0	950	250	A950/P250

Los dos bloques experimentales se corrieron en diferentes periodos de tiempo pero utilizando la misma fuente de inóculo (el primer bloque experimental se realizó en Septiembre y el segundo en Diciembre). Además de las concentraciones de ácido acético y propiónico mencionadas anteriormente, se adicionó NH_4Cl , 0.31 g/L; KCl , 0.13 g/L; $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 2.69 g/L; Na_2HPO_4 , 4.33 g/L; NaCl , 2.85 g/L; minerales, 12.5 mL/L y 12.5 mL/L de vitaminas. Las soluciones de vitaminas y

minerales se prepararon de acuerdo a lo mencionado en la sección 4.2.1. Como solución catódica se utilizó nuevamente buffer de fosfatos salino en una concentración 50 mM ajustada a un pH de 7.0. Las concentraciones de ácidos grasos utilizadas en el diseño experimental fueron fijadas de acuerdo a los resultados obtenidos en efluentes de fermentadores operando a diferentes condiciones. Ya que se planea utilizar posteriormente a las CEMs con un efluente real, es necesario conocer el comportamiento de las mismas operando en condiciones similares, por ello el hecho de utilizar estos dos ácidos en particular con estas concentraciones.

Las CEMs se operaron de acuerdo a lo especificado en la etapa de inoculación y puesta en marcha. La operación se realizó por lotes, con ciclos de operación de 48 horas (tiempo en el que se observó un consumo de voltaje mínimo de 20 mV). El volumen y composición de gas generado por las CEMs se midió al final de cada ciclo de operación. Además, se tomaron muestras de la alimentación y efluente de las mismas al inicio y final de cada ciclo de operación para determinar la cantidad de materia orgánica removida (medida como DQO) y la remoción de los ácidos alimentados.

Una vez finalizada la etapa de experimentación se tomaron muestras de la biopelícula adherida a la superficie del ánodo para conocer la dinámica poblacional mediante las técnicas microbiológicas de 454 GS-FLX pirosecuenciación y PCR en tiempo real.

Los parámetros cuantificados fueron los siguientes: DQO (método HACH); Concentración de gases (H_2 , CH_4 , CO_2) por cromatografía de gases; Concentración de AGV por cromatografía de gases y Volumen de gas (por el método de desplazamiento de agua).

Con los parámetros cuantificados anteriormente se calculó: a) la remoción de materia orgánica como DQO (%); b) la remoción de ácido acético y ácido propiónico (%); c) la densidad de corriente (DC, A/m^2); d) la eficiencia coulombica (EC, %); e) el porcentaje total de hidrógeno recuperado en el cátodo (r_{H_2} , %); f) la producción de hidrógeno (Q_{H_2} , mL/d/ $L_{reactor}$) y g) la tasa de rendimiento de hidrógeno (Y_{H_2} , mmol de H_2 /g DQO removida), que se detallan más adelante en la sección 4.5.

Se realizó el análisis de varianza y se encontraron los gráficos de superficie de respuesta para cada una de las variables de respuesta seleccionadas utilizando el paquete estadístico Statgraphics Centurion XV. El mejor modelo se obtuvo utilizando el método del ascenso más pronunciado, una vez seleccionado el modelo se generaron las mejores condiciones para cada una de las variables estudiadas.

Además, se llevó a cabo un análisis de optimización de respuestas múltiples considerando la técnica de optimización simultánea establecida por Derringer y Suich (1980), utilizando nuevamente el paquete estadístico Statgraphics Centurion XV. Su procedimiento hace uso de las funciones de conveniencia o deseabilidad. El enfoque general de este análisis consiste en convertir primero cada respuesta y_i en una función de deseabilidad individual d_i que varía en el rango de

$0 \leq d_i \leq 1$, donde si la respuesta y_i está en su meta u objetivo, entonces $d_i=1$, y si la respuesta y_i está fuera de una región aceptable, $d_i=0$.

El modelo estadístico utilizado por el programa se basa en maximizar las variables de respuesta seleccionadas utilizando una función definida como:

$$d = \begin{cases} 0 & \hat{y} < bajo \\ \left(\frac{\hat{y}-bajo}{alto-bajo}\right)^s & bajo \leq \hat{y} \leq alto \\ 1 & \hat{y} > alto \end{cases} \quad (4.1)$$

donde \hat{y} es el valor predicho de la variable de respuesta, *bajo* es un valor por debajo del cual la respuesta es completamente inaceptable, y *alto* es un valor por arriba del cual la deseabilidad se encuentra en su máximo. El parámetro s define la forma que tendrá la función.

Para combinar la deseabilidad de m respuestas, se crea una función compuesta D . Si se considera que todas las variables de respuesta tienen la misma importancia, entonces la función compuesta será la media geométrica de cada una de las deseabilidades, esto es:

$$D = \{d_1 d_2 \dots d_m\}^{1/m} \quad (4.2)$$

4.3. Segunda etapa experimental: Pruebas con una mezcla de ácido acético, propiónico y butírico

4.3.1. INOCULACIÓN Y PUESTA EN MARCHA

La inoculación de los ánodos de las celdas microbianas se realizó operándolas como CCMs. Se optó por utilizar esta técnica de inoculación (a diferencia de utilizar las celdas como CEMs desde un principio como en la primer etapa experimental) para permitir una selección natural de microorganismos electroquímicamente activos que podría ser más diversa en comparación con la biopelícula electroactiva desarrollada a un potencial fijo. La operación se realizó por lotes con cambio en las soluciones anódica y catódica cuando se observaba un mínimo en el voltaje generado. Se utilizó una resistencia externa de 1000 Ω . El voltaje se midió por medio de una tarjeta de adquisición de datos (NI USB-6008, National Instruments, 8 inputs, 12 bits, 10 Ks/s Multifunction I/O) conectada a una computadora. Los valores de voltaje medidos se registraron por medio de un programa diseñado en Lab View 7.1 (National Instruments, 2004). Una vez que se observó la generación de voltaje de manera constante, se cambió el modo de operación de las celdas a una CEM para realizar las pruebas con la mezcla de ácidos (manteniendo condiciones anaerobias en ambas cámaras de la celda).

Como solución anódica se utilizaron 300 mL de una mezcla de agua residual, buffer de fosfatos salino y acetato de sodio, preparada como sigue: 75% en volumen de agua residual; acetato de sodio en una concentración 20 mM (1.64 g/L) y 25% en volumen de buffer de fosfatos salino con nutrientes (vitaminas y minerales) en una concentración 100 mM.

El buffer de fosfatos salino con nutrientes contenía las siguientes concentraciones de reactivos en g/L: 0.31 de NH_4Cl ; 0.13 de KCl ; 5.8 de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$; 8.19 de Na_2HPO_4 ; 2.85 de NaCl ; 12.5 mL de minerales y 12.5 mL de vitaminas.

La solución de minerales estuvo compuesta por (g/L): MgSO_4 3.0; $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0.5; NTA 1.5; NaCl 1.0; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.1; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.1; $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.1; ZnCl_2 0.13; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0.01; $\text{AlK}(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 0.01; H_3BO_3 0.01; Na_2MoO_4 0.025; $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.024; $\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.025 (Lovley y Phillips, 1988).

Mientras que la solución de vitaminas consistió en (mg/L): biotina 2.0; ácido fólico 2.0; clorhidrato de piridoxina 10.0; riboflavina 5.0; tiamina 5.0; ácido nicotínico 5.0; ácido pantoténico 5.0; B12 0.1; ácido p-aminobenzóico 5.0 y ácido tiócnicico 5.0 (Lovley y Phillips, 1988).

Como solución catódica se utilizaron 300 mL de buffer de fosfatos salino con una concentración 100 mM, el cual se preparó de la siguiente manera (g/L): 5.8 de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$; 8.19 de Na_2HPO_4 y 2.85 de NaCl .

4.3.2. PRUEBAS CON LA MEZCLA DE ÁCIDOS

Una vez inoculados los ánodos de las celdas (se asumió que las celdas se encontraban adecuadamente inoculadas al registrarse la generación de voltaje de manera constante), se comenzaron las pruebas con la mezcla de ácidos (acético, propiónico y butírico). Para llevar a cabo estas pruebas se utilizaron dos CEMs, en cada una de ellas se adicionó como solución anódica 300 mL de buffer de fosfatos con nutrientes (100 mM, preparado de acuerdo a lo descrito en la sección 4.3.1) y las concentraciones de ácido acético, propiónico y butírico que se presentan en la Tabla 4.2.

Tabla 4.2. Concentraciones de ácido acético, propiónico y butírico utilizadas en la solución anódica de las CEMs.

SUSTRATO, mg/L	CEM1	CEM2
CICLOS DE ALIMENTACIÓN DEL 1-6		
Ác. Acético	1500	1500
Ác. Propiónico		250
CICLOS DE ALIMENTACIÓN DEL 7-12		
Ác. Acético	1500	1500
Ác. Propiónico		250
Ác. Butírico	600	600

Primero se utilizó una mezcla de ácido acético y ácido propiónico durante seis ciclos de operación. La CEM1 sólo contenía ácido acético y la CEM2 una mezcla de ácido acético y ácido propiónico, esto con la finalidad de estudiar el efecto del ácido propiónico en el funcionamiento de las CEMs, ya que se ha comprobado en investigaciones previas que el ácido acético es el más aceptado por los microorganismos anodofílicos y presenta las mejores tasas de rendimiento y producción de

hidrógeno y el ácido propiónico puede generar inhibición en el crecimiento y desarrollo de los microorganismos anodofílicos. Posteriormente se adicionó ácido butírico a cada una de las CEMs durante otros seis ciclos de operación para conocer el comportamiento de las mismas cuando se utilizaba este ácido como sustrato adicional. Como solución catódica se utilizó buffer de fosfatos salino 100 mM. Se ajustó el pH tanto de la solución anódica como catódica a 7.

Las CEMs se operaron por lotes, con cambio total de la solución anódica y catódica al final de cada ciclo de operación. Los ciclos de operación fueron de 48 h. Durante cada ciclo de operación las celdas fueron gaseadas con N_2 por 10 min para tener condiciones anaerobias en ambas cámaras. Se aplicó un voltaje constante de 0.6 V utilizando una fuente de poder (GWInstek, modelo GPS-4303, Laboratory DC Power Supply). Se midió el voltaje de manera constante utilizando una tarjeta de adquisición de datos (NI USB-6008, National Instruments, 8 inputs, 12 bits, 10 Ks/s Multifunction I/O), para determinar la corriente generada por las CEMs, se colocó una resistencia externa conocida (10 ohm) entre la terminal positiva de la fuente de poder y el ánodo de la CEM. Posteriormente con el voltaje medido se estimó la corriente con la relación V/R_{ext} . El programa utilizado para registrar las mediciones se diseñó en Lab View 7.1 (National Instruments, 2004).

Durante cada ciclo de operación se tomaron muestras del influente y efluente al inicio y final de cada ciclo de operación para determinar la composición de materia orgánica (medida como DQO) y las concentraciones de los ácidos utilizados. Además, al final se midió el volumen y composición del biogás formado. Con estos datos se calcularon: a) la remoción de materia orgánica como DQO (%); b) la remoción de ácido acético y ácido propiónico (%); c) la densidad de corriente (DC, A/m^2); d) la eficiencia coulombica (EC, %); e) el porcentaje total de hidrógeno recuperado en el cátodo (r_{H_2} , %); f) la producción de hidrógeno (Q_{H_2} , mL/d/ $L_{reactor}$) y g) la tasa de rendimiento de hidrógeno (Y_{H_2} , mmol de H_2 /g DQO removida).

4.4. Tercer etapa experimental: Acoplamiento del sistema fermentador-CEM-CCM

Como etapa final de experimentación de este proyecto de investigación se realizaron pruebas acoplando el sistema Fermentador-CEM-CCM. Para ello se utilizaron dos CEMs y dos CCMs, las cuales fueron inoculadas primeramente de acuerdo a la metodología descrita en la sección 4.3.1.

Una vez inoculados los ánodos, las CEMs se alimentaron con el efluente de un fermentador que consiste en un reactor de vidrio marca Applikon de 6L de capacidad, operado como un SBR, por sus siglas en inglés, con un volumen de intercambio de 3L, 1L para el crecimiento de la biomasa y 2L de espacio vacío para la fase gaseosa. El reactor está equipado con una chaqueta térmica para el control de la temperatura, bombas dosificadoras para el control del pH [ácido (HCl) o base (NaOH), de acuerdo con las necesidades del proceso] y bombas para la alimentación y descarga. Además, cuenta con un sensor de temperatura, un sensor de pH y un agitador vertical. Éste se maneja a través de un biocontrolador (Applikon ADI 1030 Bio Controller), cuya función es mantener las variables operacionales de control en el valor establecido por el usuario. El biogás

producido se mide utilizando el método de desplazamiento de agua, por medio de un dispositivo de Marriotte. El reactor se operó a una temperatura de 35 °C, pH de 7 con un TRH de 16 h. La alimentación se realizó en continuo utilizando un agua residual sintética con glucosa a una concentración de 20 g/L como fuente de carbono.

Las CEMs fueron operadas de la siguiente manera: se utilizó primero como solución anódica una mezcla 50:50 de efluente de fermentador y buffer de fosfatos salino con nutrientes (vitaminas y minerales) en una concentración 100 mM, posteriormente se adicionó el efluente al 100% en volumen (previamente centrifugado a 3500 rpm durante 30 min y ajustado su pH en 7 con NaOH 1N).

Después de esto se realizó el acoplamiento del sistema CEM-CCM, para lo cual nuevamente se adicionó primero como solución anódica una mezcla 50:50 de efluente con buffer de fosfatos salino con nutrientes y finalmente el efluente al 100% en volumen.

Como solución catódica se empleó buffer de fosfatos salino. Las celdas fueron operadas de manera similar a lo descrito en la sección 4.3.2. El voltaje aplicado a las CEMs fue de 0.8 V utilizando una fuente de poder (GWInstek, modelo GPS-4303). Con el sistema acoplado el voltaje varió de acuerdo a lo generado por las CCMs.

En el caso de las CCMs que se acoplaron a las CEMs, se empleó como solución anódica la misma mezcla de agua residual, buffer de fosfatos salino con nutrientes y acetato de sodio utilizada durante la fase de inoculación de las celdas.

La conexión del sistema acoplado se realizó conectando el ánodo de la CEM con el cátodo de la CCM y el ánodo de la CCM con una resistencia (10 ohm) y posteriormente con el cátodo de la CEM (de manera similar a lo representado en la Figura 3.8).

Durante cada ciclo de operación se tomaron muestras tanto del influente como del efluente de las celdas al inicio y final de cada ciclo de operación para cuantificar la cantidad de materia orgánica disponible (medida como DQO) y la concentración de ácidos grasos volátiles presentes en el efluente. Además se midió el volumen y composición del biogás generado.

Adicionalmente se realizaron pruebas de voltamperometría cíclica utilizando un potenciostato (Biologic, Modelo VSP/Z-01, Science Instruments) para caracterizar la electroactividad de la biopelícula.

4.5. Técnicas Analíticas

4.5.1. DEMANDA QUÍMICA DE OXIGENO (DQO)

La DQO se determinó por medio del método de reflujo cerrado. Para ello se utilizaron tubos HACH con dicromato de potasio y ácido sulfúrico en un rango de 0-1500 mg/L. En cada uno de los viales se colocaron 2 mL de muestra filtrada. Una vez colocada la muestra, los tubos fueron digeridos a una temperatura de 150 °C durante 2 horas.

Transcurridas las 2 horas, los tubos se dejaron enfriar durante aproximadamente 20 min para posteriormente realizar su medición en un espectrofotómetro HACH a 620 nm. Con ello se obtuvo el valor de demanda química de oxígeno de la muestra en mg O₂/L.

4.5.2. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE GASES (H₂, CH₄ Y CO₂)

Para determinar la composición del biogás formado en la cámara catódica de cada una de las celdas, se tomó una muestra de 5 mL a 8 mL por medio de una jeringa.

La muestra se colectó colocando la jeringa en la parte superior de la cámara catódica, posteriormente se succionó y desplazó el gas por lo menos 2 veces para homogenizar la atmósfera en la cámara catódica, una vez tomada la muestra se inyectó inmediatamente en el cromatógrafo de gases (SRI 8610C) provisto de un detector de conductividad térmica (TCD) y dos columnas empacadas (6' x 1/8" s. s. silica gel y 6' x 1/8" s. s. molecular sieve). El cromatógrafo operó con una temperatura del inyector de 90 °C y una temperatura del detector de 150 °C. Para la columna, la temperatura inicial fue de 40 °C durante 4 minutos y se incrementó gradualmente a una tasa de 20 °C/min hasta alcanzar una temperatura de 110 °C la cual se mantuvo durante 3 minutos. Se utilizó nitrógeno como gas acarreador a un flujo de 20 mL/min.

4.5.3. CONCENTRACIÓN DE ÁCIDOS GRASOS VOLÁTILES

Para realizar este análisis se tomaron muestras de 1 mL de la alimentación y efluente de las celdas al término de cada ciclo de operación. Las muestras se centrifugaron y filtraron con filtros de nitrocelulosa de 0.45 µm y se colocaron en tubos de 1.5 mL con una gota de HCl 2 N para su conservación. Cuando la medición no se realizó al instante, se mantuvieron refrigeradas a 4 °C hasta su lectura. Para ello se utilizó un cromatógrafo de gases (VARIANT 3300) equipado con un detector de ionización de flama y una columna capilar (Agilent 0.530 mm de diámetro interno y una longitud de 15 m), con las siguientes condiciones de operación: para la columna la temperatura inicial fue de 70 °C, incrementándose a una tasa de 10 °C/min hasta alcanzar una temperatura final de 130 °C la cual se mantuvo durante 7.5 min, la temperatura del inyector fue de 190 °C y la temperatura del detector de 210 °C, el gas acarreador utilizado fue N₂ a una presión de 483 kPa.

4.5.4. EXTRACCIÓN DEL ADN

Al final de cada bloque de experimentos de la sección 4.2 (primer etapa experimental), se realizó la extracción de ADN de la biopelícula formada en el ánodo de las CEMs. Para ello se raspó toda la superficie del ánodo con una pipeta estéril para remover la biopelícula y colocarla en un tubo de micro-centrifuga. Una vez separada toda la biopelícula visible, se limpió el electrodo utilizando 100 μL de agua libre de nucleasa (nuclease free-water).

Posteriormente se realizó la extracción de ADN utilizando un equipo Ultra Clean Soil DNA Isolation Kit (MoBio Laboratories, Inc.) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. La calidad y cantidad del ADN extraído se midió por medio de un espectrofotómetro Nanodrop a una absorbancia de 260 y 280 nm. Para realizar los análisis de PCR en tiempo real, se prepararon diluciones del ADN extraído (5 ng/ μL en cada muestra), para tener la misma concentración en todos los análisis y con ello fueran comparables.

4.5.5. ANÁLISIS DE PIROSECUENCIACIÓN GEN

El ADN extraído de cada una de las muestras se envió al Research and Testing Laboratories (Texas, EUA) para realizar la secuenciación utilizando la técnica de *454 Titanium sequencing* (Sun et al., 2011). Se amplificaron las regiones V2-V3 del 16S rDNA utilizando los primers 104F y 530R. Con ello se obtuvo un máximo de 129 182 secuencias para las 14 muestras. Los análisis de secuenciación fueron realizados utilizando un paquete de software QIIME (Quantitative Insights into Microbial Ecology) versión 1.6 (Caporaso et al., 2010 a). Las secuencias que contenían un número menor a 250 bps o no tenían concordancia con los cebadores utilizados, con un promedio de calidad de 25, y los homopolímeros de 6 bps no fueron considerados para el análisis.

Se seleccionaron las Unidades Taxonómicas Operacionales (OTUs, por sus siglas en inglés) a un nivel de similitud del 97% utilizando el comando Uclust (Edgar et al., 2010) y se eligió a la secuencia con mayor abundancia como la representativa de cada grupo. Las secuencias representativas se alinearon utilizando la herramienta de alineación PyNAST de la base de datos Greengenes (DeSantis et al., 2006; Caporaso et al., 2010 b). Se identificaron y removieron las secuencias quiméricas utilizando Chimera Slayer (Haas et al., 2010), posteriormente se le asignó una taxonomía a las secuencias utilizando el alineador RDP a un nivel de confianza del 80% (Wang et al., 2007).

Se construyó una tabla biom-formatted OTU para realizar los análisis posteriores (BIOM, biom-format.org). Además se elaboró el árbol filogenético Newick-formatted utilizando Fast Tree (Price et al., 2010).

Para la diversidad alpha, se obtuvo la riqueza de cada muestra utilizando el índice Chao1 (Chao, 2005), la diversidad utilizando el índice Shannon (Shannon, 1948), el árbol filogenético completo de distancias métricas (Faith, 1992), y la uniformidad utilizando la equidad métrica. Para comparar la diversidad entre las muestras, se realizaron los análisis ponderados y sin ponderación Unifrac

(Lozupone et al., 2006). Los datos de las secuencias obtenidas fueron depositados en los archivos de la NCBI (National Center of Biotechnology Information) con los números de adhesión SAMN02389562 a SAMN02389575 (Anexo 2).

4.5.6. ANÁLISIS DE PCR EN TIEMPO REAL

Los análisis de PCR en tiempo real (qPCR, o quantitative PCR, por sus siglas en inglés) se utilizaron para cuantificar el número de copias de bacterias, archaea, *Geobacteraceae*, dos órdenes de metanógenos hidrogenotróficos: *Methanobacteriales* (MBT) y *Methanomicrobiales* (MMB) y dos familias de metanógenos acetoclásticos: *Methanosarcinaceae* (MSC) y *Methanosaetaceae* (MST) dentro del orden de las *Methanosarcinales*, presentes en el 16S rDNA. Se ha reportado que estos tres órdenes de arqueas son los más representativos en los sistemas bioelectroquímicos (Chae et al., 2010; Lee et al., 2009; Parameswaran et al., 2010).

Las bacterias homo-acetogénicas fueron cuantificadas mediante el gen formil tetrahidrofolato sintetasa (FTHFS, por sus siglas en inglés), un gen conservado mediante la vía de fijación de CO₂.

Todas las pruebas se corrieron por medio de un equipo Eppendorf Realplex 4S real-time thermal-cycler, utilizando un volumen total de reacción de 20 µL. Para los análisis realizados utilizando SYBR Green, cada reacción contenía: 8.6 µL de agua grado PCR, 10 µL de la mezcla SYBR Green (TaKaRa Bio Inc., Japan), 0.2 µL de primers forward y reverse y 1 µL de ADN. Mientras que, para los análisis realizados utilizando TaqMan probe, cada reacción se llevó a cabo utilizando: 6.94 µL de agua grado PCR, 10 µL de TAQ PCR supermix, 0.06 µL de TAQMAN probe, 1 µL de primers forward y reverse y 1 µL de ADN. Los primers, sondas y pruebas utilizados se resumen en la Tabla 4.3. Todos los análisis se corrieron de acuerdo a lo especificado en Parameswaran et al. (2010).

Tabla 4.3. Sondas y primers utilizados durante los diferentes análisis realizados de PCR.

Primer/Sonda	Análisis	Plásmido
SYBR green		
BAC	Bacterias en general	<i>Acetobacterium woodii</i>
FTHFS F; FTHFS R	<i>Homo-acetogénicos</i>	
TAQMAN		
BAC 1055YF; BAC 1392R; BAC 1115 probe	Bacterias en general	<i>Geobacter sulfurreducens</i> (AN, NC002939)
GEO 561F; GEO 825R; Gb1 probe	<i>Geobacter</i> sp.	<i>Geobacter sulfurreducens</i> (AN, NC002939)
ARC 787F; ARC1059R; ARC 915 probe	Archaea en general	<i>Msarcina thermophile</i> (AN, M59140)
MBT 857F; MBT 1196R; MBT 929 probe	<i>Methanobacteriales</i>	<i>Methanobacterium formicium</i> (AN, EU 544028)
MMB 282F; MMB 832R; MMB 749 probe	<i>Methanomicrobiales</i>	<i>Methanomicrobiales KB 1-1</i> (AN, DQ301905)
MST 702F; MST 863R; MST 753 probe	<i>Methanosaetaceae</i>	<i>Methanosaeta KB 1-1</i> (AN, AY 570685)
MSC 380F; MSC 828R; MST 492 probe	<i>Methanosarcinaceae</i>	<i>Msarcina thermophile</i> (AN, M59140)

4.5.7. VOLTAMPEROMETRÍA CÍCLICA

Durante la última fase experimental de este proyecto de investigación (acoplamiento del sistema fermentador-CEM-CCM), se realizaron pruebas de voltamperometría cíclica durante el periodo de inoculación de las celdas utilizando un potencióstato (Biologic, Modelo VSP/Z-01, Science Instruments) para corroborar la presencia de la biopelícula adherida al ánodo.

Las pruebas fueron realizadas durante diferentes etapas del periodo de formación de la biopelícula electroactiva, es decir, al inicio de la formación de la biopelícula, a los 6 días y al final del periodo de formación de la biopelícula (11 días). Para ello se utilizó un electrodo de referencia de Ag/AgCl, NaCl saturado; como electrodo de trabajo se conectó el ánodo de la celda y como contraelectrodo el cátodo. Las pruebas de voltamperometría cíclica se obtuvieron en duplicado a una velocidad de escaneo de 10 mVs^{-1} , en dirección anódica, en un rango de -1 a +1 V.

4.5.8. CÁLCULOS

Para evaluar el funcionamiento de los sistemas empleados se calcularon las siguientes variables:

a) La densidad de corriente del sistema (DC, A/m^2);

$$DC = \frac{I}{A} \quad (4.3)$$

Donde: I= Corriente consumida por las celdas (A)

A= Área del ánodo (50 cm^2 , 0.005 m^2)

b) La remoción de la materia orgánica medida con respecto a la demanda química de oxígeno (% de DQO_{rem});

c) El porcentaje de remoción de ácidos grasos volátiles;

d) La producción de hidrógeno de acuerdo al volumen de la celda (Q_{H_2} , $\text{mL/d/L}_{\text{reactor}}$);

e) La tasa de rendimiento de hidrógeno dependiendo de la materia orgánica removida como DQO (Y_{H_2} , $\text{mmolH}_2/\text{gDQO}_{\text{rem}}$);

$$Y_{\text{H}_2} = \frac{n_{\text{H}_2}}{\Delta \text{DQOV}_{\text{celda}}} \quad (4.4)$$

Donde: n_{H_2} = moles de hidrógeno producidos durante cada ciclo de operación por lote

ΔDQO = Cantidad de materia orgánica removida como DQO en el ciclo de operación de la celda

V_{celda} = Volumen de anolito utilizado (300 mL, 0.30 L)

f) La eficiencia coulombica de la celda (EC, %);

$$EC = \frac{n_{CE}}{n_{th}} \quad (4.5)$$

Donde: n_{CE} = moles de H_2 recuperados calculados con base en la corriente medida

n_{th} = moles teóricos totales de H_2 producidos con base en la materia orgánica removida medida como DQO

Por lo tanto, n_{CE} y n_{th} se determinaron como:

$$n_{CE} = \frac{\int_{t=0}^t I dt}{2F} \quad (4.6)$$

Donde: F = Constante de Faraday (96,485 C/e⁻)

2 = Factor de conversión de moles de e⁻ a moles de H_2

$$n_{th} = \frac{2\Delta DQO}{PM_{O_2}} V_{celda} \quad (4.7)$$

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

g) El porcentaje de hidrógeno total recuperado (r_{H_2} , %);

$$r_{H_2} = \frac{n_{H_2}}{n_{th}} \quad (4.8)$$

CAPÍTULO 5

RESULTADOS

5. RESULTADOS

A continuación se presentan los resultados más relevantes obtenidos durante las diferentes etapas experimentales llevadas a cabo en este proyecto de investigación.

5.1. Primer etapa experimental: Pruebas variando la concentración de ácido acético y ácido propiónico

5.1.1. REMOCIÓN DE MATERIA ORGÁNICA MEDIDA COMO DQO

Durante las pruebas experimentales realizadas utilizando una mezcla de ácido acético y ácido propiónico a diferentes concentraciones de ambos ácidos, se obtuvieron porcentajes de remoción de materia orgánica medida como DQO de un 23 al 60%. Los mejores resultados se presentaron durante el primer bloque experimental (Tabla 5.1). En general, el consumo del sustrato no se vio afectado directamente por las concentraciones de ácido acético y ácido propiónico utilizadas.

Tabla 5.1. Resultados obtenidos durante los dos bloques experimentales para cada una de las variables de respuesta seleccionadas.

		FACTORES DEL TRATAMIENTO		VARIABLE DE RESPUESTA							
Corri-da	Blo-que	Acé-tico (mg/L)	Propió-nico (mg/L)	DQOrem (%)	Acético rem (%)	Propiónico rem (%)	CD (A/m ²)	CE (%)	rH ₂ (%)	Y _{H₂} (mmolH ₂ /gDQO rem)	Producción de H ₂ (mL/d/L _{react})
1	1	1106	195	55.19	60.74	60.32	2.82	45.46	22.73	14.21	172
2	1	1500	250	54.48	76.52	73.15	2.91	39.79	19.89	12.43	265
3	1	1500	250	52.60	72.16	62.08	2.77	36.75	18.38	11.49	168
4	1	1843	325	57.76	81.45	79.84	2.80	28.87	14.43	9.02	256
5	1	1500	250	53.69	76.76	71.63	2.79	40.18	20.09	12.56	170
6	1	1843	195	58.08	80.12	69.07	2.82	29.67	14.85	9.28	172
7	1	1106	325	60.08	76.41	78.46	2.81	38.75	19.37	12.11	171
8	2	1500	250	31.37	90.88	91.41	1.74	77.95	38.98	24.36	159
9	2	950	250	31.06	72.54	89.94	0.29	19.78	9.89	6.18	27
10	2	2000	250	49.10	90.30	93.28	0.72	17.49	8.74	5.46	66
11	2	1500	250	22.69	90.31	88.21	1.76	107.58	53.79	33.62	161
12	2	1500	360	48.78	85.63	92.76	0.84	19.93	9.96	6.23	76
13	2	1500	160	38.06	87.24	80.32	1.13	58.88	29.44	18.40	104
14	2	1500	250	33.46	91.74	91.05	2.06	78.84	39.42	24.64	187

De acuerdo al análisis estadístico, basado en un modelo cuadrático de superficies de respuesta, solo resultaron significativos el término cuadrático de la concentración de ácido propiónico y el efecto de los dos bloques experimentales realizados, con valores de p_{value} iguales a 0.0296 y 0.0008, respectivamente. Esto también se puede corroborar en el Diagrama de Pareto de los datos, en donde el único efecto significativo es el producido por el término cuadrático del ácido propiónico (Figura 5.1). La ecuación que describe a este parámetro en función de la concentración de ácido acético y propiónico se representa como sigue:

$$DQO_{rem} = 122.54 - 0.053*Acético - 0.409*Propiónico + 2.70 \times 10^{-5} * Acético^2 - 6.93 \times 10^{-5} * Acético * Propiónico + 1.05 \times 10^{-3} * Propiónico^2 \quad (5.1)$$

El coeficiente de determinación (R^2) igual a 0.898 y un valor de p_{value} para la falta de ajuste mayor a 0.05 (0.1851 en este caso) sugieren un buen ajuste de la ecuación 5.1 para describir el consumo de materia orgánica medida como DQO, como una función de las concentraciones de ácido acético y ácido propiónico a un nivel de confianza del 95%. Por lo tanto, los mejores resultados en cuanto a remoción de materia orgánica medida como DQO se presentaron a las más altas concentraciones de ambos ácidos (Figura 5.2), con un valor óptimo estimado del 63.86% a una concentración de ácido acético de 2000 mg/L y 360 mg/L de ácido propiónico. Se podría esperar que al aumentar el tiempo de retención hidráulico en las CEMs, se obtengan mejores remociones de materia orgánica.

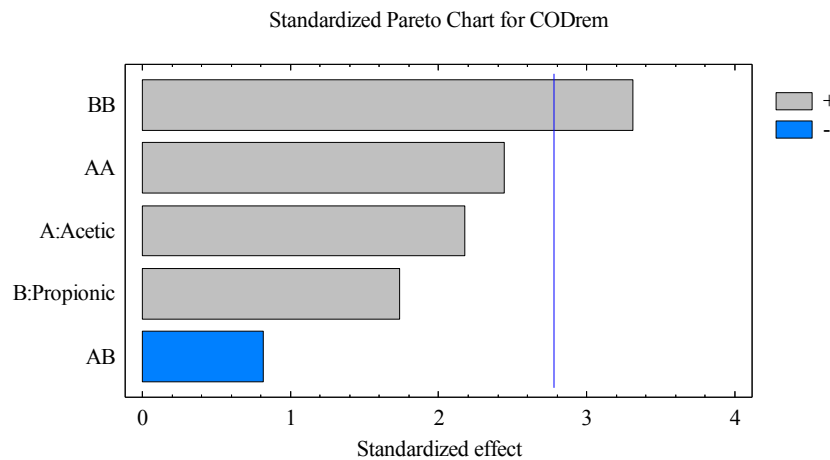


Figura 5.1. Diagrama de Pareto para el porcentaje de materia orgánica removida como DQO.

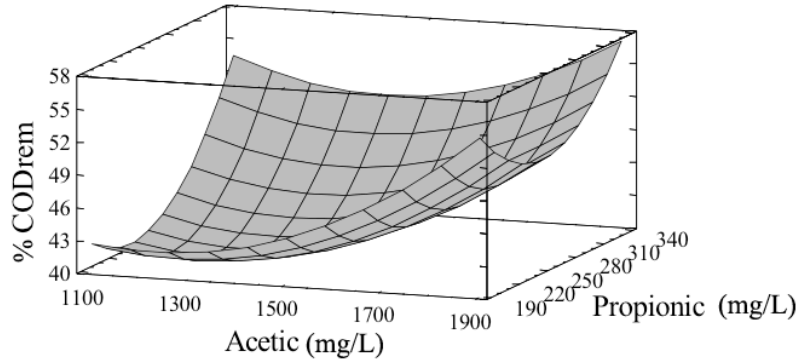


Figura 5.2. Gráfico de superficie de respuesta para el porcentaje de materia orgánica removida como DQO.

5.1.2. CONSUMO DE ÁCIDO ACÉTICO Y ÁCIDO PROPIÓNICO EN LAS MEZCLAS

Con respecto a los porcentajes de ácido acético y ácido propiónico removidos por el sistema, estos variaron de un 61% a 92% para el ácido acético y de un 60 al 90% para el ácido propiónico (Tabla 5.1). En este caso, el análisis estadístico sugirió el uso de un modelo lineal para representar el consumo de ácido acético y un modelo cuadrático en el caso del ácido propiónico (Ecs. 5.2 y 5.3), con una R^2 de 0.523 y 0.933, respectivamente.

$$\text{Acético rem} = 46.53 + 1.66 \times 10^{-2} * \text{Acético} + 2.96 \times 10^{-2} * \text{Propiónico} \tag{5.2}$$

$$\text{Propiónico rem} = 27.80 - 1.05 \times 10^{-2} * \text{Acético} + 3.52 \times 10^{-1} * \text{Propiónico} + 1.18 \times 10^{-5} * \text{Acético}^2 - 7.66 \times 10^{-5} * \text{Acético} * \text{Propiónico} - 2.93 \times 10^{-4} * \text{Propiónico}^2 \tag{5.3}$$

De acuerdo al análisis estadístico para ambos parámetros, se observó que únicamente la concentración de ácido propiónico y el efecto de los bloques experimentales resultaron significativos en el consumo de los ácidos grasos volátiles con un p_{value} de 0.02 y 0.001, respectivamente. En la Figura 5.3 (a) se observa que para el caso del ácido acético removido ninguno de los parámetros resulta significativo, sin embargo, para el ácido propiónico removido el único efecto significativo es el generado al variar las concentraciones de ácido propiónico en las mezclas (Figura 5.3 (b)). Además, se encontró que el valor óptimo de remoción de ácido acético que se puede obtener al utilizar estos sistemas es de 90.38% utilizando una concentración de 2000 mg/L de ácido acético y 360 mg/L de ácido propiónico; mientras que, el valor óptimo de remoción de ácido propiónico se presenta al utilizar una concentración de ácido acético de 950 mg/L y 360 mg/L de ácido propiónico con un valor de 90.94% (Figuras 5.4 (a) y (b)).

Los resultados obtenidos durante este estudio fueron similares a los reportados en la literatura cuando se utiliza ácido acético como sustrato (*Liu et al., 2005; Rabaey et al., 2005 b y c*). Sin embargo, se observaron mejores remociones de ácido propiónico, en la mezcla, en comparación con los obtenidos en otros trabajos experimentales reportados en la literatura en donde se probó únicamente al ácido propiónico como sustrato (*Sun et al., 2010*). El consumo de ácido propiónico puede verse restringido dependiendo del tipo de microorganismos que se encuentren presentes en la biopelícula adherida al ánodo de las CEMs y las reacciones metabólicas que se lleven a cabo para el consumo de este ácido, lo cual sugiere que la mezcla de ácidos propicia el desarrollo de microorganismos capaces de degradar más fácilmente al ácido propiónico.

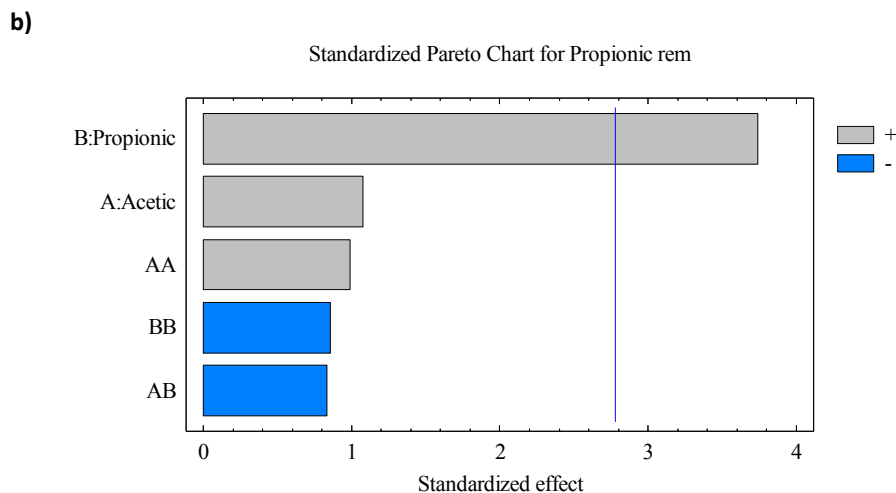
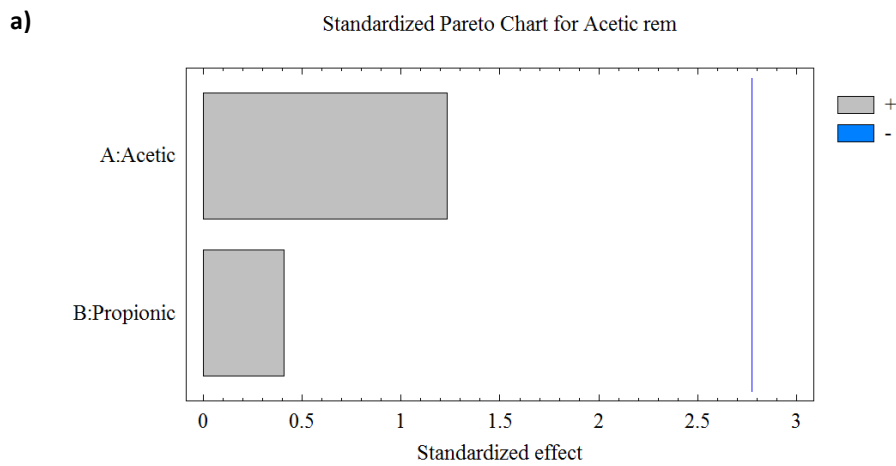
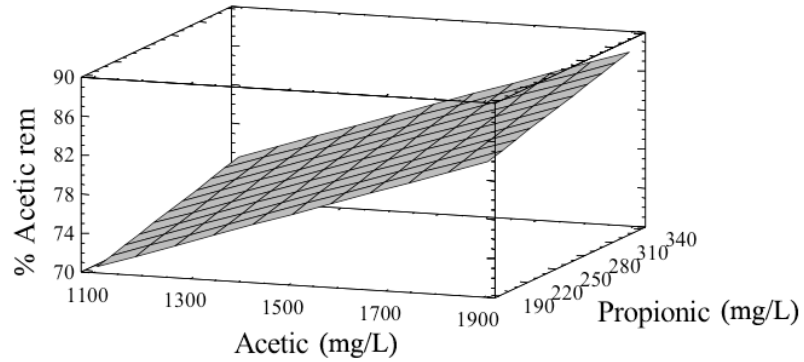


Figura 5.3. Diagramas de Pareto para: (a) el porcentaje de remoción de ácido acético y (b) el porcentaje de remoción de ácido propiónico.

a)



b)

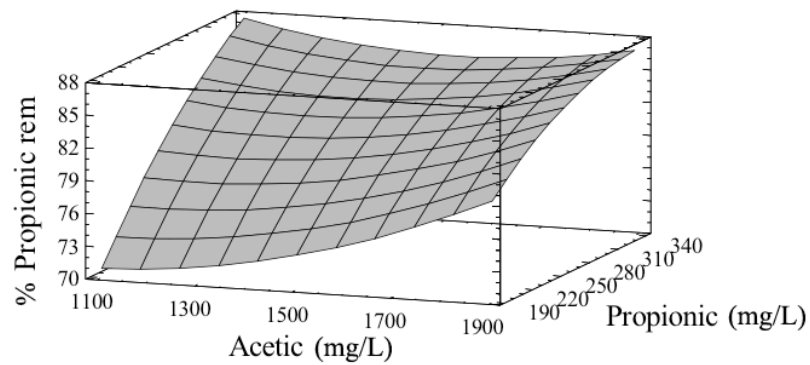


Figura 5.4. Gráficos de superficie de respuesta para: (a) el porcentaje de remoción de ácido acético y (b) el porcentaje de remoción de ácido propiónico.

5.1.3. DENSIDAD DE CORRIENTE, EFICIENCIA COULÓMBICA Y PORCENTAJE TOTAL DE HIDRÓGENO RECUPERADO

Para conocer el funcionamiento y eficiencia de las CEMs durante el tratamiento, se calcularon los valores de la densidad de corriente (DC, A/m²), la eficiencia coulombica (CE, %) y el porcentaje total de hidrógeno recuperado en el cátodo de las celdas (r_{H_2} , %).

Las densidades de corriente variaron de 0.29 a 2.91 A/m², con un valor óptimo de 2.35 A/m² a una concentración de 1507.45 mg/L de ácido acético y 250.67 mg/L de ácido propiónico (Figura 5.5).

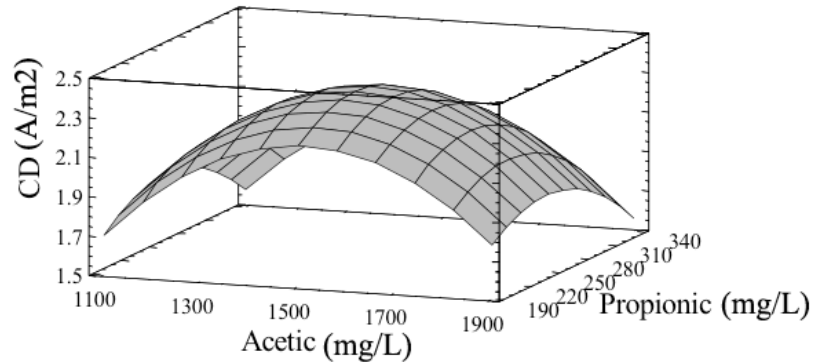


Figura 5.5. Gráfico de superficie de respuesta correspondiente a la densidad de corriente.

Las densidades de corriente que se han obtenido en estudios previos reportados en la literatura, utilizando diferentes fuentes de sustrato en CEMs de dos cámaras, están en el rango de 0.2 a 4.7 A/m² (Chae et al., 2008; Ditzig et al., 2007; Rozendal et al., 2007; Selembo et al., 2009), lo cual demuestra el buen funcionamiento de las CEMs utilizadas en esta investigación, ya que un valor alto de densidad de corriente es indicativo de que hay un mayor consumo de corriente en el sistema y por ende una mayor producción de hidrógeno (como se obtuvo en la CEM A1500/P250C1, en donde la DC fue de 2.91 A/m² y la tasa de producción de H₂ de 265 mL/d/L_{reactr}, esta CEM fue la que presentó la máxima producción de H₂). El modelo que representa a esta variable de respuesta se ajusta a un modelo cuadrático con un valor de R² igual a 0.903, lo cual significa que el modelo representa adecuadamente los datos (Ec. 5.4). En este caso, tres efectos presentaron p_{valúes} menores a 0.05, el término cuadrático tanto de la concentración de ácido acético como de la concentración de ácido propiónico y el efecto de los bloques experimentales, lo cual se ve reflejado en el correspondiente Diagrama de Pareto de los resultados obtenidos (Figura 5.6).

$$CD = -7.07 + 9.17 \times 10^{-3} \cdot \text{Acético} + 2.00 \times 10^{-2} \cdot \text{Propiónico} - 2.98 \times 10^{-6} \cdot \text{Acético}^2 - 7.79 \times 10^{-7} \cdot \text{Acético} \cdot \text{Propiónico} - 3.76 \times 10^{-5} \cdot \text{Propiónico}^2 \quad (5.4)$$

Con respecto a los porcentajes de eficiencia coulombica obtenidos para el cátodo de las celdas durante las pruebas experimentales (este cálculo se realiza únicamente en el cátodo ya que es en ésta cámara en donde se produce el hidrógeno), estos variaron del 20 al 107% (Figura 5.7 (a)), indicando que el sustrato fue utilizado eficientemente para la generación de corriente; sin embargo, no se observó una relación directa de este parámetro con relación a las concentraciones de ácidos utilizadas, siendo significativo únicamente el efecto de los bloques experimentales en el modelo (p_{value}=0.046) tal y como se observa en el correspondiente Diagrama de Pareto (Figura 5.7

(b)). Esto indica que las variaciones se deben principalmente al tipo de microorganismos que se adhieren al ánodo de las CEMs y no a las concentraciones de ácidos grasos volátiles que se adicionen como sustrato.

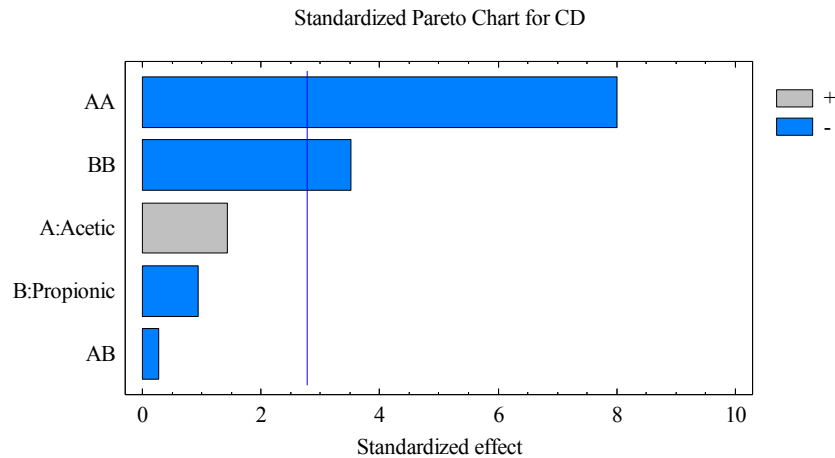


Figura 5.6. Diagrama de Pareto correspondiente a la densidad de corriente.

Nuevamente el modelo se ajustó a una ecuación cuadrática (Ec. 5.5) con un valor de R^2 de 0.621.

$$CE = -379.85 + 0.45 \cdot \text{Acético} + 1.05 \cdot \text{Propiónico} - 1.57 \times 10^{-4} \cdot \text{Acético}^2 + 2.35 \times 10^{-5} \cdot \text{Acético} \cdot \text{Propiónico} - 2.30 \times 10^{-3} \cdot \text{Propiónico}^2 \quad (5.5)$$

El hecho de que en una de las celdas se obtuviera un valor por arriba del 100% en eficiencia coulombica, evidenció la recirculación de electrones durante su operación. Este fenómeno puede ocurrir cuando el hidrógeno que se produce en el cátodo es utilizado en el ánodo. Muchas bacterias presentes en cultivos anaerobios pueden utilizar al hidrógeno como un donador de electrones para reducir los ácidos grasos volátiles (Steinbusch et al., 2008). Además, algunos exoelectrógenos como por ejemplo *Shewanella oneidensis* MR-1 (De Windt et al., 2003) y *Geobacter sulfurreducens* (Coppi et al., 2004) pueden usar al hidrógeno como donador de electrones.

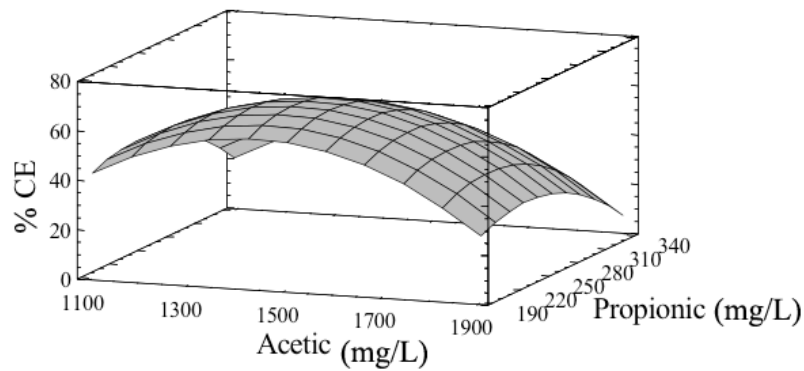
Un comportamiento similar al de la eficiencia coulombica, se observó con el porcentaje total de hidrógeno recuperado en el cátodo de las CEMs, para el cual los porcentajes variaron de un 9.9% a un 54%, con un valor óptimo de 33% cuando se adiciona una concentración de ácido acético a las CEMs de 1440 mg/L y 235 mg/L de ácido propiónico (Figura 5.8 (a)). La ecuación 5.6 representa el comportamiento de este parámetro con un valor de R^2 de 0.621. El porcentaje total de hidrógeno recuperado en el cátodo representa la relación entre los moles de hidrógeno producidos con respecto a los moles de hidrógeno teóricos esperados con el consumo del sustrato; por lo tanto, relacionando el porcentaje de materia orgánica removida como DQO en las CEMs con el

porcentaje total de hidrógeno recuperado, se esperaría que al utilizar tiempos de retención hidráulicos mayores, se obtengan mejores remociones de materia orgánica y como consecuencia una mayor recuperación de hidrógeno.

$$r_{H_2} = -189.98 + 0.22 \cdot \text{Acético} + 0.53 \cdot \text{Propiónico} - 7.84 \times 10^{-5} \cdot \text{Acético}^2 + 1.16 \times 10^{-5} \cdot \text{Acético} \cdot \text{Propiónico} - 1.15 \times 10^{-3} \cdot \text{Propiónico}^2 \quad (5.6)$$

Para este caso solo resultaron significativos el término cuadrático de la concentración de ácido acético y el efecto de los bloques experimentales tal y como se aprecia en la Figura 5.8 (b).

a)



b)

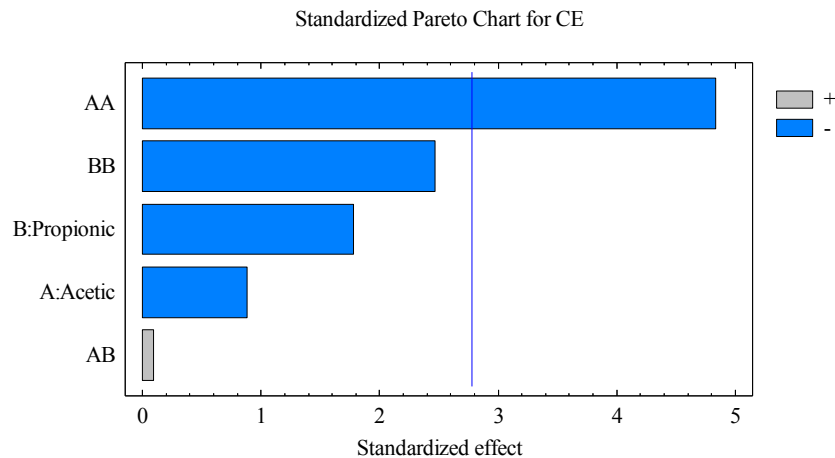
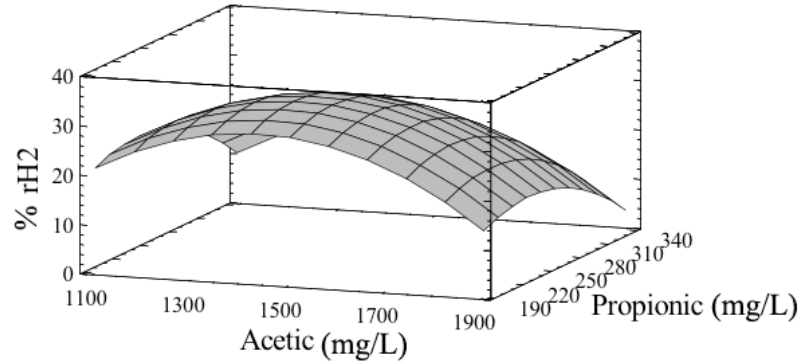


Figura 5.7. Gráficos correspondientes a la eficiencia coulombica: (a) Superficie de Respuesta y (b) Diagrama de Pareto.

a)



b)

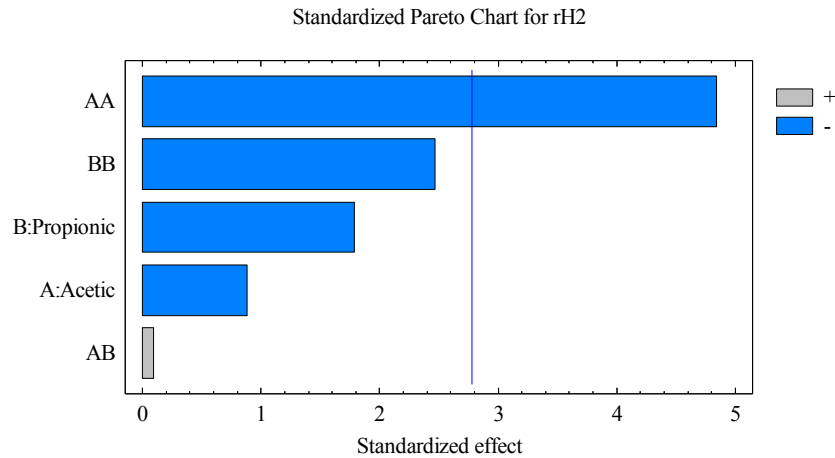


Figura 5.8. Gráficos correspondientes al porcentaje total de hidrógeno recuperado en el cátodo de las CEMs: (a) Superficie de Respuesta y (b) Diagrama de Pareto.

5.1.4. TASAS DE PRODUCCIÓN Y RENDIMIENTO DE HIDRÓGENO

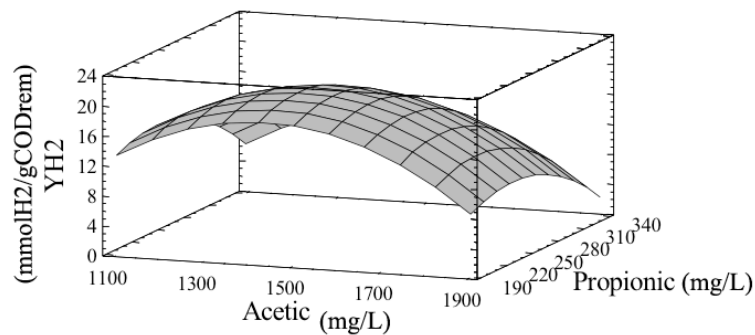
Finalmente, se realizó el análisis estadístico para las tasas de producción y rendimiento de hidrógeno, encontrándose que para ambos casos el modelo de superficies de respuesta está representado por una ecuación cuadrática (Ecs. 5.7 y 5.8), con valores de R^2 iguales a 0.62 y 0.73, respectivamente. La concentración de hidrógeno en el biogás producido varló en un rango del 80 al 98% (pureza del biogás). El porcentaje restante fue únicamente dióxido de carbono. No se detectó metano en ninguno de los análisis.

$$Y_{H_2} = -118.73 + 0.14 \cdot \text{Acético} + 0.33 \cdot \text{Propiónico} - 4.90 \times 10^{-5} \cdot \text{Acético}^2 + 7.30 \times 10^{-6} \cdot \text{Acético} \cdot \text{Propiónico} - 7.19 \times 10^{-4} \cdot \text{Propiónico}^2 \quad (5.7)$$

$$\text{Tasa de Producción de } H_2 = -462.98 + 0.66 \cdot \text{Acético} + 0.88 \cdot \text{Propiónico} - 2.82 \times 10^{-4} \cdot \text{Acético}^2 + 8.48 \times 10^{-4} \cdot \text{Acético} \cdot \text{Propiónico} - 3.95 \times 10^{-3} \cdot \text{Propiónico}^2 \quad (5.8)$$

El rendimiento varió en un rango de 5.46 a 33.6 mmolH₂/gDQO_{rem}, con un valor óptimo de 20.40 mmolH₂/gDQO_{rem} a una concentración de ácido acético de 1440.4 mg/L y 235.6 mg/L de ácido propiónico (Figura 5.9 (a)). Mientras que, las tasas de producción de hidrógeno fueron de 27 mL/d/L_{reactor} a 265 mL/d/L_{reactor}, encontrándose el valor óptimo cuando se utiliza una mezcla de 1597.82 mg/L de ácido acético y 282.23 mg/L de ácido propiónico, en el cual se puede esperar una máxima producción de hidrógeno de 190.36 mL/d/L_{react} (Figura 5.9 (b)).

a)



b)

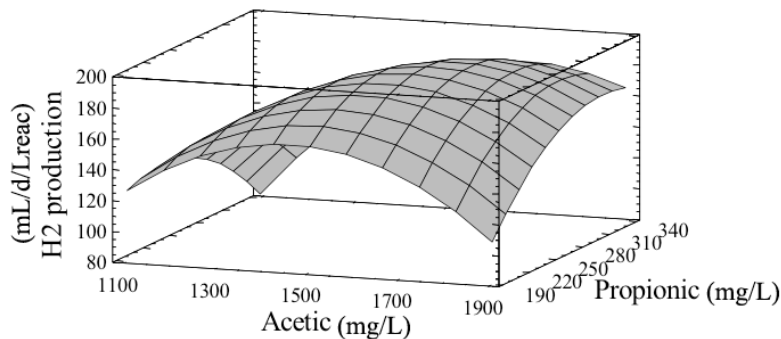


Figura 5.9. Gráficos de superficie de respuesta para: (a) la tasa de rendimiento de hidrógeno y (b) la tasa de producción de hidrógeno.

Estos resultados son mejores a los obtenidos por Sun et al. (2008 y 2010) utilizando una configuración de la CEM similar a la empleada en esta investigación, pero con la diferencia de que tanto el ácido acético como el ácido propiónico fueron adicionados como sustratos de manera individual. Estos autores comprobaron que el ácido propiónico puede ser convertido a hidrógeno a una tasa de producción similar a la del ácido acético pero con una tasa de rendimiento mayor, debido a que durante las pruebas realizadas utilizando la misma configuración de la celda (celda de dos cámaras) primero con acético y posteriormente con propiónico, sus tasas de producción fueron de 10.9 mL/L_{react}/d (acético) y 11.9 mL/L_{react}/d (propiónico), mientras que las tasas de rendimiento resultaron en 2.9 molH₂/mol-acetato y 4.8 molH₂/mol-propiónico. Esto podría explicar los altos porcentajes de remoción de ácido propiónico obtenidos durante las pruebas realizadas en esta etapa experimental. En el caso de la tasa de rendimiento de hidrógeno sólo resultaron significativos el efecto del término cuadrático de la concentración de ácido acético en las mezclas y el efecto de los bloques experimentales como se aprecia en el Diagrama de Pareto de esta variable de respuesta (Figura 5.10 (a)). Mientras que para la tasa de producción de hidrógeno únicamente resulta significativo el efecto de los bloques experimentales (Figura 5.10 (b)).

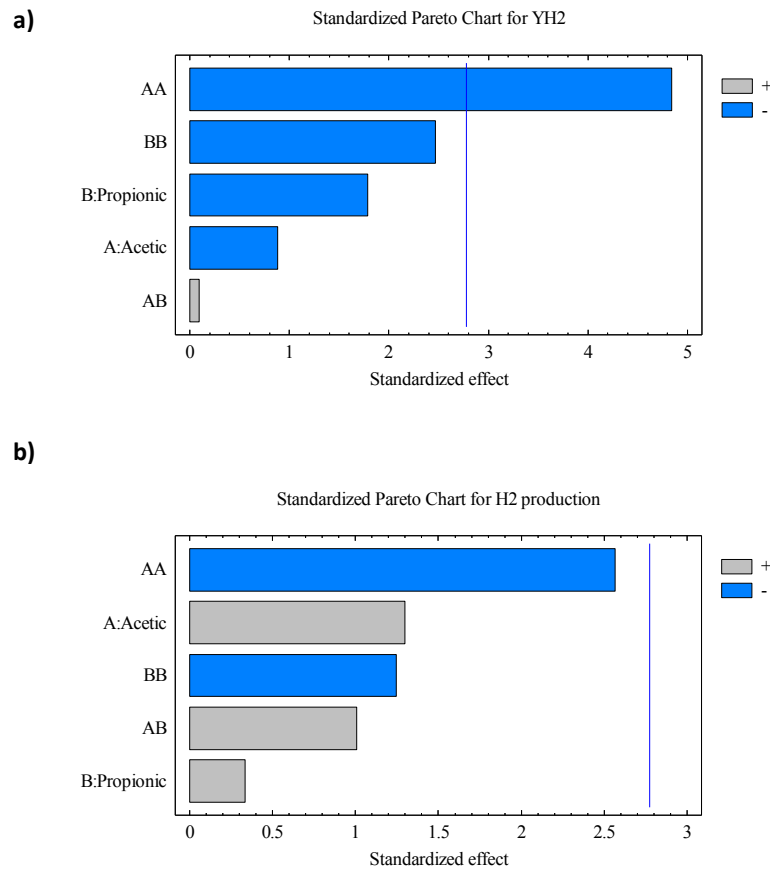


Figura 5.10. Diagramas de Pareto para: (a) la tasa de rendimiento de hidrógeno y (b) la tasa de producción de hidrógeno.

5.1.5. ANÁLISIS DE OPTIMIZACIÓN DE RESPUESTAS MÚLTIPLES

El análisis de optimización de respuestas múltiples se realizó con el objeto de determinar las condiciones globales de operación durante el tratamiento de las CEMs, considerando a las tasas de rendimiento y producción de hidrógeno como variables significativas del proceso. De acuerdo a los resultados de optimización obtenidos, se observó que el valor más alto de deseabilidad, d_i , fue de 0.59, el cual se alcanza con una mezcla de 1477.61 mg/L de ácido acético y 247.19 mg/L de ácido propiónico (Figura 5.11). Este tratamiento genera una tasa de rendimiento de hidrógeno igual a 20.24 mmol de H_2 /gDQO_{rem} y una tasa de producción de hidrógeno de 185 mL/d/L_{reactor}. Estos resultados fueron muy similares a los encontrados cuando se realizó el análisis de optimización de ambas variables de manera individual.

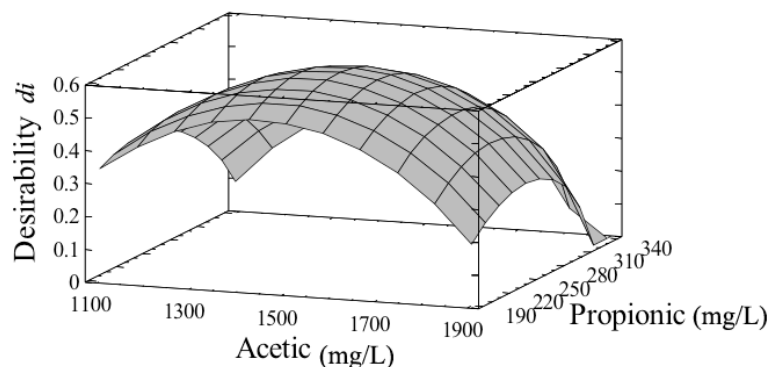


Figura 5.11. Gráfico de superficie de respuesta para la deseabilidad global d_i considerando a las tasas de rendimiento y producción de hidrógeno como las variables a ser optimizadas.

5.1.6. ANÁLISIS DE ECOLOGÍA MICROBIANA

Realizando el análisis de pirosecuenciación se obtuvo un número máximo de Unidades Taxonómicas Operacionales (OTUs, por sus siglas en inglés) de 533 para la muestra A1500/P250C1 y un mínimo de 82 OTUs para A1500/P250C5. El número total de OTUs calculado por medio del estimador Chao 1 para las muestras con los mejores rendimientos de hidrógeno fue de 469.16 ± 42.13 (A1843/P325), 968.37 ± 50.71 (A1500/P250C1), 558.59 ± 64.86 (A1500/P250C5) y 632.92 ± 33.44 (A1500/P250C6); mientras que, para las muestras con los más bajos rendimientos de hidrógeno fueron de 551.38 ± 64.26 (A2000/P250) y 374.76 ± 58.05 (A950/250).

Además, se calculó el índice de diversidad Shannon para cada una de las muestras tomadas de la biopelícula adherida en el ánodo de las CEMs. La muestra que presentó la mayor diversidad fue A1500/P250C1 (Shannon= 7.43 ± 0.02 y Simpson= 0.98), siendo esta CEM la que generó las mejores producciones y rendimientos de hidrógeno. La muestra A950/P250, con las más bajas

producciones y rendimientos de H_2 , presentó el segundo valor más bajo de diversidad (Shannon= 2.10 ± 0.07 y Simpson=0.39). Lo cual demuestra que diferentes consorcios microbianos pueden desarrollarse dependiendo de las concentraciones de ácido acético y ácido propiónico que se adicionen como sustrato a las CEMs.

Tal y como se observa en la Figura 5.12, a un nivel de *filos*, el primer bloque de experimentos presentó una distribución uniforme de *Proteobacterias*, *Firmicutes* y *Bacteroidetes*, con excepción de A1843/P325. *Synergistetes* y *Tenericutes* fueron menos abundantes en comparación con los tres *filos* anteriores. Para el segundo bloque de experimentos, la mayoría de la población perteneció a las *Proteobacteria*, seguido de *Firmicutes* y *Bacteroidetes*. Además, se encontraron en un menor porcentaje las especies pertenecientes a los *filos* *Synergistetes*, *Tenericutes* y *Spirochaetes*. Las *Synergistetes* fueron más abundantes en el primer bloque de experimentos en comparación con el segundo bloque; sin embargo, A1500/P250C4 y A1500/P250C6 presentaron niveles comparables al primer bloque de experimentos.

En todos los reactores, *Clostridiales* y *Bacteroidales* fueron los principales órdenes encontrados de *Firmicutes* y *Bacteroidetes*, respectivamente. En el caso de las *Proteobacteria*, los *Rhodocyclales* y *Campylobacteriales*, fueron los órdenes dominantes en el segundo bloque de experimentos y en la muestra A1843/P325 del primer bloque de experimentos; mientras que, las *Desulfobacterales* y *Desulfovibrionales* fueron los órdenes más representativos de las *Proteobacteria* para el primer bloque de experimentos (Figura 5.13).

Durante las dos etapas experimentales la fuente de inóculo fue la misma (agua residual alimentada a una planta de tratamiento), sin embargo, debido a que ambas etapas experimentales se corrieron en diferentes meses del año (Septiembre y Diciembre) y debido a que el agua tratada en la planta fuente del inóculo es de tipo industrial, algunas condiciones como la temperatura y composición pueden variar mes con mes, resultando en el enriquecimiento de los órdenes *Rhodocyclales* y *Campylobacteriales*.

Las *Proteobacterias* son especies metabólicamente diversas y pueden dominar el agua residual de las plantas de tratamiento (Yang *et al.*, 2011), por ello es muy probable que el inóculo utilizado para correr ambas etapas experimentales, tuviera *Proteobacterias* en diferentes composiciones y abundancias. En estudios previos de aguas residuales y CCM se han identificado los órdenes *Rhodocyclales* y *Campylobacteriales*. De manera particular, las *Rhodocyclales* aisladas de lodo activado, mostraron versatilidad metabólica al oxidar diferentes ácidos grasos volátiles como propiónico y butírico e hidrocarburos aromáticos (Hesselsoe *et al.*, 2009), pueden reducir diferentes aceptores de electrones incluyendo al nitrato (Ontiveros-Valencia *et al.*, 2013) y se ha comprobado su predominancia en la cámara anódica de CCMs alimentadas con acetato (Borole *et al.*, 2011). Con respecto a las *Campylobacteriales*, éstas han sido identificadas también en ambientes enriquecidos con acetato (Handley *et al.*, 2012) y han sido detectadas previamente en estudios realizados en reactores alimentados con diferentes tipos de aceptores de electrones, bajo condiciones de ciclación de azufre (Zhao *et al.*, 2013).

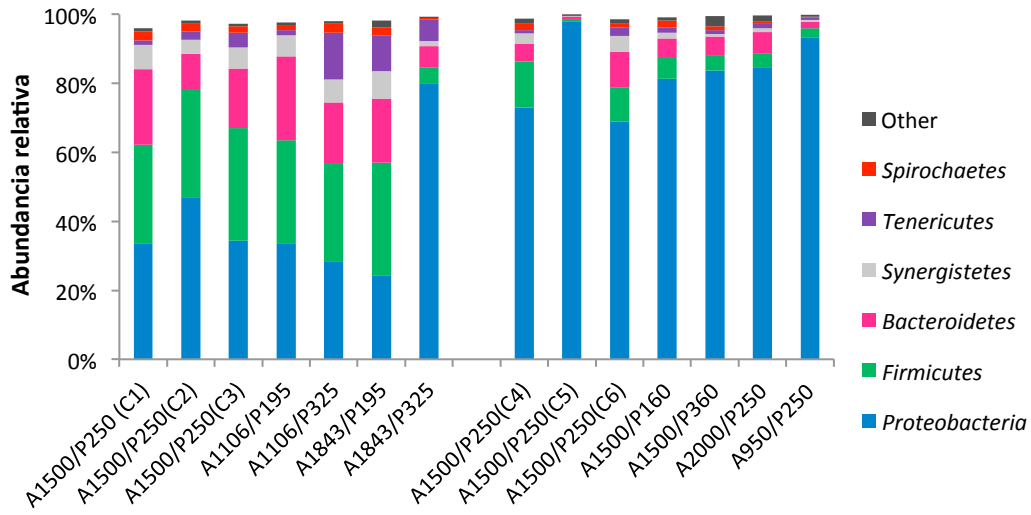


Figura 5.12. Distribución filogenética de las muestras de biopelícula anódica para el primer y segundo bloques experimentales. A un nivel de *filos*, hubo una disminución en la abundancia de *Firmicutes*, *Bacteroidetes* y *Tenericutes* en el segundo bloque de experimentos en comparación con el primer bloque. Las *Proteobacteria* dominaron las comunidades presentes en el segundo bloque de experimentos.

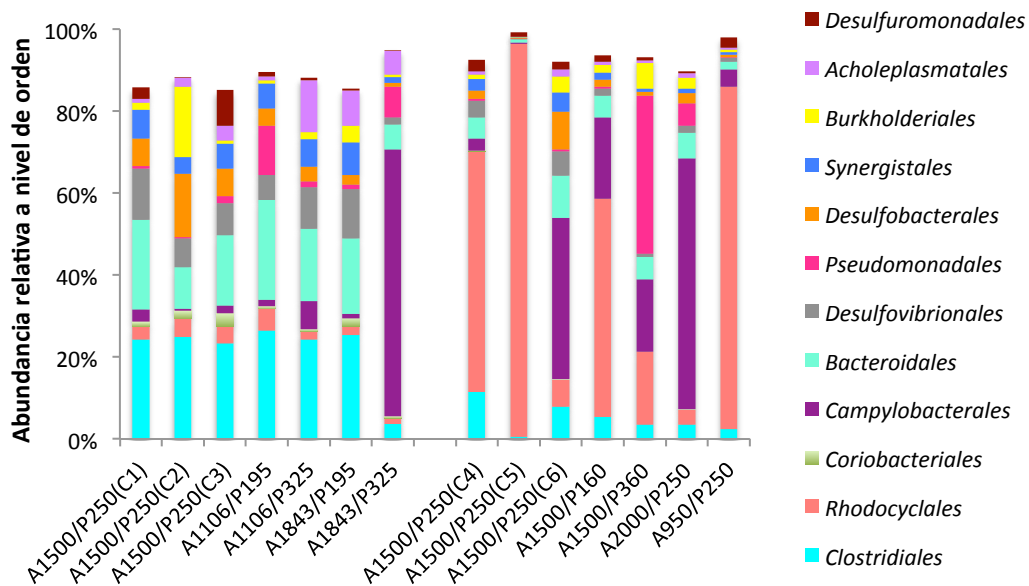


Figura 5.13. Distribución de los 11 órdenes más abundantes en las muestras de biopelícula adherida a los ánodos de las CEMs para el primer y segundo bloques experimentales. A nivel de orden, las muestras del primer bloque de experimentos fueron enriquecidas con *Clostridiales* en el caso de las *Firmicutes* y *Campylobacterales* y *Rhodocyclales* en el caso de las *Proteobacteria*.

En general, durante el primer bloque de experimentos se presentaron las más altas producciones de hidrógeno, en particular en los reactores A1500/P250C1 y A1843/P325. Estos resultados sugieren que aún cuando es importante contar con una comunidad microbiana uniforme para lograr mayores producciones de hidrógeno, la presencia y abundancia de ciertas especies también juegan un papel importante.

En estudios previos se ha reportado la generación de corriente y producción de hidrógeno cuando se encontraban presentes especies pertenecientes a los filos *Proteobacteria*, *Firmicutes* y *Actinobacteria* en la biopelícula adherida al ánodo de las CCMs o CEMs. Además, se sabe que las *Proteobacteria* y *Firmicutes* son bacterias fermentadoras y pueden formar relaciones simbióticas con otras bacterias capaces de fermentar los ácidos grasos volátiles, como por ejemplo, acetato, propionato y butirato (Freguia et al., 2010; Kiely et al., 2011). Las *Actinobacteria* y *Bacteroidetes* también han sido identificadas en la biopelícula adherida a los ánodos de las CEMs, pero en una fracción pequeña con respecto al número total de bacterias, lo cual concuerda con los resultados obtenidos durante este estudio (Torres et al., 2009; Xing et al., 2009). Las *Synergistetes* son conocidas como una especie productora de hidrógeno (Riviere et al., 2009) y pueden estar asociadas a los altos rendimientos de hidrógeno obtenidos durante el primer bloque de experimentos y las dos CEMs mencionadas del segundo bloque.

En la Figura 5.14 (a) se muestra la distribución por género de las *Proteobacteria*; mientras que, en la Figura 5.14 (b) se encuentra representada la distribución para las *Firmicutes*, *Bacteroidetes* y *Synergistetes*.

Las especies dominantes en el segundo bloque de experimentos fueron *Arcobacter* y *Azovibrio*, observándose que para el caso de las muestras A1843/P325 y A2000/P250, *Arcobacter* fue el género dominante en la biopelícula adherida al ánodo de las CEMs. Estos dos reactores tuvieron las más altas cargas de electrones de entre todos los reactores. Se sabe que las bacterias del género *Arcobacter* son fermentativas y acidogénicas y pueden estar involucradas en la degradación de sustratos orgánicos y aminoácidos para la producción de sustratos que pueden ser metabolizados posteriormente por las bacterias anodofilicas para la generación de electricidad y/o producción de hidrógeno (Holt et al., 1994; Matthies et al., 2000; Tully et al., 1994).

El segundo bloque de experimentos estuvo enriquecido principalmente por el género *Azovibrio* independientemente de las producciones y rendimientos de hidrógeno. Esta especie ha sido identificada como posible bacteria electro-químicamente activa en estudios previos utilizando CCMs o CEMs (Freguia et al. 2010; Li et al., 2011; Mehanna et al. 2010); sin embargo, en este estudio fue el género más abundante tanto en las muestras con los más altos rendimientos como en los más bajos (A1500/P250C4, A1500/P250C5 y A950/P250).

Acinetobacter fue más abundante en la muestra A1106/P195 del primer bloque de experimentos y en A1500/P360 y A2000/P250 del segundo bloque en comparación con los otros reactores. *Desulfovibrio*, *Desulfobulbus* y *Desulfomicrobium* fueron más abundantes en el primer bloque de

experimentos comparado con el segundo bloque; sin embargo, no disminuyeron completamente en el segundo bloque de experimentos.

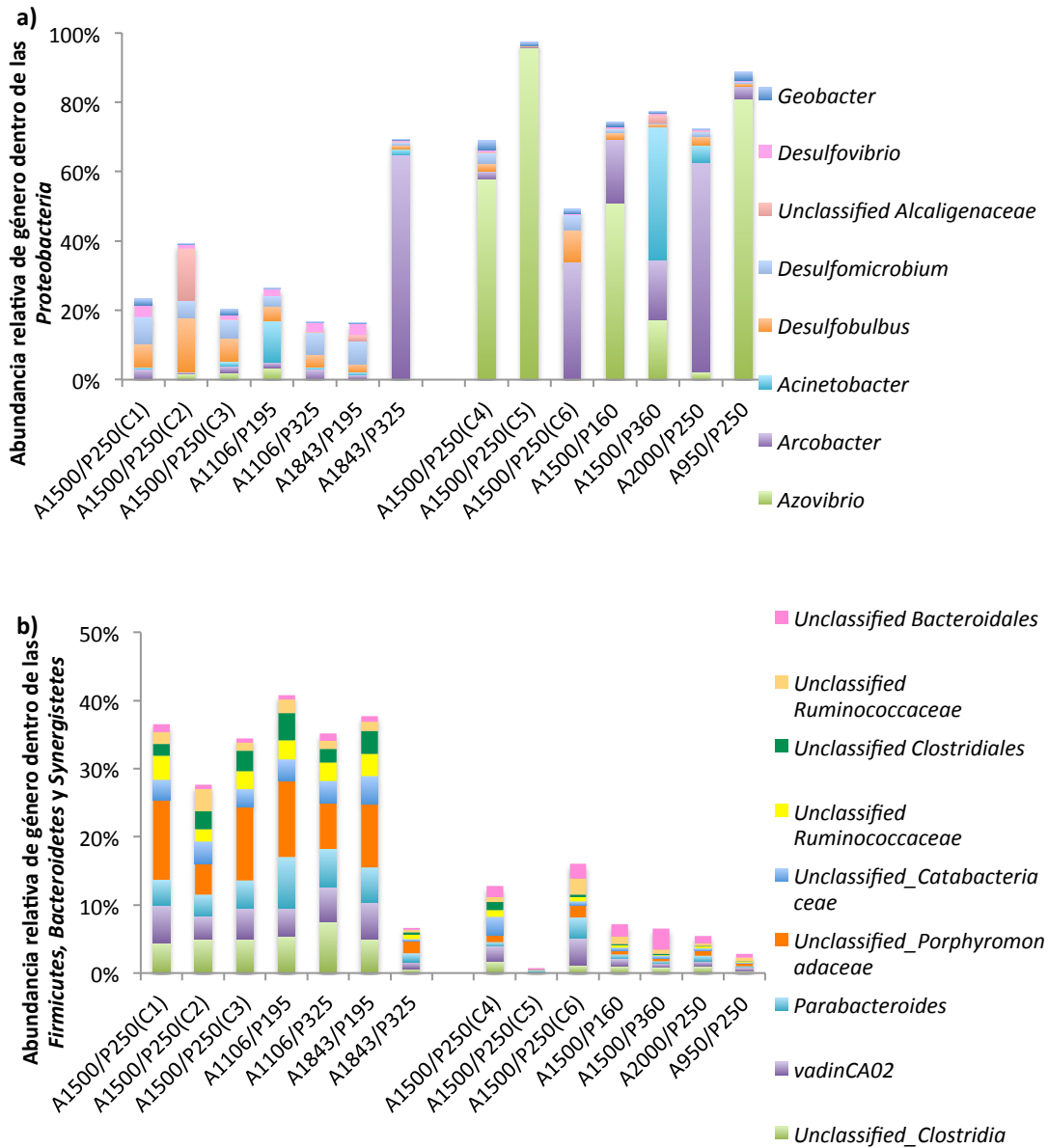


Figura 5.14. Distribución correspondiente a los 10 géneros más abundantes presentes en las muestras de la biopelícula anódica para el primer y segundo bloques experimentales. *Azovibrio* o *Arcobacter* fueron los géneros más abundantes en el segundo bloque de experimentos.

Geobacter no fue uno de los géneros más abundantes en las CEMs (0.01-2.00%) pero estuvo presente en todas las celdas. Estudios previos han demostrado la predominancia de esta especie en la biopelícula de los ánodos (*Call et al. 2009; Jung y Regan 2007; Parameswaran et al. 2009; Torres et al 2009*); sin embargo, en este caso se encontró que algunos otros géneros como por

ejemplo, *Arcobacter*, *Desulfomicrobium*, *Desulfobulbus*, *Pseudomonas*, *Macromonas* y *Azovibrio*, fueron las más representativas y pueden estar asociadas con la producción de hidrógeno en las CEMs.

La especie *Desulfobulbus* puede oxidar el propionato a acetato como producto final y además se encuentra asociada con la producción de H₂ (Holt *et al.*, 1994). Por otra parte, no se ha demostrado que la especie *Desulfomicrobium* pueda crecer en presencia de acetato o propionato (Thevenieau *et al.*, 2007).

No se encontró una clasificación de la mayoría de los géneros pertenecientes a *Firmicutes*, *Bacteroidetes* y *Synergistetes* (Figura 5.14 (b)), con excepción de los géneros *Parabacteroides* y *vadin CA02*. Siendo *Parabacteroides* uno de los filos a nivel de género más abundantes en el primer bloque de experimentos.

Finalmente, para comparar la β diversidad (comparación de la diversidad entre muestras), se realizaron los análisis Unifrac. En la Figura 5.15, se observa claramente como las muestras se separan de manera natural en dos grupos, cada uno de ellos correspondientes a los dos diferentes periodos de inoculación. Aquí se puede apreciar claramente como las muestras pueden agruparse dependiendo de la fecha de inoculación, las muestras en verde representan al primer grupo experimental (los experimentos realizados en Septiembre) y las muestras en azul corresponden al segundo grupo experimental (experimentos realizados en Diciembre).

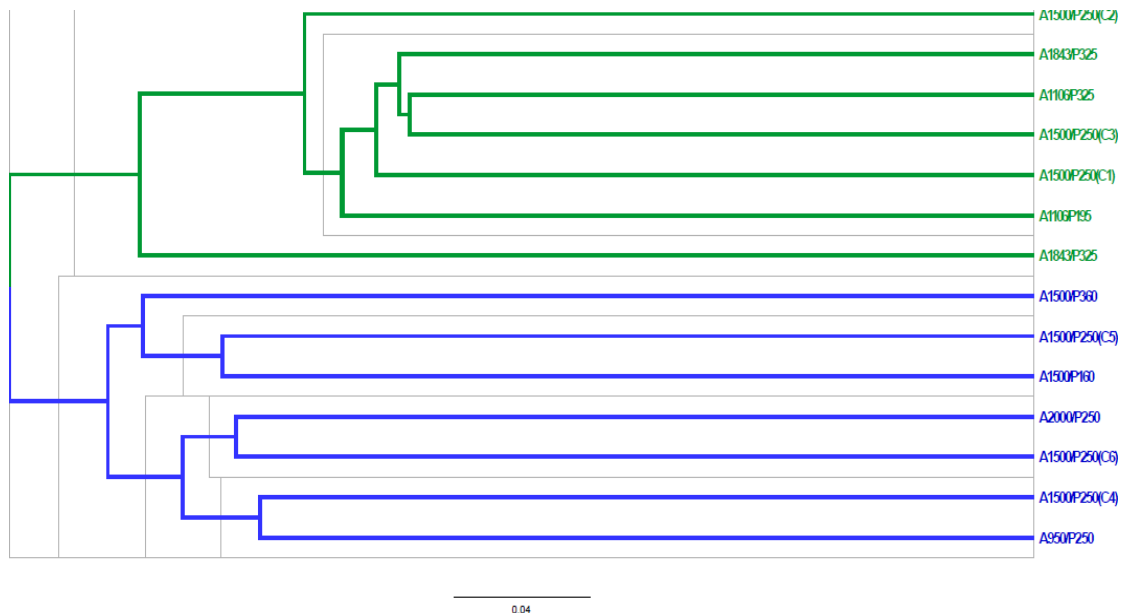


Figura 5.15. Análisis Unifrac sin ponderación para las muestras de biopelícula anódica de las CEMs que fueron operadas con diferentes mezclas de ácido acético y propiónico. Las muestras se agruparon principalmente por el periodo de inoculación. El color verde representa al primer bloque experimental y el azul al segundo bloque experimental.

Lo que se percibe claramente, tanto en los análisis Unifrac realizados sin ponderación como en los resultados obtenidos del funcionamiento de las CEMs, es que la fuente del inóculo es una variable más crítica para el desarrollo de la comunidad, en comparación con la concentración o tipo de sustrato utilizados (Figura 5.16).

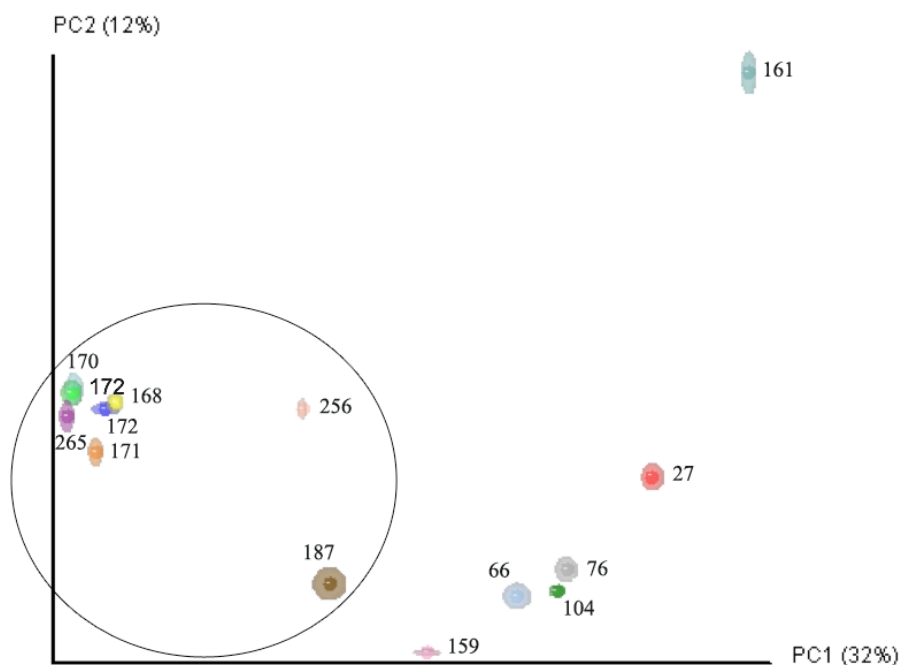


Figura 5.16. Análisis de Coordenadas Principales sin ponderación para las muestras de biopelícula anódica de las CEMs. Los números colocados en los puntos representan la producción de H_2 ($mL/d/L_{reactor}$). Las muestras fueron agrupadas con base en producciones de hidrógeno similares.

La diversidad y composición del consorcio microbiano desarrollado en el ánodo de las CEMs, puede influir significativamente en las tasas de rendimiento y producción de H_2 , tal y como se observó en los resultados correspondientes a la parte operacional de las celdas. Las tasas de producción y rendimiento de H_2 fueron mejores durante el primer bloque experimental, lo cual se encuentra relacionado con una mayor diversidad de microorganismos anodófilos en todas las muestras, con excepción de la muestra A1500/P250C5 perteneciente al segundo bloque de experimentos, lo que demuestra la significancia de la redundancia funcional y las interacciones sintróficas entre las bacterias.

Para identificar posibles grupos entre las muestras, se realizaron los análisis de coordenadas principales ponderados y sin ponderación (PCoA, por sus siglas en inglés) a partir de las tablas jackknifed OTU. En la Figura 5.17, se observa que las muestras correspondientes al primer bloque de experimentos forman un grupo, con excepción de la muestra A1843/P325, y se separan del

segundo bloque de experimentos en PC1. Las muestras correspondientes al segundo bloque de experimentos se encuentran dispersas en PC1.

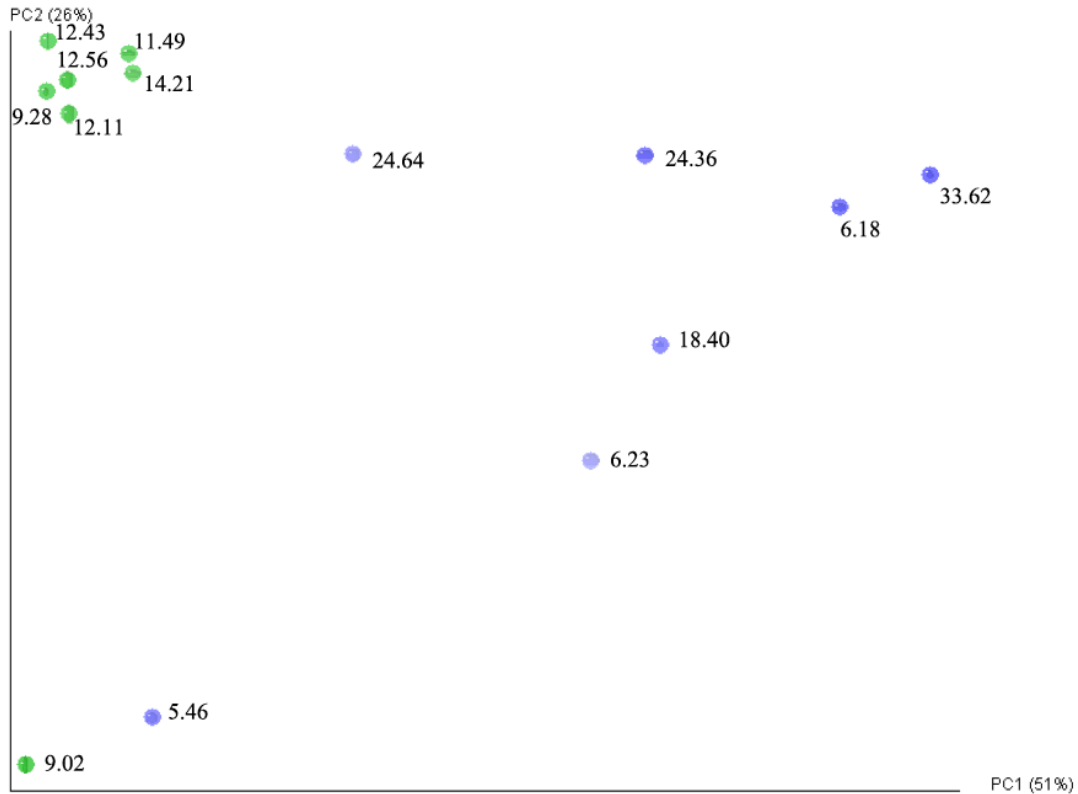


Figura 5.17. Análisis de Coordenadas Principales ponderadas para el primer y segundo bloques experimentales. El primer bloque de experimentos se encuentra representado en color verde y el segundo bloque en azul. Las muestras del primer bloque se encuentran agrupadas mientras que las del segundo bloque se encuentran dispersas.

Aún cuando se utilizaron las mismas concentraciones de ácido acético y propiónico en algunas de las CEMs que fueron inoculadas con el mismo inóculo (por ejemplo A1500/P250C4, A1500/P250C5 y A1500/P250C6), el consorcio microbiano se desarrolló de manera distinta (lo cual se corrobora con los análisis Unifrac sin ponderación y PCoA ponderado). Estas diferencias pueden deberse a diversos factores entre los cuales se encuentran la temperatura (durante el primer bloque de experimentos la temperatura osciló en los 25°C mientras que en el segundo bloque estuvo alrededor de los 18°C) y la fuente del inóculo (aún cuando se tomaron las muestras de agua residual para inocular las celdas de la misma fuente, las estaciones fueron diferentes generando algún posible cambio en la microbiota contenida en la misma), en lugar de las concentraciones de ácidos grasos volátiles utilizadas.

5.1.7. PRESENCIA DE *HOMO-ACETOGÉNICOS*, *GEOBACTERACEAE* Y *ARCHAEAS* EN LA BIOPELÍCULA ADHERIDA AL ÁNODO DE LAS CEMS

Para confirmar la presencia de bacterias *homo-acetogénicas* se realizaron los análisis de PCR en tiempo real, identificando al gen formil tetrahidrofolato sintetasa (*FTHFS*, por sus siglas en inglés). El mayor número de copias de *FTHFS* se registró en la muestra A1500/P250C2 con un valor de 3.84×10^4 copias del gen/cm²; mientras que, el valor más bajo se presentó en la muestra A1843/P195 con únicamente 7.8×10^2 copias del gen/cm².

La muestra A1500/P250C2 también presentó el mayor número de copias del gen *Geobacteraceae sp.* por cm² de superficie del ánodo de las CEMs, con un valor de 3.65×10^7 ; mientras que, el valor más bajo se obtuvo en la muestra A1843/P325 con un valor de 5.69×10^4 copias del gen/cm² (Figura 5.18). Se observó que las muestras con el número más alto de copias del gen *FTHFS*/cm² fueron también las que presentaron el mayor número de copias del gen *Geobacteraceae*/cm² confirmando con ello la relación sintrófica entre los *homoacetogénicos* y las bacterias anodofílicas tales como *Geobacteraceae*. Sin embargo, no se pudo encontrar una relación directa entre la concentración de ácidos grasos volátiles utilizada y el número de copias del gen/cm² de *FTHFS* y *Geobacter sp.*

En la Figura 5.18 se aprecia además que el número de copias del gen *Geobacteraceae* es por lo menos dos veces menor al número de copias de *General Bacteria*. Aunque estas cifras no son absolutas, esto en términos generales indicaría que las especies de *Geobacteraceae* representan alrededor del 1% de las comunidades encontradas en general, por lo cual al momento de realizarse los análisis de pirosecuenciación, *Geobacteraceae* no aparece como uno de los miembros más abundantes de la comunidad.

Finalmente, se cuantificó la población de *Archaeas* presentes en las muestras de biopelícula debido a que éstas pueden consumir al acetato adicionado como sustrato en el ánodo de las CEMs. Aún cuando los ánodos se expusieron al aire durante aproximadamente 20 min al final de cada ciclo de operación y se adicionó una solución de bromoetilsulfonato (BES) en una concentración 50 mM para inhibir el crecimiento de las metanogénicas, se detectaron metanógenos *hidrogenotróficos* y *acetoclásticos* en todas las muestras.

El número de copias de *Archaea* en el 16S rRNA varió de 6.88×10^4 copias del gen/cm² (A1843/P195) hasta 1.96×10^6 copias del gen/cm² (A1500/P250C1). *Methanosaetaceae*, un *metanógeno acetoclástico* dominó la población de las *Archaea* (Figura 5.19). Algunos otros *metanógenos hidrogenotróficos* y *acetoclásticos* como las *methanobacteriales*, *methanomicrobiales* y *methanosarcinaceae* fueron menos abundantes en las muestras de biopelícula. Así mismo, la especie *Methanomicrobiales* no se detectó en las muestras A1500/P250C4, A1500/P250C5 y A950/P250.

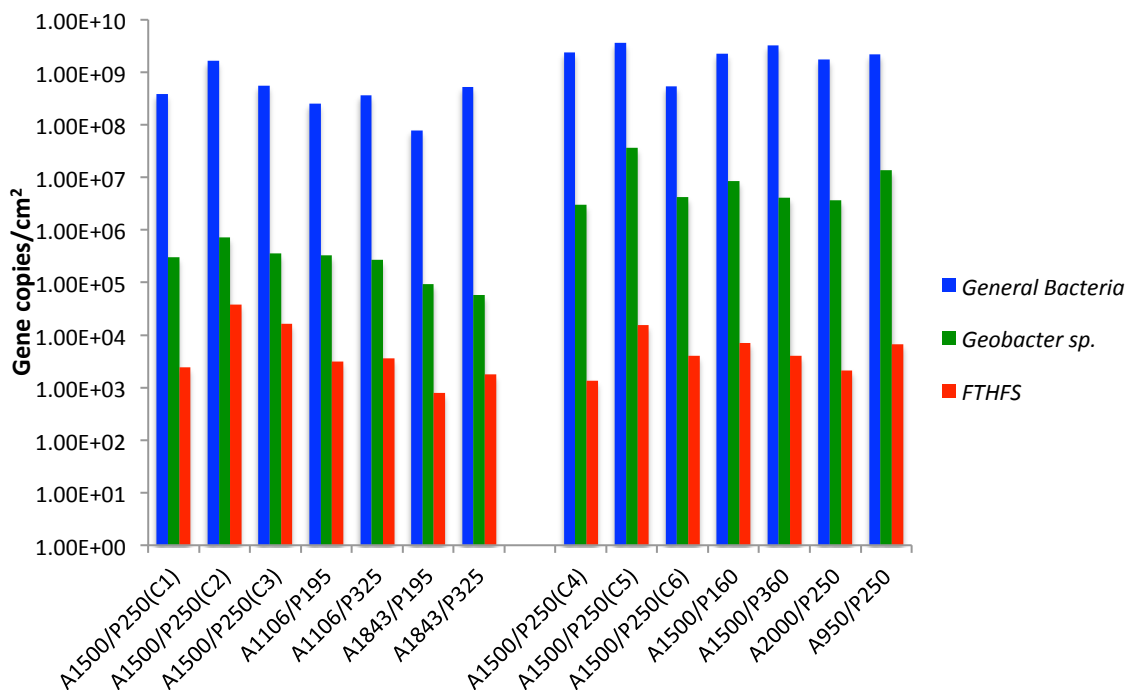


Figura 5.18. Distribución de *Geobacteraceae sp.*, *FTHFS* y *Bacteria* presentes en las muestras de biopelícula anódica (las copias del gen reportadas fueron calculadas con base en el área total del electrodo (50 cm²)).

Las bajas cantidades de *hidrogenotróficos* encontrados en las biopelículas sugieren que el consumo de H₂ por los metanógenos se controló adecuadamente; sin embargo, la presencia de *methanosaetaceae* indica que los metanógenos pudieron competir con las bacterias anodofílicas por el acetato, disminuyendo con ello la eficiencia de los sistemas debido a que parte de los electrones proporcionados por este compuesto pudieron haber sido consumidos para posteriormente formar metano (en cantidades por debajo del límite de detección del equipo).

Aún cuando se detectó la presencia de metanógenos en las celdas, la cantidad de metano producido no fue significativa, lo cual puede ser corroborado por los resultados obtenidos durante la operación de las celdas. Al final de cada ciclo de operación, los ánodos fueron expuestos al aire cuando se adicionaba sustrato nuevo, lo cual pudo originar la inhibición de la mayoría de los metanógenos, limitando su proliferación y, en consecuencia, generando bajas cantidades de metano en el ánodo de las celdas.

Los resultados encontrados con anterioridad indican que con la finalidad de aumentar los rendimientos y producción de H₂ en las CEMs, es importante encontrar un método efectivo que permita controlar la metanogénesis y seleccionar comunidades microbianas que contengan bacterias anodofílicas eficientes para la producción de hidrógeno, el cual deberá aplicarse durante la etapa de inoculación y puesta en marcha de las celdas.

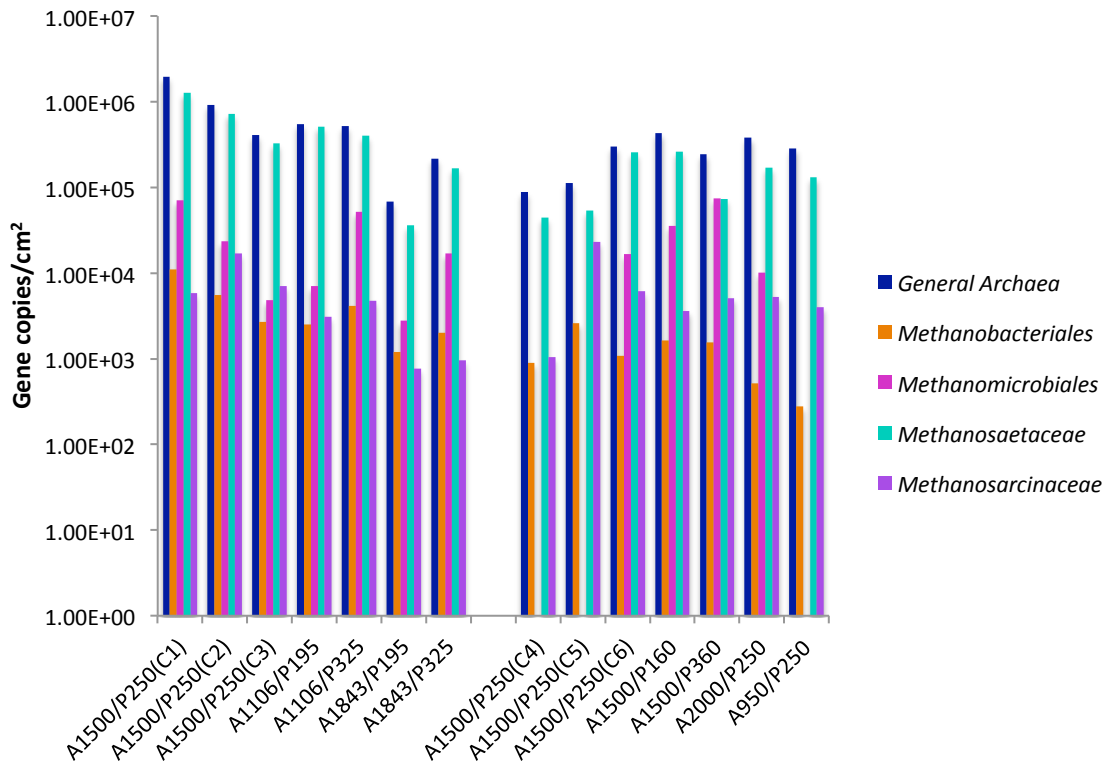


Figura 5.19. Distribución de *Archaea* de las muestras de biopelícula anódica de las CEMs (el número de copias del gen reportadas se encuentran calculadas con base en el área total de los electrodos (50 cm²)).

Durante esta etapa experimental se comprobó que el inóculo desempeña un papel muy importante en el desarrollo de los consorcios microbianos que pueden encontrarse adheridos al ánodo de las CEMs y que diferentes consorcios microbianos pueden desarrollarse dependiendo de las concentraciones que se utilicen de ácido acético y propiónico. Los análisis Unifrac sin ponderación permitieron visualizar claramente que la fuente de inóculo resulta ser un factor más crítico para determinar la estructura que tendrá la comunidad microbiana adherida al ánodo de las celdas en comparación con la concentración o tipo de sustrato que se utilice.

Los resultados obtenidos en cuanto al funcionamiento de las CEMs corroboraron que la composición y diversidad del consorcio microbiano en la biopelícula adherida al ánodo de las celdas puede influir significativamente en las tasas de producción y rendimiento de las mismas. Durante el primer bloque experimental se obtuvieron las más altas remociones de materia orgánica (en un rango del 53 al 60%) y tasas de producción de hidrógeno (de 170 a 265 mL/d/L_{react}), lo cual puede estar relacionado con una mayor diversidad de especies anodofílicas en las biopelículas y demuestra la importancia de contar con una redundancia funcional y el tener relaciones sintróficas entre las bacterias.

Los análisis estadísticos realizados para cada una de las variables de respuesta establecidas (remoción de materia orgánica medida como DQO, porcentajes removidos de ácido acético y

propiónico, DC, CE, r_{H_2} , Y_{H_2} y producción de H_2), también corroboraron la importancia que tiene el inóculo en el desempeño de las CEMs, ya que en todos ellos resultó significativo el efecto de los bloques experimentales en los resultados obtenidos.

Durante el estudio se observó que tanto el ácido acético como el ácido propiónico fueron removidos de manera similar, con remociones del 62 al 92%, lo cual evidencía que el ácido propiónico puede ser aprovechado eficientemente por las bacterias anodofílicas para la producción de hidrógeno y además que la mezcla de ácidos propicia el desarrollo de microorganismos capaces de degradar más fácilmente al ácido propiónico.

De acuerdo a los resultados de optimización de respuestas múltiples se encontró que las mejores tasas de rendimiento y producción de hidrógeno se alcanzan cuando se utilizan una concentración de ácido acético igual a 1477.61 mg/L y de ácido propiónico igual a 247.19 mg/L, con lo cual se obtienen una tasa de rendimiento de 20.24 mmol de H_2 /gDQO_{rem} y una tasa de producción de hidrógeno de 185 mL/d/L_{react}. Estos resultados fueron mejores a los obtenidos por otros autores (Sun et al., 2008 y 2010).

El estudio de pirosecuenciación demostró que la biopelícula adherida al ánodo de las CEMs del primer bloque experimental tenía una distribución uniforme de *Proteobacterias*, *Firmicutes* y *Bacteroidetes*, mientras que, durante el segundo bloque experimental las *Proteobacterias* fueron la especie dominante en cada uno de los reactores. En general, durante el primer bloque de experimentos se obtuvieron las más altas tasas de producción de hidrógeno, específicamente en los reactores A1500/P250C1 y A1843/P325. Estos resultados sugieren que aún cuando es importante contar con una diversidad microbiana para obtener altas producciones de hidrógeno, la presencia y abundancia de ciertas especies también tendrán un efecto significativo.

Otro hecho importante es que aún cuando se utilizaron las mismas concentraciones de ácido acético y propiónico en algunas de las CEMs que fueron inoculadas con el mismo inóculo (por ejemplo A1500/P250C4, A1500/P250C5 y A1500/P250C6), se desarrolló un consorcio microbiano diferente. Estas diferencias pueden deberse a la fuente o estación del año en la que se colecte el inóculo, en lugar de las concentraciones que se manejen de ácidos grasos volátiles.

Finalmente, los análisis de PCR en tiempo real indicaron que algunas arqueobacterias metanogénicas se encontraban presentes en bajas cantidades. La especie *Methanosaetaceae* fue la que dominó en la mayoría de las biopelículas, representando una posible pérdida de ácido acético para la posterior producción de metano (en cantidades menores al límite de detección del equipo). Aún cuando se detectaron los metanógenos, el metano producido no fue significativo, lo cual se comprobó con los análisis realizados en la cámara anódica y catódica de las CEMs. Al final de cada ciclo operacional, los ánodos de las celdas fueron expuestos al aire para posteriormente adicionar sustrato nuevo, ocasionando la inhibición de la mayoría de los metanógenos, limitando su proliferación y, en consecuencia, produciendo muy bajas cantidades de metano.

5.2. Segunda etapa experimental: Pruebas con una mezcla de ácido acético, propiónico y butírico

Durante esta etapa se trabajó con dos CEMs. Los primeros seis ciclos de experimentación consistieron en adicionar en una de las celdas ácido acético únicamente con una concentración de 1500 mg/L (CEM1); mientras que, en la segunda celda se adicionó una mezcla de ácido acético (1500 mg/L) y ácido propiónico (250 mg/L) (CEM2). Posteriormente se adicionó ácido butírico en ambas celdas. En estudios previos se ha demostrado que la conversión del ácido propiónico a hidrógeno por medio de las bacterias anodofílicas puede resultar más difícil que la conversión del ácido acético o butírico a hidrógeno (Shi y Yu, 2004), por ello la importancia de realizar estas pruebas.

5.2.1. REMOCIÓN DE MATERIA ORGÁNICA MEDIDA COMO DQO

De acuerdo a los resultados obtenidos en cuanto a remoción de materia orgánica, se observaron porcentajes más altos en la CEM1 (adicionando únicamente acético como sustrato), en comparación con la CEM2 (en donde se adicionó la mezcla de acético y propiónico), obteniéndose alrededor de un 95% de remoción en el primer caso, y en el segundo caso un porcentaje máximo del 64% (Figura 5.20, ciclos de operación del 1 al 6).

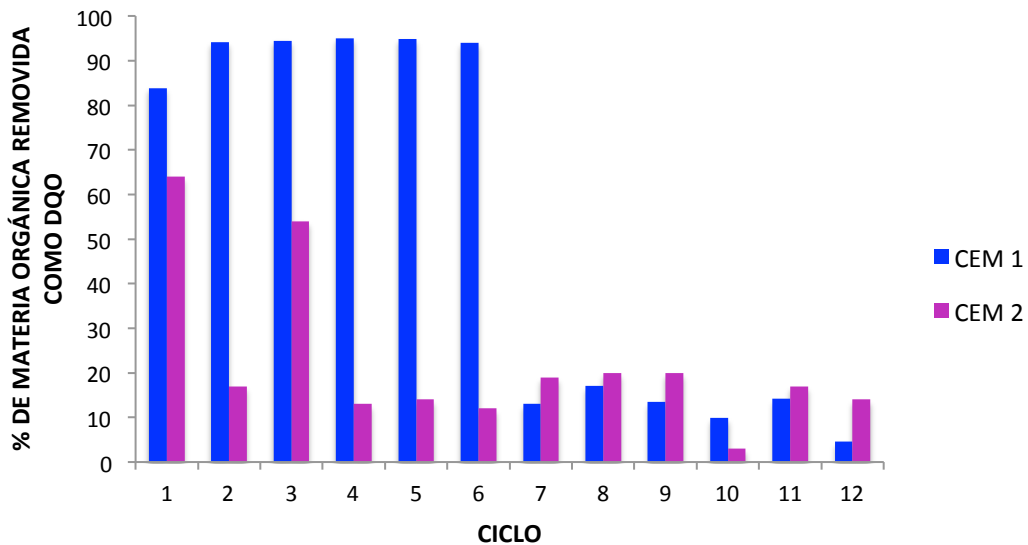


Figura 5.20. Porcentaje de remoción de materia orgánica medida como DQO durante las pruebas experimentales realizadas con mezclas de ácido acético, propiónico y butírico.

Escapa et al. (2012) demostraron que al utilizar ácido acético y propiónico como sustratos, el ácido propiónico resulta más difícil de degradar. Esta baja velocidad de conversión del propiónico puede estar asociada con el hecho de que este compuesto no es utilizado directamente por los microorganismos anodofílicos (las bacterias acetogénicas son las que lo utilizan para producir

acetato) (*Ha et al., 2008*). En los seis ciclos posteriores se adicionó ácido butírico en ambas celdas en una concentración de 600 mg/L. Durante estas pruebas los porcentajes de remoción de materia orgánica disminuyeron significativamente, siendo mejores en la CEM2 con porcentajes máximos del 20%, mientras que en la CEM1, el máximo alcanzado fue de alrededor del 18% (Figura 5.20, ciclos de operación del 7 al 12).

5.2.2. CONSUMO DE ÁCIDOS GRASOS VOLÁTILES EN LAS MEZCLAS

Comparando los resultados obtenidos en ambas celdas en cuanto a remoción de ácido acético, se encontró que al adicionar únicamente el ácido acético las remociones de éste son muy buenas llegándose a obtener valores de hasta un 95% en la CEM1 durante los primeros seis ciclos de operación (Figura 5.21); sin embargo, al utilizar el ácido propiónico, el porcentaje de remoción de ácido acético disminuye considerablemente (CEM2), alcanzándose porcentajes de hasta un 58% como máximo. Este hecho puede deberse a que los microorganismos presentes en la biopelícula adherida en el ánodo de la CEM2, están consumiendo primeramente el ácido propiónico y posteriormente el ácido acético como sustrato para la producción de biogás, y además el ácido propiónico no es aprovechado directamente por las bacterias anodofílicas, sino más bien es consumido primeramente por los microorganismos acetogénicos para la producción de acetato y posterior producción de biogás, lo cual generaría una acumulación de ácido acético en el sistema (*Ha et al., 2008*).

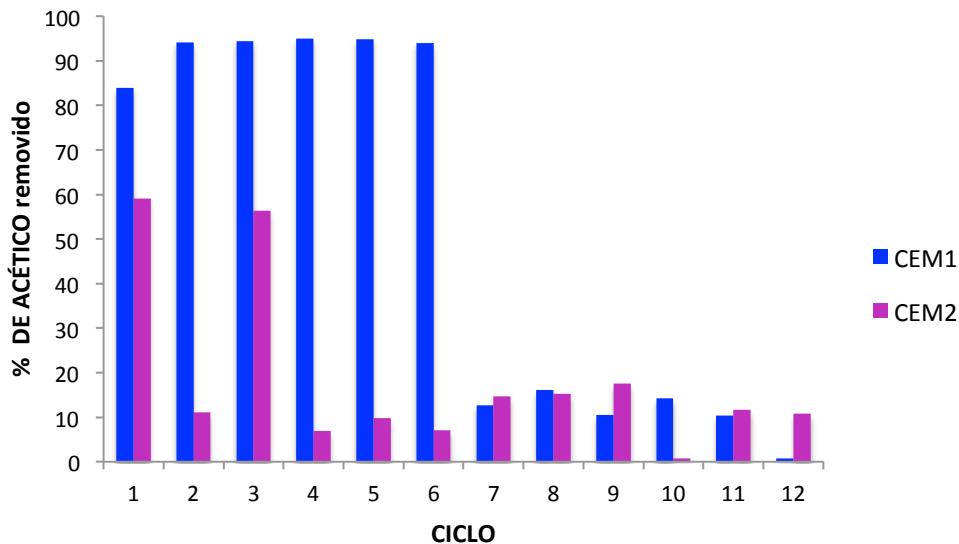


Figura 5.21. Porcentaje de remoción de ácido acético en las dos CEMs utilizadas.

Quando se adicionó el ácido butírico durante los últimos seis ciclos de operación de las CEMs, los porcentajes de remoción disminuyeron considerablemente en comparación con los primeros seis ciclos de operación. En este caso, el consumo de ácido acético fue mayor en la CEM2 en comparación con la CEM1 (Figura 5.21). Así mismo, al comparar los resultados obtenidos en

ambas celdas en cuanto a remoción de ácido butírico, se observó que este ácido no está siendo removido adecuadamente por los microorganismos, ya que los porcentajes máximos de remoción alcanzados fueron de alrededor del 19% en la CEM2 y de un 18% en la CEM1, siendo mejores en la CEM2 en comparación con la CEM1 (Figura 5.22), lo cual coincide con los resultados obtenidos en cuanto a remoción de ácido acético y materia orgánica. Durante el ciclo 4 el porcentaje de remoción de butírico disminuyó considerablemente, esto se puede deber a que primeramente fue convertido a acetato y posteriormente el acetato fue aprovechado por los microorganismos anodofílicos como se explica más adelante.

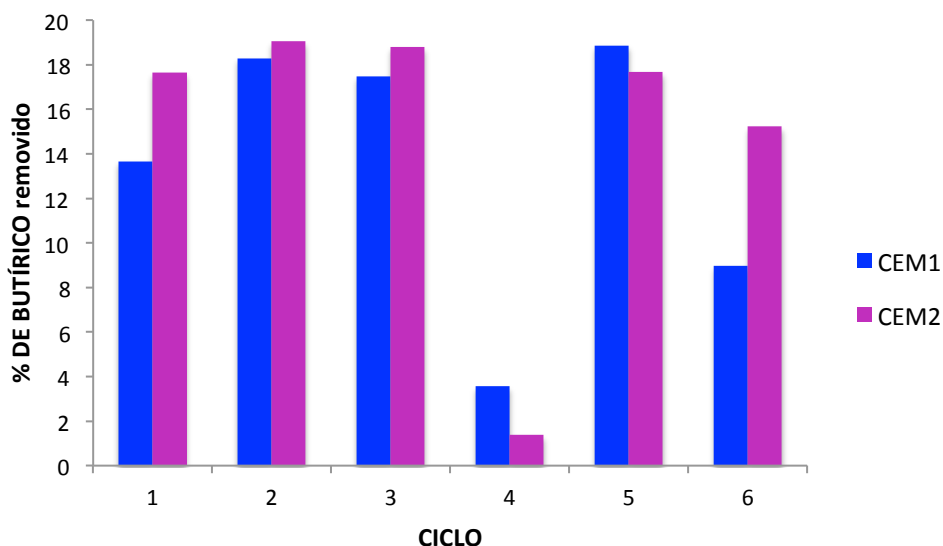


Figura 5.22. Porcentaje de remoción de ácido butírico en las CEMs durante los últimos seis ciclos de operación.

Liu et al. (2005 c) demostraron que la velocidad de transferencia de electrones en un ánodo en el que se adiciona acético como sustrato es significativamente más alta que en un ánodo en el cual se utiliza butírico como sustrato, lo cual puede explicar la limitada velocidad de consumo del ácido butírico en comparación con el ácido acético, y por ende las bajas tasas de remoción de ácido butírico en las CEMs.

En la Figura 5.23 se presentan las remociones obtenidas en la CEM1 durante los doce ciclos de operación de la misma. En este gráfico se puede percibir claramente que durante los primeros ciclos, en donde se adicionó únicamente el ácido acético como sustrato, este fue aprovechado eficientemente por los microorganismos; sin embargo, al adicionar el ácido butírico los porcentajes de remoción decayeron significativamente, siendo más altas las remociones de este último en comparación con el ácido acético. La eliminación del ácido butírico no siempre puede estar asociada al metabolismo de los microorganismos anodofílicos debido a que éste no es un sustrato ideal para los mismos (*Freguia et al., 2010*). Por lo tanto, es posible que el ácido butírico haya sido fermentado primeramente a acético, y posteriormente este último haya sido oxidado

por los microorganismos anodofílicos para la producción de hidrógeno de acuerdo a la siguiente reacción (Anderson et al., 1987):

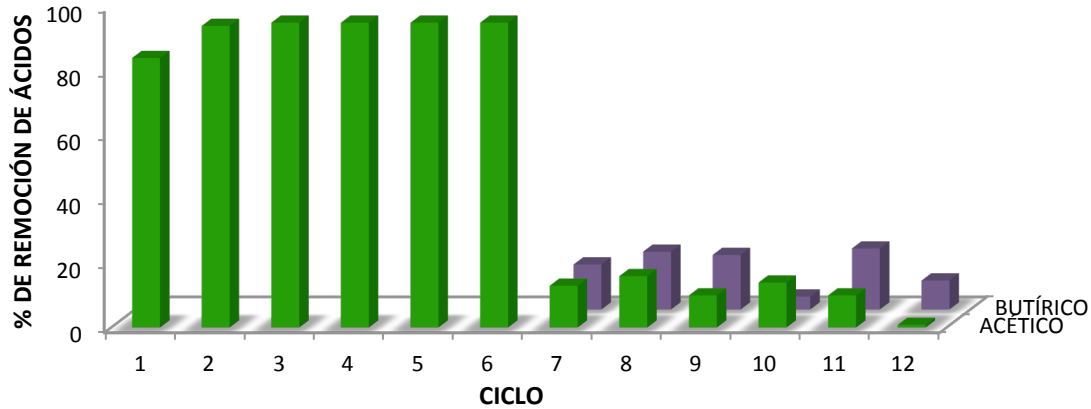


Figura 5.23. Porcentaje de remoción de ácido acético y butírico en la CEM1 durante los doce ciclos de operación.

Realizando el mismo análisis, pero en este caso para la CEM2 (Figura 5.24), se observa que el ácido propiónico se remueve en un mayor porcentaje al ácido butírico y acético removidos en la mayoría de los ciclos. Este comportamiento sugiere la presencia de microorganismos que tienen mayor afinidad por el ácido propiónico en comparación con el ácido acético y butírico. Por otra parte, debido a que el ácido propiónico y butírico no son aprovechados de manera directa por los microorganismos anodofílicos, sino más bien son primeramente fermentados para su posterior consumo, puede haber un aumento en la concentración de acetato en el ánodo de las celdas, lo cual trae como consecuencia variaciones en los porcentajes de remoción del ácido acético.

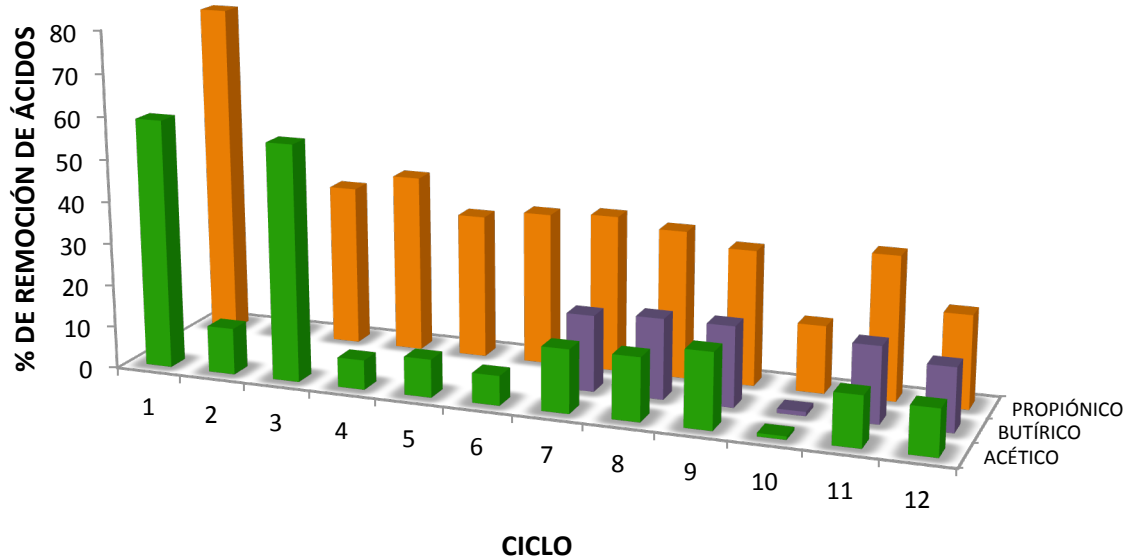


Figura 5.24. Porcentaje de remoción de ácido acético, propiónico y butírico en la CEM2 durante los doce ciclos de operación.

5.2.3. DENSIDAD DE CORRIENTE, EFICIENCIA COULÓMBICA Y PORCENTAJE TOTAL DE HIDRÓGENO RECUPERADO

Para conocer la eficiencia del sistema se realizó el cálculo de la densidad de corriente, eficiencia coulombica y porcentaje total de hidrógeno recuperado.

En la Figura 5.25 se presentan los valores obtenidos de densidad de corriente de las celdas durante los doce ciclos de operación. Este parámetro se obtiene al dividir la corriente consumida por las celdas entre el área superficial del ánodo utilizado, por ello resulta de interés su cálculo, ya que por medio de él se puede evidenciar cuál es la producción de hidrógeno en las celdas dependiendo del consumo de energía de las mismas.

Como era de esperarse los mejores resultados se obtuvieron cuando se utilizó únicamente ácido acético como sustrato (CEM1, ciclos 1 al 6), con un valor de aproximadamente 380 mA/m²; mientras que, los valores más bajos se encontraron cuando se utilizó la mezcla de ácido acético y ácido propiónico (CEM2, ciclos 1 al 6), alcanzándose en este caso un valor máximo de tan solo 50 mA/m². Es importante notar que en la celda en la que se utilizó la mezcla de los tres ácidos (CEM2), al adicionar el ácido butírico la densidad de corriente aumentó, lo cual lleva a concluir que el ácido propiónico puede ser el causante de la baja eficiencia de los sistemas y no tanto el ácido

butírico, contrario a lo que se pensaba de acuerdo a los resultados obtenidos en remoción de materia orgánica y remociones de cada uno de los ácidos adicionados.

Estos resultados coinciden con estudios previos en los cuales se han utilizado ácido acético, butírico y propiónico como sustratos de manera individual (*Escapa et al., 2012; Lu et al., 2012*), en todos ellos se observó que el ácido acético es el sustrato más favorable para los microorganismos anodofílicos, seguido del ácido butírico y por último el propiónico. El consumo del ácido butírico no siempre se puede asociar con el metabolismo de los microorganismos anodofílicos debido a que este compuesto no es un sustrato ideal para los mismos (*Freguia et al., 2010*). Por lo tanto, es posible que el ácido butírico haya sido fermentado primeramente a acético, y posteriormente el acético fuera oxidado por los anodofílicos. Las bajas remociones de propiónico también han sido reportadas en estudios previos utilizando glicerol como sustrato (*Selembo et al., 2009b*).

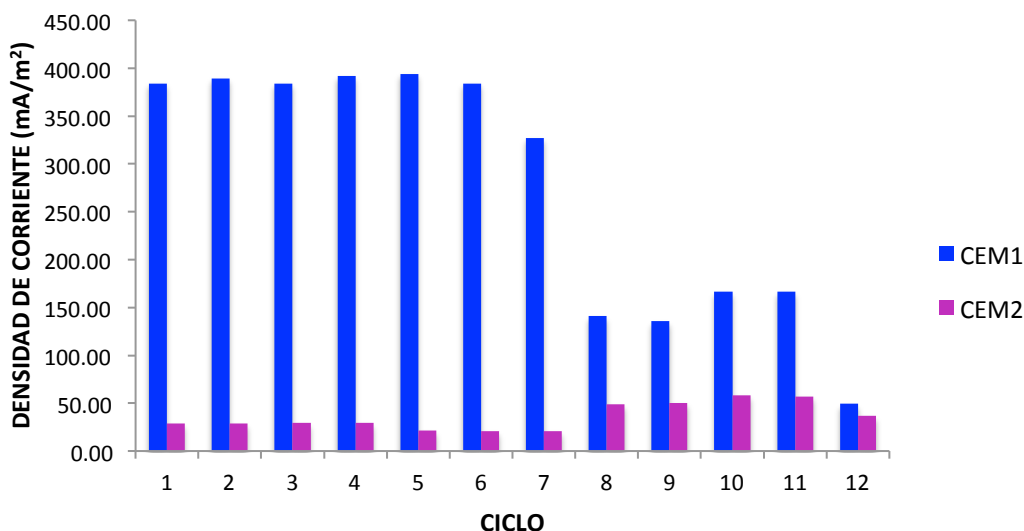


Figura 5.25. Densidad de corriente en mA/m² obtenida durante la operación de las CEMs.

En cuanto a la eficiencia coulombica de las celdas, nuevamente los mejores resultados se presentaron en la CEM1, en donde únicamente fue utilizada la mezcla de ácido acético y butírico (Figura 5.26). La máxima eficiencia coulombica se obtuvo durante el ciclo siete con un valor del 13%, mientras que los valores más bajos se observaron en la CEM2 con valores de alrededor del 1%. Durante el ciclo 10 la eficiencia coulombica de la CEM2 aumentó considerablemente con respecto a los ciclos anteriores y posteriores, esto se debe a que durante este ciclo los porcentajes de remoción de ácido acético y butírico disminuyeron, lo cual tuvo como consecuencia una baja remoción de materia orgánica. Debido a que la eficiencia coulombica es una relación de los moles de hidrógeno recuperados calculados con base en la corriente medida y los moles teóricos totales de hidrógeno producidos con base en la materia orgánica removida como DQO, una baja remoción

de materia orgánica en la celda genera una eficiencia coulombica mayor cuando los moles de hidrógeno recuperados con base en la corriente medida se mantienen constantes.

Comparando estos resultados con los obtenidos en otros trabajos bibliográficos, en los cuales únicamente se ha utilizado acetato como fuente de sustrato (*Liu et al., 2005 c; Tartakovsky et al., 2009*), estos valores resultan relativamente bajos. Es posible que estas diferencias se deban a la baja conversión del ácido propiónico a corriente y a la competencia existente entre los microorganismos anodofílicos con otro tipo de organismos presentes en las celdas por el sustrato.

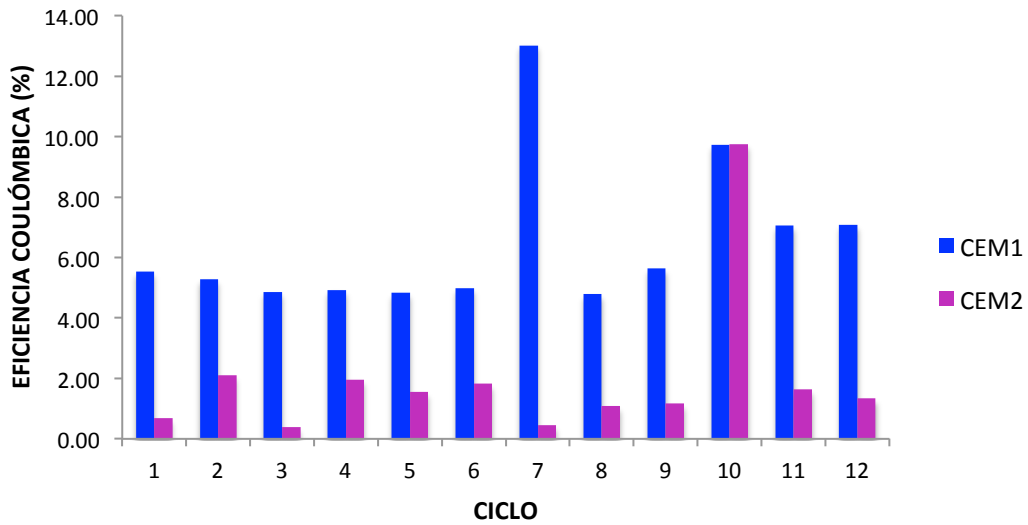


Figura 5.26. Eficiencia coulombica de las CEMs durante la fase experimental.

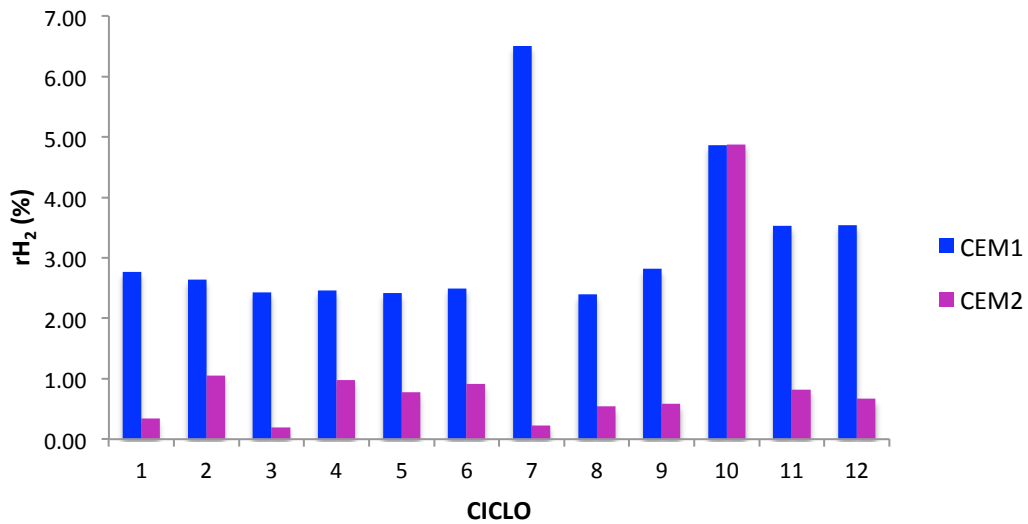


Figura 5.27. Porcentaje total de recuperación de hidrógeno obtenido durante los diferentes ciclos de operación de las CEMs.

5.2.4. TASAS DE PRODUCCIÓN Y RENDIMIENTO DE HIDRÓGENO

Finalmente se calcularon el rendimiento y la tasa de producción de hidrógeno de las celdas. En las Figuras 5.28 y 5.29 se encuentran registrados los resultados para ambos casos. Al igual que en los resultados anteriores, los mejores rendimientos de hidrógeno se presentaron en la CEM1 con un valor promedio de 2 mmol de $H_2/gDQO_{rem}$, mientras que en la CEM2 el rendimiento promedio fue de tan solo 0.62 mmol de $H_2/gDQO_{rem}$. Al parecer la presencia del ácido propiónico disminuye la producción de H_2 , debido a que se empieza a formar metano en el ánodo de las celdas.

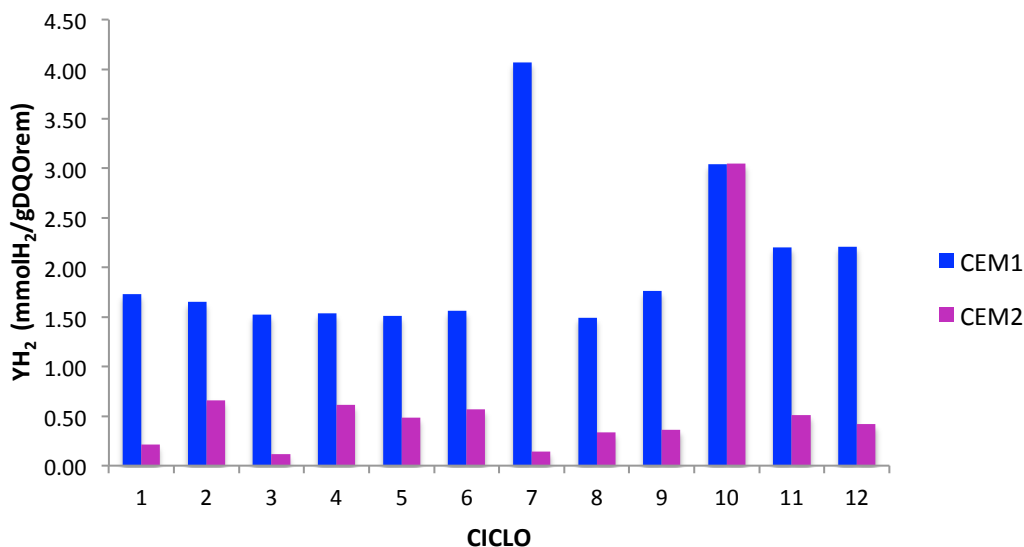


Figura 5.28. Tasas de rendimiento de hidrógeno alcanzadas en los sistemas experimentales.

El biogás producido en la cámara catódica de ambas CEMs (CEM1 y CEM2) estuvo compuesto únicamente por hidrógeno. Durante los primeros cuatro ciclos experimentales, se identificó la presencia de metano (en un 34%) en el ánodo de la CEM2, en la cual se utilizó como anólito la mezcla de ácido acético y ácido propiónico; mientras que, en la CEM1, en donde únicamente se adicionó ácido acético, no se detectó este gas en la cámara anódica. Después de estos cuatro ciclos, se adicionó BES en una concentración 50 mM para inhibir la proliferación de las arqueobacterias metanogénicas. El efecto fue positivo debido a que en los ciclos posteriores no se detectó metano en la CEM2.

Los bajos rendimientos de la CEM2 pueden deberse a varios factores, entre ellos se encuentran la formación de metano o algún otro gas que no está siendo identificado por la técnica empleada, como por ejemplo ácido sulfhídrico, o bien, algún efecto tóxico en los microorganismos generado por el ácido propiónico con lo cual se ve afectada la eficiencia global del sistema. En el agua residual se encuentra presente el azufre principalmente en forma de sulfatos, por lo cual al haber algunos compuestos reductores del azufre en la cámara anódica de las celdas, éste puede ser reducido a ácido sulfhídrico utilizando algún donador de electrones disponible (*Zhao et al. 2008*).

Posteriormente este ácido sulfhídrico es oxidado abióticamente a azufre elemental, el cual precipita en el ánodo (Dutta et al. 2008; Rabaey et al. 2006).

En el caso de las tasas de producción de hidrógeno, los valores oscilaron entre 250 a 268 mL/d/L_{reactor} para ambas celdas. Estas tasas de producción de hidrógeno son similares a las reportadas en la bibliografía utilizando sustratos puros (Chae et al., 2008; Rozendal et al., 2006; 2007). Aquí no se observaron diferencias significativas entre las diferentes condiciones experimentales probadas.

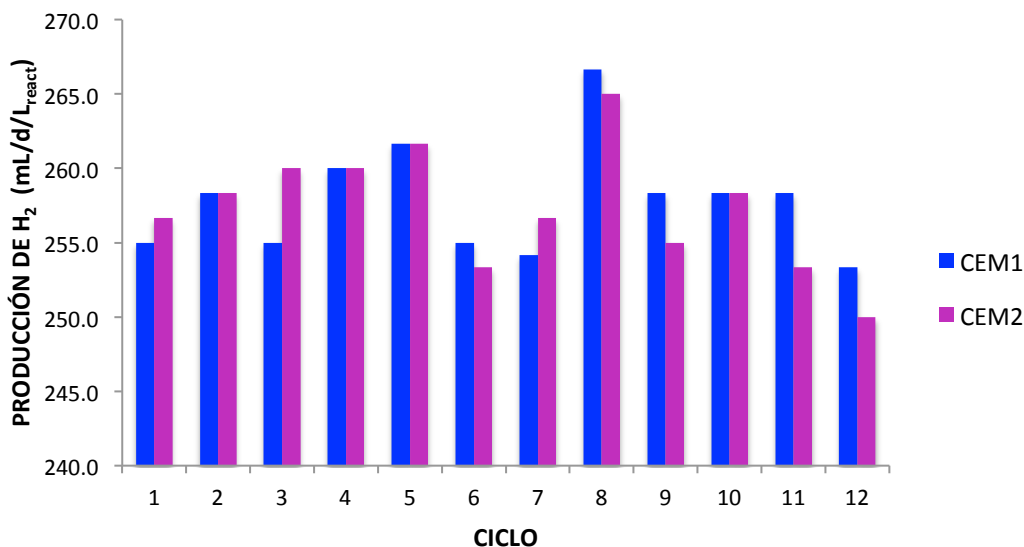


Figura 5.29. Producción de hidrógeno durante los doce ciclos de operación de las CEMs.

Por lo tanto, de acuerdo a los experimentos realizados en este apartado, se encontró que al utilizar una mezcla de ácido acético, propiónico y butírico, el ácido propiónico se remueve en un mayor porcentaje seguido del ácido butírico y finalmente el ácido acético.

Cuando se utiliza ácido acético como sustrato, éste es aprovechado directamente por las bacterias anodófilas para la producción de hidrógeno; sin embargo, al utilizar mezclas de ácido acético-propiónico o ácido acético-propiónico-butírico, tanto el ácido propiónico como el ácido butírico pueden ser consumidos directamente por los microorganismos o primeramente ser transformados a acético para su posterior conversión a hidrógeno, lo cual representa un aumento en la concentración de ácido acético presente en las CEMs (Ha et al., 2008). Además, la velocidad de transferencia de electrones en un ánodo en el cuál se adiciona ácido acético como sustrato es significativamente más alta comparada con un ánodo en el que se adiciona ácido butírico, por lo cual se puede ver limitado el consumo del ácido butírico.

Otro punto importante es que la remoción de ácido butírico no siempre puede estar asociada al metabolismo de los microorganismos anodófilos debido a que éste no es un sustrato ideal para

los mismos (Freguia et al., 2010), por lo cual el ácido butírico primeramente puede ser fermentado a acético y posteriormente este último ser oxidado para producir hidrógeno, lo cual explicaría el hecho de que el ácido butírico se removiera en un mayor porcentaje comparado con el ácido acético.

Las más altas eficiencias de las CEMs se obtuvieron cuando se utilizó ácido acético o una mezcla de ácido acético y ácido butírico como sustrato, debido a que con la adición de ácido propiónico existe una mayor posibilidad de generar metano o algunos otros subproductos durante el tratamiento, con lo cual se ven afectados los porcentajes de recuperación total de hidrógeno y tasas de rendimiento del sistema, que son dos parámetros importantes durante el tratamiento.

Estudios previos en los cuales se han utilizado ácido acético, butírico y propiónico como sustratos de manera individual (Escapa et al., 2012; Lu et al., 2012), mostraron que el ácido acético es el sustrato ideal para los microorganismos anodófilos seguido por el ácido butírico y por último el ácido propiónico, lo cual coincide con los resultados obtenidos en este apartado.

Las mejores tasas de rendimiento y producción de hidrógeno se obtuvieron cuando se utilizó únicamente ácido acético como sustrato o una mezcla de ácido acético-butírico. La presencia del ácido propiónico en las mezclas utilizadas como sustrato disminuye la producción de hidrógeno debido a la formación de metano en la cámara anódica las CEMs.

5.3.Tercera etapa experimental: Acoplamiento del sistema fermentador-CEM-CCM

5.3.1. BALANCE ENERGÉTICO DEL PROCESO

En la actualidad los sistemas de lodos activados son los más utilizados para realizar el tratamiento de aguas residuales. Sin embargo, se requieren de 0.7 a 2 kWh/kg de DQO removida para llevar a cabo el proceso y se generan alrededor de 4 kg de lodo por kg de DQO tratada. Para solventar los costos de disposición de estos sólidos, el lodo es tratado mediante un sistema de digestión anaerobia para generar metano, buscando obtener tasas de producción capaces de sustentar las necesidades energéticas de este proceso (Tchobanoglous G., 2003).

Tecnologías como la Fermentación, CEMs y CCMs pueden ser utilizadas también para dar tratamiento a las aguas residuales con un doble beneficio, el obtener agua residual con buena calidad y adicionalmente recuperar energía que pueda ser aprovechada en el mismo proceso o para algún otro fin, dándole un valor agregado al sistema. Con el objeto de sustentar esta aseveración, a continuación se presentan los balances energéticos para cada uno de estos sistemas, los cuales permiten calcular la energía neta necesaria para el proceso.

En el caso de un fermentador, la energía neta recuperada (E_N) se calcula como:

$$E_N = \frac{E_{H_2} - E_c}{VC} \quad (5.10)$$

Donde: E_N = Es la energía neta recuperada por el fermentador en (kJ/kg de DQO alimentada)

E_{H_2} = Es la energía recuperada equivalente al volumen de H_2 generado

E_c = Es la energía necesaria para el calentamiento del reactor, llevándolo de la temperatura ambiente (T_a) a la temperatura de fermentación (T_f)

V = Volumen del reactor

C = Concentración de DQO en la alimentación (kg de DQO/L)

El valor de la energía recuperada equivalente al volumen de H_2 producido se calcula por medio de la siguiente ecuación:

$$E_{H_2} = V_{H_2} \rho_{H_2} (LHV) \quad (5.11)$$

Donde: V_{H_2} = Es el volumen de hidrógeno producido en el fermentador (L)

ρ_{H_2} = Densidad del hidrógeno (8.9×10^{-5} kg/L)

LHV = Poder calorífico inferior del hidrógeno (120,000 kJ/kg de H_2)

Para conocer la energía necesaria para el calentamiento del reactor se utiliza la siguiente ecuación:

$$E_c = V \rho_{H_2O} C_p (T_c - T_a) \quad (5.12)$$

Donde: ρ_{H_2O} = Densidad del agua (1kg/L)

C_p = Calor específico del agua (4.2 kJ/kgK)

Asumiendo que las pérdidas de calor en el sistema son despreciables, la energía neta recuperada se encuentra en función de la temperatura que se utilice para la fermentación. Por ejemplo, si se toma como base un agua residual con un contenido de glucosa de 10 g/L (10.67 g de DQO/L), utilizando reactores en modo discontinuo de 100 mL, trabajando en condiciones mesofílicas ($T_f=30$ °C) y a temperatura ambiente T_a de 25 °C, se puede obtener un volumen de hidrógeno de 0.21 L (Wang y Wan, 2008).

Realizando los cálculos correspondientes con las ecuaciones mencionadas anteriormente se obtiene que: $E_{H_2} = 2.24$ kJ; $E_c = 2.10$ kJ; por lo tanto, $E_N = 131.20$ kJ/ kg de DQO, lo cual demuestra que el sistema es energéticamente favorable.

Sin embargo, debido a que el sistema de Fermentación depende de la energía requerida para llevar a cabo el proceso ya sea en condiciones mesofílicas o termofílicas, en algunas ocasiones puede volverse energéticamente no favorable. Por ejemplo, si se trabaja con una $T_f = 40$ °C, se obtiene un volumen de hidrógeno de 0.26 L. Los cálculos nos arrojan una $E_{H_2} = 2.77$ kJ; $E_c = 6.30$ kJ y $E_N = -3 308.34$ kJ/kg de DQO. Esta pérdida energética puede compensarse si se aprovechan los subproductos de la fermentación con algún otro proceso.

En el caso de las CEMs la energía recuperada en el sistema puede obtenerse con base en el contenido energético del hidrógeno recuperado, comparado con: a) la energía eléctrica suministrada por medio de una fuente externa, b) la energía suministrada al sistema por medio del sustrato utilizado o c) la energía suministrada por ambos casos. Por lo general se utiliza la energía eléctrica suministrada por medio de la fuente externa para comparar la eficiencia energética de este proceso con algún otro, por ejemplo, electrólisis del agua.

De esta manera, la cantidad de energía adicionada al circuito por una fuente de poder ajustada con las pérdidas a través de la resistencia utilizada (W_E , J) se obtiene como:

$$W_E = \sum_1^n (IEap\Delta t - I^2 R_{ext} \Delta t) \quad (5.13)$$

Donde: E_{ap} (V)= Voltaje aplicado a la celda utilizando una fuente de poder

Δt (s)= Incremento de tiempo para n datos medidos durante un ciclo de operación por lotes

R_{ext} (Ω)= Resistencia externa utilizada para calcular la corriente a través del sistema con base en el voltaje aplicado

I (A) = Corriente del sistema la cual se calcula como $I=V/R_{ext}$

Por otro lado, la cantidad de energía adicionada por el sustrato empleado (W_s , J) se calcula como:

$$W_s = \Delta H_s n_s \quad (5.14)$$

Donde: ΔH_s = Calor de combustión del sustrato (Para un agua residual se considera de 870.28 kJ/mol)

n_s = No. de moles del sustrato consumido durante un ciclo de operación por lotes con base en la remoción de DQO

La eficiencia energética obtenida a partir de la energía eléctrica suministrada (n_E , %) es:

$$n_E = \frac{n_{H_2} \Delta H_{H_2}}{W_E} \quad (5.15)$$

Donde: ΔH_{H_2} = Calor de combustión del hidrógeno (285.83 kJ/mol)

n_{H_2} = Moles de hidrógeno producidos

La eficiencia energética con respecto al sustrato (N_s) se obtiene como:

$$N_s = \frac{n_{H_2} \Delta H_{H_2}}{W_s} \quad (5.16)$$

La energía promedio recuperada basada tanto en las entradas de energía eléctrica y la entrada de energía por el sustrato (n_{E+S}) es:

$$n_{E+S} = \frac{W_{H_2}}{W_E + W_S} \quad (5.17)$$

Donde: W_{H_2} = Cantidad de energía adicionada por el hidrógeno calculada como $W_{H_2} = n_{H_2} \Delta H_{H_2}$

Por ejemplo, considerando que se trata un agua residual de tipo doméstico con una concentración inicial de 385 mg de DQO/L, utilizando una CEM de una sola cámara, con una resistencia externa de 10 Ω y un voltaje aplicado a la celda de 0.9 V, se puede generar una corriente de aproximadamente 1 mA, con una tasa de rendimiento de hidrógeno (Y_{H_2}) de 0.050 kg de H_2 /kg de DQO (Cusick et al., 2010).

La cantidad de energía requerida por el sistema (obtenida a partir de la Ec. 5.12) es de 7200 kJ/kg de DQO con una eficiencia energética de 104 % (por medio de la Ec. 5.14).

Multiplicando la tasa de rendimiento de hidrógeno (Y_{H_2}) por el poder calorífico inferior del hidrógeno (LHV = 120,000 kJ/kg de H_2), obtenemos que la energía que se produce a partir del hidrógeno (E_{H_2}) es de 6000 kJ/ kg de H_2 . De esta manera se obtiene que la energía neta recuperada (E_N) es de **504 kJ/kg de DQO**.

Finalmente, en el caso de las CCMs, el proceso por lo general arroja una energía neta recuperada positiva, ya que no se requiere de la adición de energía para llevar a cabo el proceso y a su vez, al dar tratamiento al agua residual se produce electricidad que puede ser aprovechada posteriormente.

Para conocer la cantidad de energía recuperada por la celda, primeramente se calcula la corriente utilizando la relación $I=V/R_{ext}$. Posteriormente se puede conocer la eficiencia coulombica (EC) de la celda con base en la corriente generada y la remoción de materia orgánica medida como DQO durante un ciclo de operación de la siguiente manera:

$$EC = \frac{M \int_0^t I dt}{F b v_{AN} \Delta DQO} \quad (5.18)$$

Donde: M= Peso molecular del O_2 = 32 g/mol

F= Constante de Faraday (96 485 C/mol e^-)

b = Número de moles intercambiados por mol de O_2 = 4 mol e^- /mol O_2

V_{AN} = Volumen de la solución anódica

ΔDQO = Remoción de materia orgánica como DQO en el intervalo de tiempo

La densidad de potencia volumétrica de la celda (P_v , kWh/m³) se obtiene como:

$$P_v = \frac{V^2}{v R_{ext}} \quad (5.19)$$

Donde: V = Voltaje producido por la CCM y v= Volumen de la CCM

La energía eléctrica generada E_N (kWh/kgCOD) se obtiene por medio de la densidad de potencia volumétrica de la celda (P_v , kWh/m³) y la remoción de materia orgánica medida durante cada ciclo de operación. Por ejemplo, considerando el tratamiento de un agua residual de tipo doméstico con una concentración inicial de 385 mg de DQO/L, utilizando una CCM de una sola cámara, con una resistencia externa de 1 k Ω . Se genera un voltaje de aproximadamente 381 mV obteniendo una densidad de potencia volumétrica de 22.5 Wh/m³ (Ec. 5.18) (Cusick et al., 2010). La remoción de materia orgánica como DQO en promedio fue de 83%. Con una eficiencia coulombica del 18% (Ec. 5.17). La energía recuperada en este caso fue de 0.22 kWh/kg de DQO (792 kJ/kg de DQO).

De acuerdo a los balances energéticos anteriores, se puede concluir entonces que los tres sistemas de tratamiento son energéticamente favorables, siendo mejores los procesos bioelectroquímicos comparados con el sistema de Fermentación.

Al realizar la comparación de tres escenarios diferentes para la producción de hidrógeno: el primero de ellos considerando únicamente el proceso de Fermentación; el segundo cuando se tiene un sistema acoplado fermentador con digestión anaerobia y finalmente el tercero considerando un sistema acoplado Fermentador-CEM-CCM (Figura 5.30); se obtiene un balance de energía neta positivo en los sistemas acoplados, siendo mejor en el caso del sistema Fermentador-CEM-CCM, debido a que en este caso se recupera energía por la formación de H₂, tanto en el fermentador como en la CEM, y además no se requiere de la adición de energía en la CEM ya que la CCM es la encargada de proporcionarla. Si se utiliza el sistema acoplado fermentador-digestión anaerobia, aún cuando la energía recuperada es positiva debido a que se produce H₂ y CH₄, se requiere adicionar energía para que se lleve a cabo el proceso de digestión anaerobia, lo cual representa un consumo de energía en el balance global (Tabla 5.2, Figura 5.31).

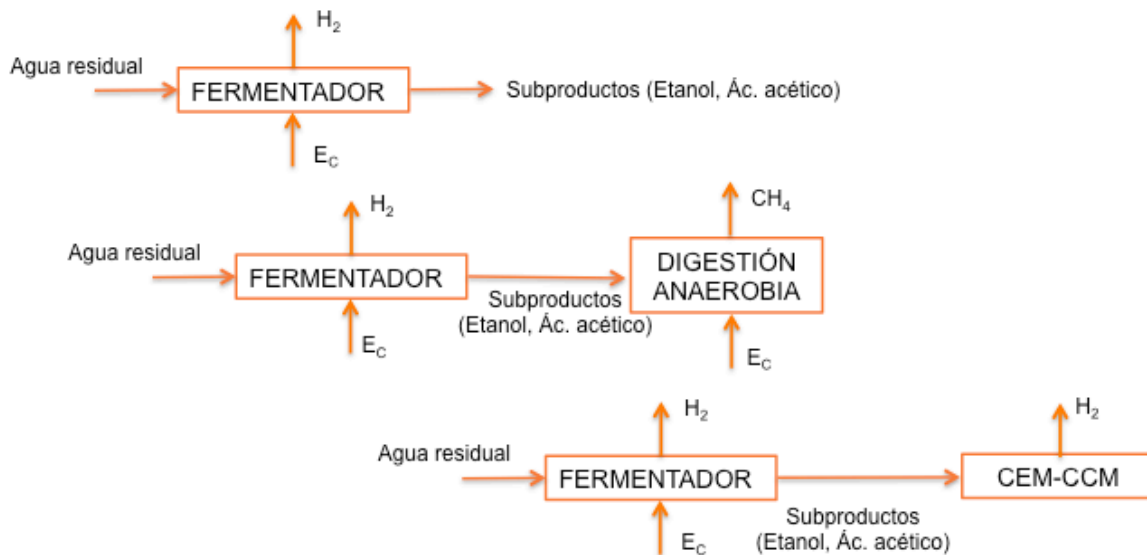


Figura 5.30. Diferentes configuraciones utilizadas para la producción de hidrógeno. (E_C = Energía consumida)

Tabla 5.2. Balance global energético en tres sistemas diferentes de producción de hidrógeno.

	FERMENTADOR	FERMENTADOR-DA	FERMENTADOR-CEM-CCM
Energía Recuperada (KJ)	2.68	4.96	5.14
Energía Consumida (KJ)	4.20	4.20	4.20
Energía Neta (KJ)	-1.52	0.76	0.94

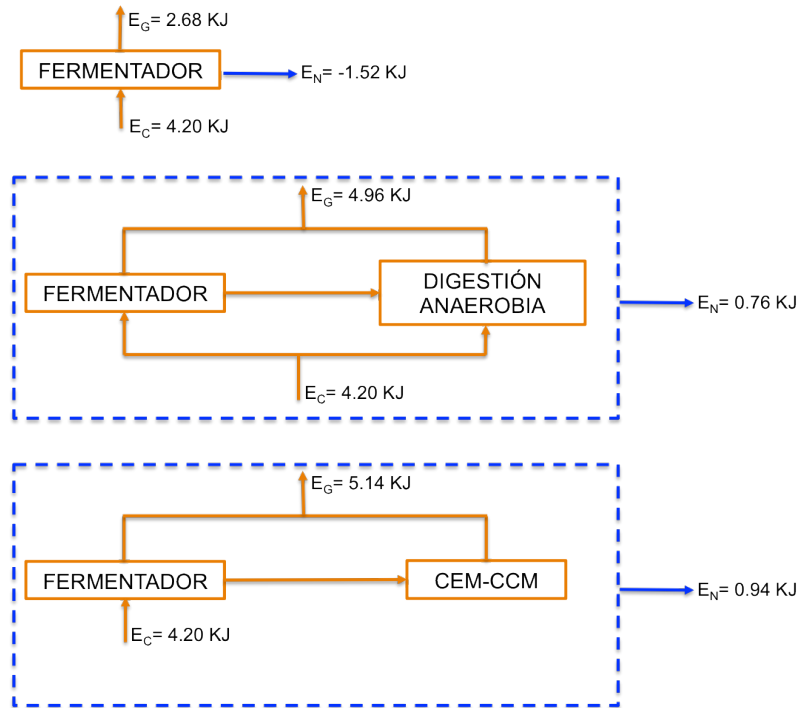


Figura 5.31. Esquema representativo del balance global energético para cada uno de los escenarios analizados. (E_c = Energía consumida; E_g = Energía Recuperada; E_n = Energía Neta)

5.3.2. PUESTA EN MARCHA Y OPERACIÓN DEL SISTEMA ACOPLADO

Durante esta fase experimental se realizaron pruebas utilizando el efluente de un fermentador que se encontraba en operación en el LIPATA, las características y condiciones de operación fueron descritas en la parte de metodología. Para realizar las pruebas se utilizaron dos CEMs previamente inoculadas con agua residual, operando como CCMs. Durante la operación como CCMs, las celdas alcanzaron un voltaje promedio de 273 V, una densidad de corriente de 2.902 A/m², una densidad de potencia de 0.803 W/m², una remoción de materia orgánica medida como DQO del 81.9% y una eficiencia coulombica de 23.20%. Al generarse un voltaje estable (es decir, cuando se alcanzó un voltaje máximo constante durante varios ciclos de operación) en las celdas se consideró que se encontraban inoculadas y se cambió su modo de operación de una CCM a una CEM.

Para corroborar la formación de una biopelícula adherida al ánodo de las celdas, se realizaron

pruebas utilizando un potenciostato (Biologic, Modelo VSP/Z-01, Science Instruments). La técnica utilizada fue voltamperometría cíclica.

En la Figura 5.32 se presenta una imagen con los resultados obtenidos de la prueba de voltamperometría cíclica en dirección anódica durante diferentes etapas del periodo de formación de la biopelícula electroactiva. Al inicio de la formación de la biopelícula (línea azul), el voltamperograma no mostró picos de oxidación ni de reducción, sin embargo, una onda de corriente oxidativa fue observada iniciando en un potencial de 0.5 V vs Ag/AgCl, NaCl sat. Dicha corriente aumentó paulatinamente hasta 0.08 mA y permaneció constante hasta el límite anódico del voltamperograma (+1.0 V vs Ag/AgCl, NaCl sat.).

Transcurridos 6 días del periodo de formación de biopelícula electroactiva (línea roja), el potencial de inicio de corriente oxidativa se desplazó hacia un potencial negativo, tal como se espera en la formación de bioánodos. La corriente oxidativa provocada por la oxidación del sustrato inició en un potencial de 0.45 V vs Ag/AgCl, NaCl sat.; formando una onda de corriente pronunciada indicativa de la actividad catalítica de la biopelícula adherida al ánodo. La corriente de oxidación aumentó hasta 0.6 mA en el límite anódico del voltamperograma.

El voltamperograma realizado al final del periodo de formación de la biopelícula (11 d, línea verde), indica un inicio de corriente oxidativa en -0.5 V, el pico de oxidación del sustrato está bien definido en comparación del voltamperograma realizado a los 6 días; sin embargo, la corriente oxidativa alcanzada es menor, posiblemente por una menor concentración de sustrato disponible.

El pico de oxidación en este voltamperograma se encontró en +0.150 V vs Ag/AgCl, NaCl sat. Con una corriente oxidativa de 0.3 mA. Este pico de oxidación posiblemente estuvo asociado a un pico de reducción posicionado en -0.3 V vs Ag/AgCl, NaCl sat. con una corriente reductiva de -0.04 mA. El potencial de separación entre ambos picos fue de $(0.15 - (-0.3))$ 0.45 V.

El desplazamiento del potencial de inicio de corriente oxidativa a valores negativos confirma la formación de un bioánodo. El aumento en la corriente señala la actividad electrocatalítica de la biopelícula para oxidar el sustrato presente, dicha corriente fue afectada por la disponibilidad de sustrato. Por lo tanto, se consideró que un periodo de 11 días fue adecuado para formar la biopelícula electroactiva y realizar las pruebas posteriores con las CEMs.

A continuación se muestran los resultados obtenidos durante los ciclos de operación de las CEMs. En los primeros dos ciclos se utilizó una mezcla de efluente de fermentador y buffer de fosfatos con nutrientes 100 mM, en una relación 50:50, como solución anódica. Posteriormente en los ciclos 3 y 4 se adicionó el efluente de fermentación al 100%. En estos cuatro ciclos de operación el voltaje requerido para llevar a cabo las reacciones de óxido-reducción en las celdas fue suministrado mediante una fuente de poder.

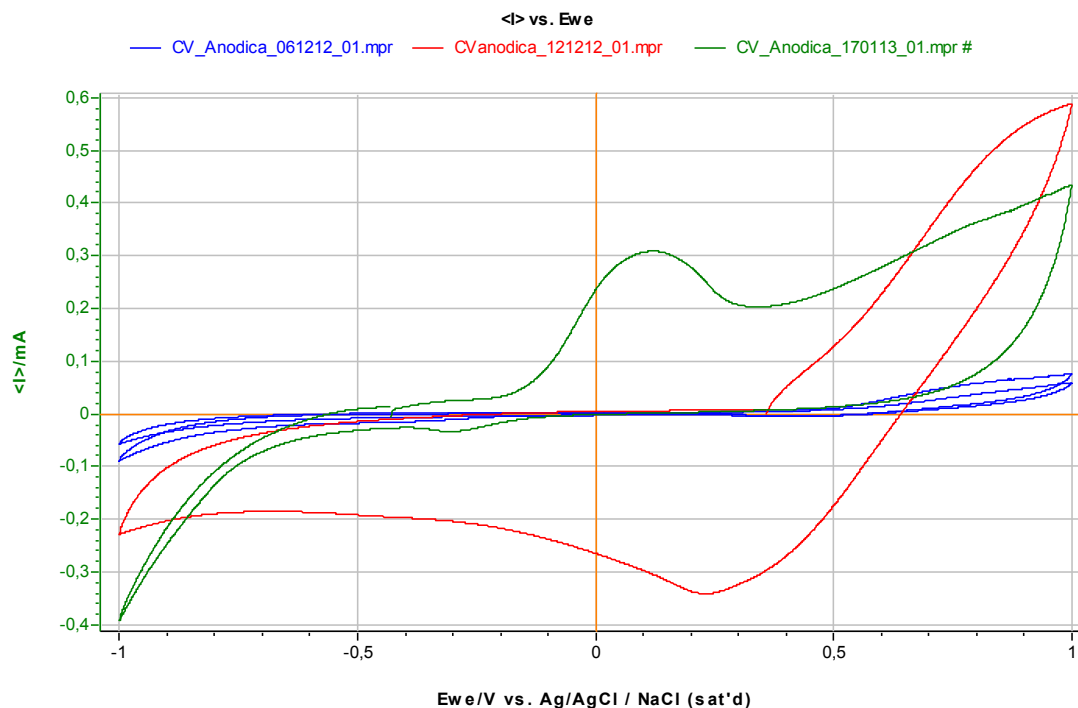


Figura 5.32. Voltamperometría cíclica en dirección anódica de una de las CEMs inoculadas; la línea azul corresponde al inicio de la inoculación; la línea roja hace referencia a un punto intermedio del periodo de inoculación; la línea verde se obtuvo al final del periodo de inoculación.

Durante los ciclos 5 y 6, se adicionó nuevamente el efluente utilizando una relación 50:50, debido a que al utilizar el efluente en una concentración al 100% se observó que el medio tiende a acidificarse hasta un valor de pH de 4.5, estas condiciones de acidez pueden generar daños irreversibles en las bacterias si no se controlan a tiempo, por ello la necesidad de utilizar buffer de fosfatos mezclado con el efluente del fermentador. La energía requerida por la CEM1 fue suministrada utilizando una CCM de dos cámaras con solución anódica de agua residual y en la CEM2 el voltaje fue suministrado por medio de una fuente de poder.

Finalmente, durante los ciclos 7 y 8, se adicionó el efluente al 100%. El voltaje requerido por la CEM1 fue suministrado utilizando una CCM, mientras que para la CEM2 el voltaje fue suministrado utilizando una fuente de poder. Esto se hizo con la finalidad de comparar el funcionamiento de las celdas cuando se suministraba un voltaje fijo (con fuente de poder, 0.8V) y un voltaje variable (CCM).

En la Tabla 5.3 se encuentran registradas las concentraciones promedio de los ácidos grasos presentes en el efluente del fermentador para cada uno de los ciclos de operación y en la Tabla 5.4 se registran los resultados de la operación de la CCM que se utilizó para adicionar el voltaje a la CEM. Los últimos cuatro ciclos registrados corresponden a los resultados obtenidos cuando la CCM y la CEM se encontraban conectadas.

De acuerdo a los datos mostrados en la Tabla 5.3, se observó que el efluente del fermentador estuvo compuesto principalmente por ácido acético y butírico y pequeñas cantidades de propiónico. Las concentraciones variaron en cada ciclo dependiendo de la operación del reactor SBR. En cuanto a los voltajes generados por la CCM, éstos fueron en aumento conforme se estabilizó la operación de la celda. Es importante mencionar que de acuerdo a las reacciones de semicelda que se llevan a cabo tanto en la CEM como en la CCM, el voltaje producido por la CCM no sería suficiente para permitir que ocurran las reacciones en la CEM, por lo cual se tiene la teoría de que en la CCM se está generando algún otro gas que permite obtener una cantidad adicional de voltaje con el cual se logran llevar a cabo las reacciones de óxido-reducción en la CEM.

Tabla 5.3. Concentraciones promedio en mg/L de los ácidos grasos presentes en el efluente del fermentador.

CICLO	ACÉTICO	PROPIÓNICO	ISOBUTÍRICO	BUTÍRICO	ISOVALÉRICO
1	2729	78	42	690	0
2	2159	121	52	1957	53
3	1053	286	24	2438	0
4	850	397	0	4407	0
5	588	263	0	2002	0
6	467	218	0	2408	291
7	931	466	0	4248	398
8	722	315	0	2800	887

Tabla 5.4. Resultados de la operación de la CCM utilizada para adicionar el voltaje a la CEM1.

CICLO	VOLTAJE (mV)	DC (A/m ²)	DP (W/m ²)	EC (%)
1	173	2.51	0.42	21.55
2	162	2.35	0.38	18.32
3	104	1.51	0.15	29.51
4	144	2.08	0.29	30.02
5	356	2.53	0.90	25.03
6	411	2.92	1.20	32.41
7	273	3.95	1.08	27.90
8	244	3.53	0.86	21.03

5.3.3. REMOCIÓN DE MATERIA ORGÁNICA MEDIDA COMO DQO

En la Figura 5.33 se encuentran registrados los resultados obtenidos en cuanto a remoción de materia orgánica durante los diferentes ciclos de operación de las CEMs. En el caso de la CEM1 se obtuvieron mejores remociones utilizando la mezcla 50:50 y en particular la máxima remoción se registró en el ciclo 6 durante el cual se utilizó el sistema acoplado CEM-CCM con un valor de hasta un 93% aproximadamente. Para la CEM2, las remociones fueron similares utilizando la mezcla 50:50 de Efluente:Buffer y el efluente al 100%, en este caso la máxima remoción de materia orgánica fue de 88% durante el ciclo 4.

Al comparar los porcentajes de remoción de materia orgánica en la CEM1 y CEM2 durante los dos últimos ciclos de operación, se observó que el aplicar el voltaje mediante una fuente fija o una fuente variable no presenta un efecto significativo en el compartimento de las celdas en la medición de este parámetro, ya que, durante el ciclo 7 el mejor porcentaje de remoción se presentó en la celda operada con la fuente de poder (con un valor del 50%), mientras que en el ciclo 8, el mejor porcentaje de remoción se registró en el sistema acoplado CEM-CCM con un valor del 53%.

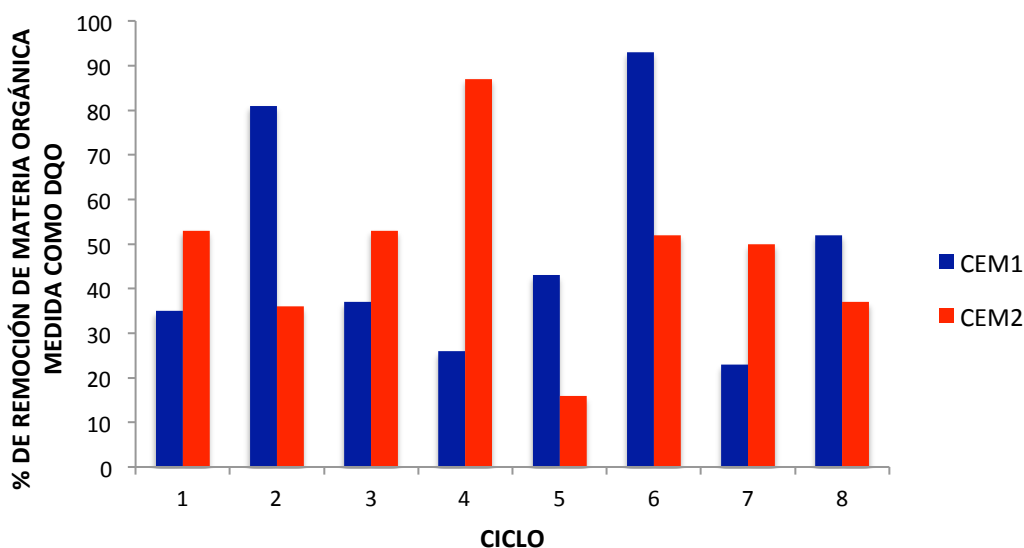


Figura 5.33. Porcentaje de remoción de materia orgánica medida como DQO durante las pruebas realizadas con el efluente de un fermentador.

5.3.4. CONSUMO DE ÁCIDOS GRASOS VOLÁTILES EN LAS MEZCLAS

Se midieron las concentraciones de ácidos en el influente y efluente de las celdas en cada uno de los ciclos de operación. En la Figura 5.34 se muestran los resultados correspondientes a las concentraciones medidas de ácido acético. Las concentraciones del influente variaron de 600 a 2700 mg/L; mientras que, las concentraciones del efluente se encontraron en un rango de 200 a 1800 mg/L. En la mayoría de los ciclos se registró una disminución en la concentración de este ácido, con excepción de los ciclos 5 y 8, en donde se observó que los valores fueron similares en el ciclo 5 y durante el ciclo 8 hubo un aumento en la concentración. Este aumento muy probablemente debido a la formación de una cantidad adicional por las reacciones metabólicas de los microorganismos adheridos al ánodo de las celdas y los microorganismos que se encontraban en suspensión, los cuales pudieron haber aprovechado al ácido butírico y propiónico para generar acético (*Anderson et al., 1987; Freguia et al., 2010*). En general las remociones fueron mejores en la CEM2 en comparación con la CEM1.

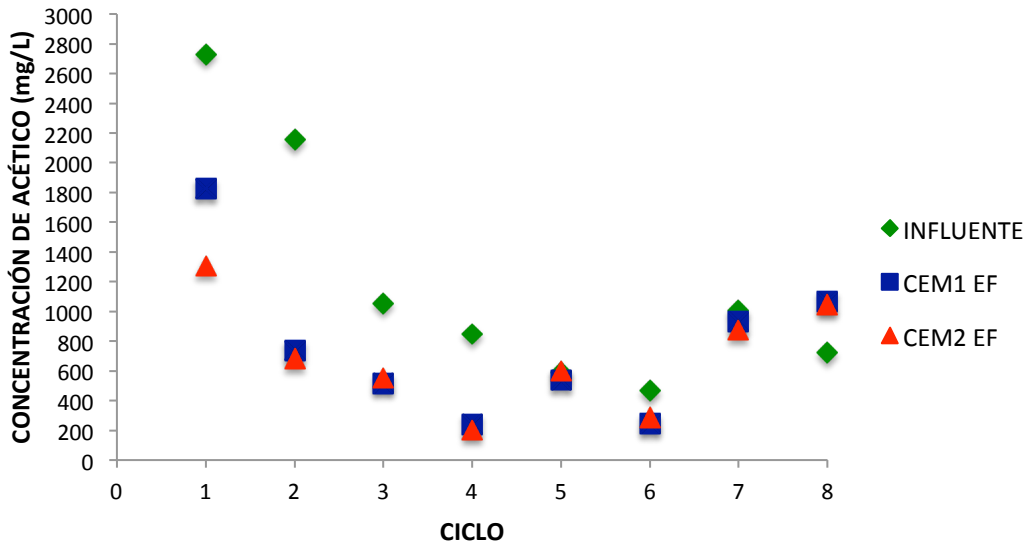


Figura 5.34. Concentraciones medidas de ácido acético en el influente y efluente de las CEMs.

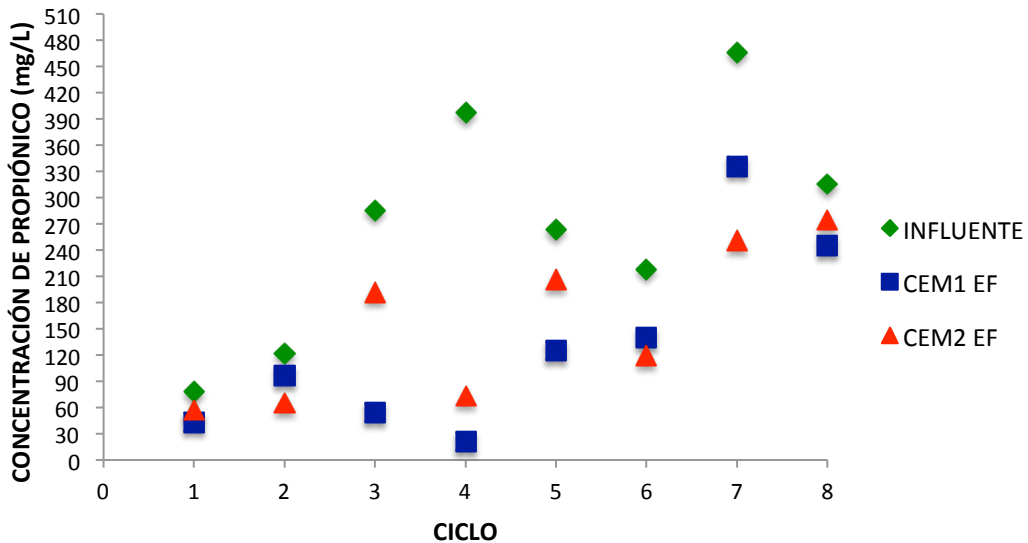


Figura 5.35. Concentraciones medidas de ácido propiónico en el influente y efluente de las CEMs.

Para el ácido propiónico las concentraciones en el influente fueron de 80 a 470 mg/L y en el efluente de 25 mg/L a 330 mg/L (Figura 5.35). En este caso se observó que durante todos los ciclos de operación de las celdas, este ácido fue removido con un porcentaje promedio del 50%, siendo mejores las remociones obtenidas en la CEM1. Únicamente se detectó la presencia de ácido isobutírico durante los tres primeros ciclos de operación de las celdas (Figura 5.36); sin embargo, las concentraciones fueron muy bajas y este ácido fue consumido en su totalidad durante el tratamiento en ambas CEMs.

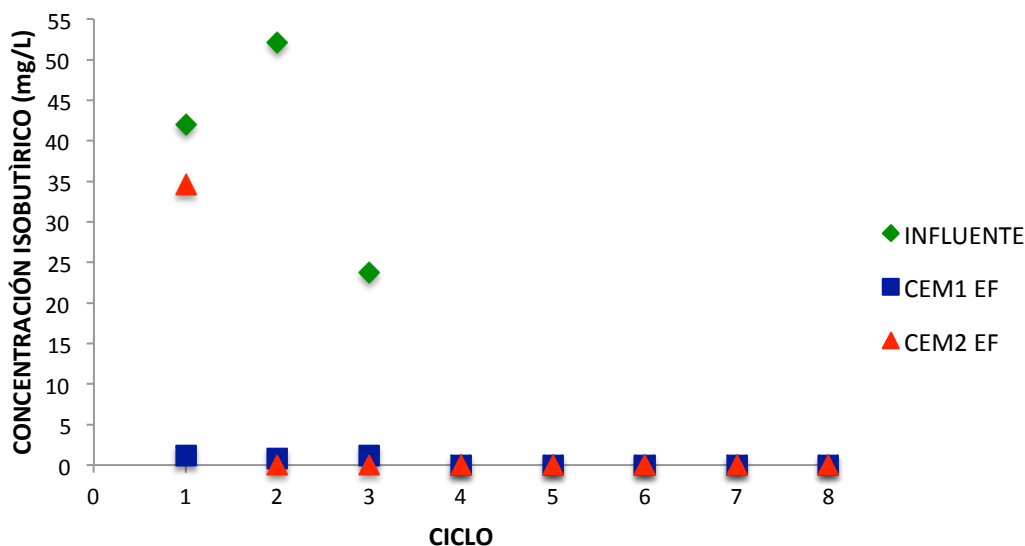


Figura 5.36. Concentraciones medidas de ácido isobutírico en el influente y efluente de las CEMs.

En el caso del ácido butírico, este fue uno de los ácidos que se encontró presente en el efluente del fermentador en altas concentraciones (al igual que el ácido acético), la concentración máxima registrada en el influente durante los diferentes ciclos de operación fue de 4400 mg/L y la mínima de 700 mg/L (Figura 5.37). En el efluente las concentraciones fueron de 100 a 2800 mg/L. Este ácido también se removió durante todos los ciclos de operación de las celdas, con un promedio del 51%, con mejores remociones en la CEM1. Finalmente, se detectó la presencia de ácido isovalérico con concentraciones en el influente de 20 a 900 mg/L y en el efluente de 30 a 570 mg/L (Figura 5.38). En este caso también se registraron algunos ciclos en los que hubo aumento en la concentración del efluente de ambas celdas.

En conclusión, durante el tratamiento se removieron la mayoría de los ácidos presentes en el efluente del fermentador, siendo los que presentan mayores porcentajes de remoción el ácido propiónico (50% en promedio), butírico (51% en promedio) e isobutírico (99%), seguido del ácido acético (41% en promedio) y por último isovalérico (en la mayoría de los ciclos hubo aumento en su concentración). Únicamente se observó un aumento en la concentración del efluente de las CEMs del ácido isovalérico y acético, indicativo de la formación de ambos ácidos por los procesos metabólicos llevados a cabo por los microorganismos adheridos y en suspensión en el ánodo de las mismas. En estudios previos en los cuales se utilizó el efluente de un fermentador productor de hidrógeno y lixiviados obtenidos a partir de los lodos de desecho de un proceso de lodos activados, se observó que el ácido acético es consumido fácilmente con remociones de hasta un 90% seguido por el ácido propiónico, n-butírico y n- e iso- valérico. El iso-butírico fue el último compuesto degradado con remociones menores al 20% en todas las pruebas (Liu *et al.*, 2012; Lu *et al.*, 2009). Sin embargo, en este estudio, se observó una mayor afinidad de los microorganismos por el ácido propiónico, butírico e isobutírico, lo cual demuestra que un factor importante para la

utilización de estos ácidos es el inóculo y tipo de microorganismos electroactivos que se desarrollen en la superficie del ánodo de las CEMs.

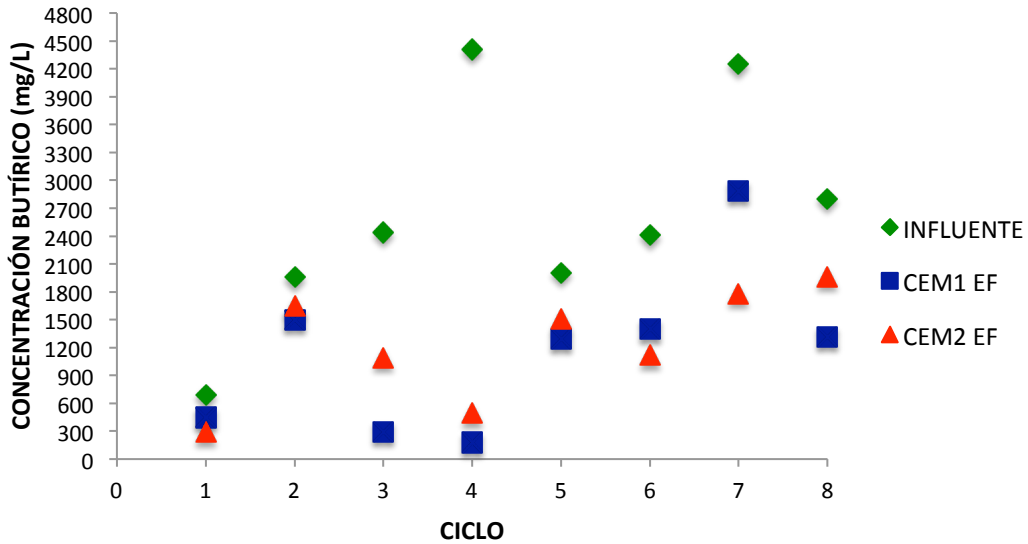


Figura 5.37. Concentraciones medidas de ácido butírico en el influente y efluente de las CEMs.

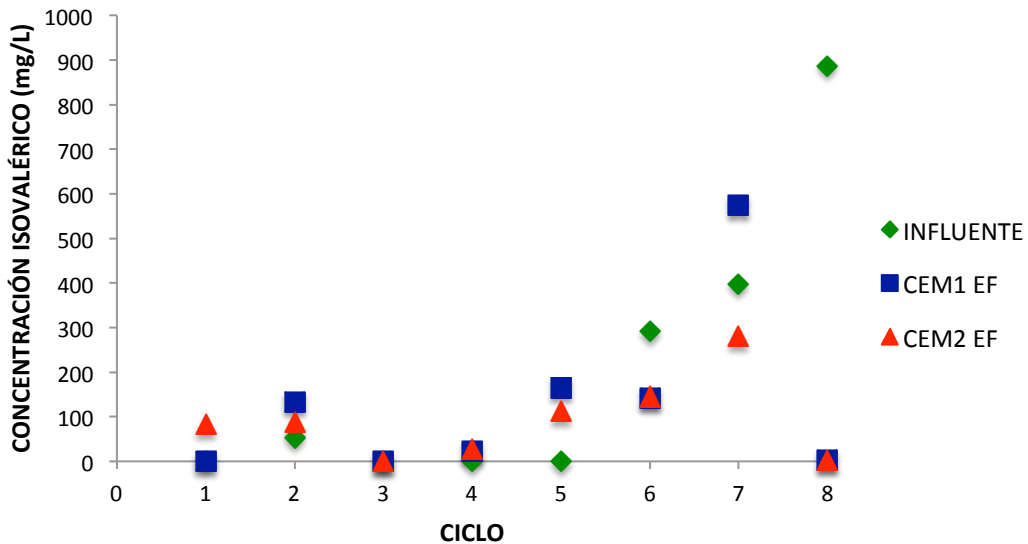


Figura 5.38. Concentraciones medidas de ácido isovalérico en el influente y efluente de las CEMs.

5.3.5. DENSIDAD DE CORRIENTE, EFICIENCIA COULÓMBICA Y PORCENTAJE TOTAL DE HIDRÓGENO RECUPERADO

En cuanto al comportamiento de la densidad de corriente obtenida durante los diferentes ciclos de operación, los mejores resultados se presentaron cuando se utilizó una mezcla de Efluente:Buffer 50:50 (Figura 5.39, ciclos 1 y 2) con un valor máximo de 4 A/m². Al comparar las

densidades de corriente de los ciclos 1 y 2 en donde las CEMs fueron alimentadas con la mezcla Efluente:Buffer 50:50 y el voltaje fue aplicado por medio de una fuente de poder, con los ciclos 5 y 6 en los cuales se utilizó la misma mezcla Buffer:Efluente 50:50 pero adicionando el voltaje por medio de la CCM, los resultados fueron mejores utilizando la fuente de poder.

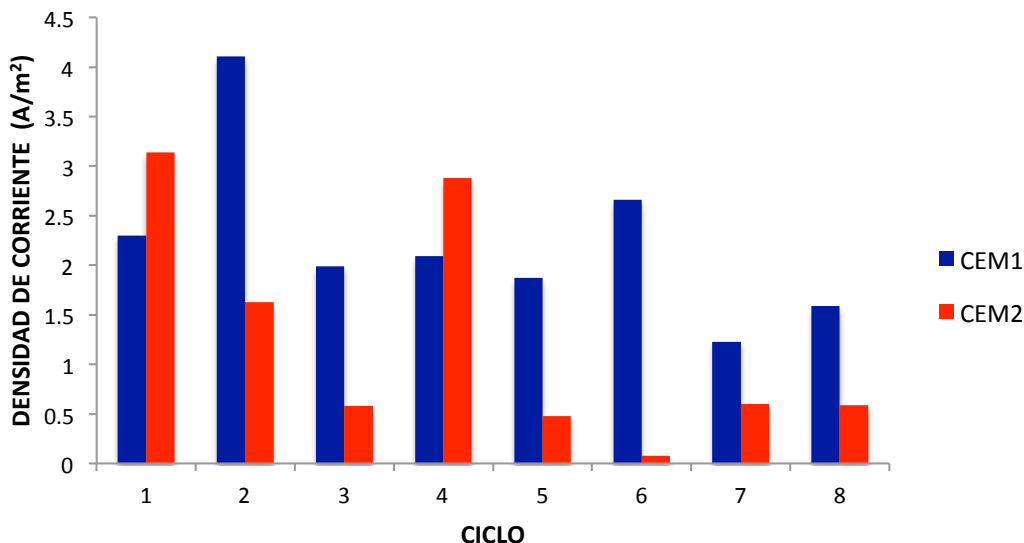


Figura 5.39. Densidad de corriente en A/m² durante las pruebas con el efluente del fermentador.

Sin embargo, al realizar la comparación entre la CEM1 y la CEM2 cuando se utilizó el efluente al 100%, pero en el primer caso (CEM1) se acopló el sistema CEM-CCM y en el segundo (CEM2) se utilizó una fuente de poder (ciclos 7 y 8), los resultados mostraron que la densidad de corriente fue mejor utilizando el sistema acoplado CEM-CCM (1.5 A/m² en la CEM1 y 0.6 A/m² en la CEM2). Con esto queda comprobado que el sistema acoplado funcionó de manera adecuada y la eficiencia de la CEM depende más bien de la concentración a la cual se adiciona el efluente del fermentador en la cámara anódica de la celda y no de la manera en la cual se adiciona el voltaje.

En pruebas realizadas utilizando un sistema acoplado CEM-CCM, en donde la CEM tenía una configuración similar a la utilizada durante esta investigación y la CCM tenía una configuración de una sola cámara, utilizando ácido acético o propiónico como sustrato, se obtuvieron densidades de corriente que oscilaron entre 59 a 404 mA/m² para el ácido acético y de 81 a 343 mA/m² para el ácido propiónico, las cuales son más bajas en comparación con las obtenidas durante este estudio (*Sun et al., 2008, 2009, 2010*). Esto corrobora nuevamente que el sistema CEM-CCM, es el adecuado para tratar el efluente del fermentador con la producción posterior de hidrógeno.

El comportamiento anterior también se observó cuando se calculó la eficiencia coulombica de las CEMs (Figura 5.40). Durante los ciclos de operación con la mezcla Efluente:Buffer 50:50 (ciclos 1, 2, 5 y 6) la máxima eficiencia coulombica fue de 42% en la CEM1 y 37% en la CEM2. Mientras que los valores cayeron hasta alrededor del 13% cuando se utilizó el efluente al 100% (ciclos 3, 4, 7 y 8). Al

comparar los resultados obtenidos en la CEM1 y CEM2 durante los ciclos 7 y 8, se comprueba nuevamente que el sistema acoplado CEM-CCM opera de manera adecuada, ya que las eficiencias coulombicas fueron mejores en este caso (con un valor promedio del 10%).

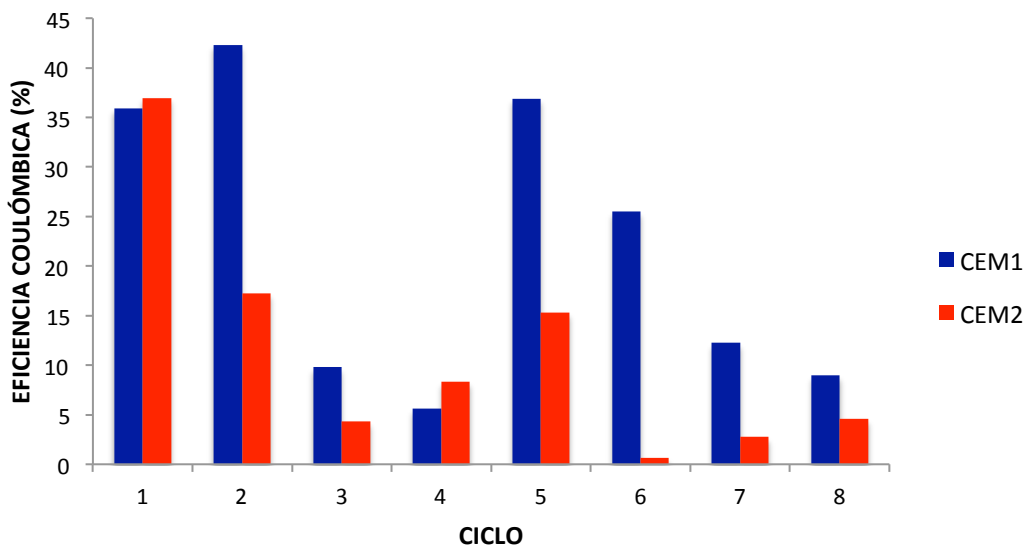


Figura 5.40. Eficiencia coulombica de las CEMs durante las pruebas con el efluente del fermentador.

Con respecto al porcentaje total de hidrógeno recuperado en el cátodo de las CEMs, el cual resulta de dividir el número de moles de hidrógeno producidos en el cátodo de las celdas entre el número de moles teóricos esperados del mismo, nuevamente los resultados fueron mejores durante los ciclos en los que se adicionó la mezcla Efluente:Buffer. El máximo porcentaje obtenido fue del 21% en la CEM1, mientras que el mínimo observado fue de alrededor del 1% en la CEM2 durante el ciclo 6 de operación (conexión CCM-CEM) (Figura 5.41). Las diferencias fueron significativas al utilizar la mezcla Efluente:Buffer en comparación con el efluente al 100%. La composición de los gases en la cámara anódica de la CEM1 fue del 35% H₂, 18% CH₄ y 47% CO₂, mientras que en la cámara catódica fue del 56% H₂, 8% CH₄ y 36% CO₂. Para la CEM2 las composiciones de los gases en la cámara anódica fueron del 13% H₂, 5% CH₄ y 82% CO₂, mientras que en la cámara catódica el biogás estuvo compuesto en un 75% de H₂, y 25% de CO₂, sin detectarse la presencia de metano.

Cuando se adiciona únicamente el efluente de fermentación como solución anódica, el medio tiende a acidificarse, lo cual influye en el funcionamiento de la membrana de intercambio iónico utilizada para separar las cámaras de la celda. Además, esta disminución del pH puede ocasionar un daño en las bacterias anodofílicas, llegando a ser irreversible si este parámetro no se controla adecuadamente (Lu *et al.*, 2009). El prevenir la acidificación del medio resulta importante para mantener un nivel adecuado de actividad de los microorganismos exoelectrogénicos.

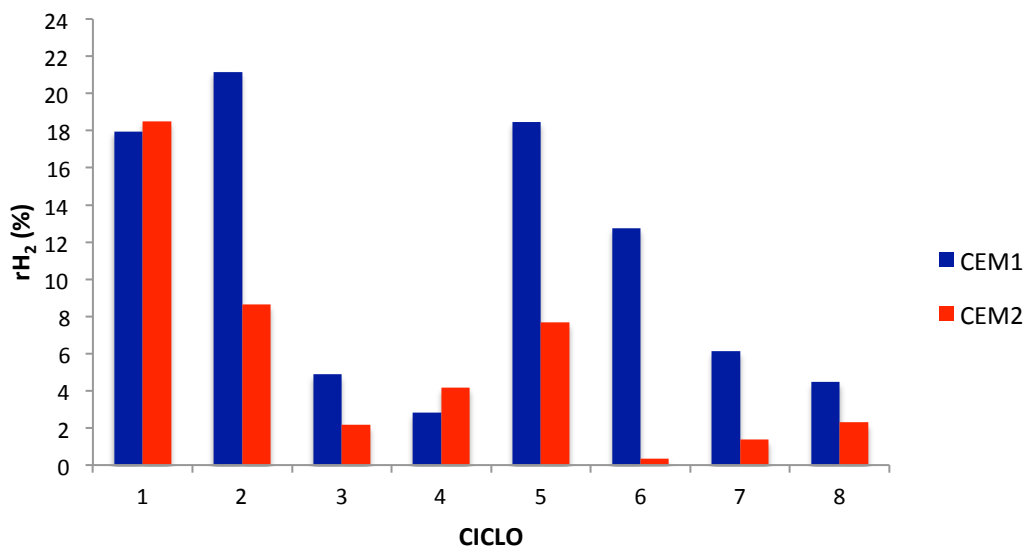


Figura 5.41. Porcentaje total de recuperación de hidrógeno en las CEMs medido en cada uno de los ciclos de operación.

En el caso del sistema acoplado CEM-CCM, los porcentajes de recuperación de hidrógeno también fueron mejores cuando se utilizó la mezcla Efluente:Buffer 50:50 (ciclos 5 y 6, CEM1) en comparación con los resultados obtenidos al utilizar el efluente al 100% (ciclo 7 y 8, CEM1), con lo cual nuevamente se comprueba que el funcionamiento de las celdas es mejor al utilizar una solución buffer para regular el pH en la cámara anódica de la celda y que puede utilizarse el sistema acoplado CEM-CCM para la generación de hidrógeno.

5.3.6. TASAS DE PRODUCCIÓN Y RENDIMIENTO DE HIDRÓGENO

Finalmente se reportan los datos obtenidos en cuanto a las tasas de rendimiento y de producción de las CEMs durante las diferentes condiciones de operación manejadas. Las mejores tasas de rendimiento de hidrógeno se observaron durante los ciclos 1, 2, 5 y 6 con valores que oscilaron entre los 13 $\text{mmolH}_2/\text{gDQO}_{\text{rem}}$ y 8 $\text{mmolH}_2/\text{gDQO}_{\text{rem}}$ (Figura 5.42), aquí fue en donde se utilizó una mezcla de buffer de fosfatos con efluente del fermentador en una relación 50:50, y las más bajas se registraron en los ciclos 3, 4, 7 y 8 con valores entre 4 $\text{mmolH}_2/\text{gDQO}_{\text{rem}}$ y 2 $\text{mmolH}_2/\text{gDQO}_{\text{rem}}$, esto fue cuando se utilizó únicamente el efluente del fermentador como sustrato. Así mismo, las mejores producciones de hidrógeno se encontraron durante los ciclos 5 y 6 con valores de 410 $\text{mL/d/L}_{\text{reactor}}$ y 470 $\text{mL/d/L}_{\text{reactor}}$, respectivamente, utilizando la mezcla de buffer de fosfatos con efluente de fermentador y adicionando el voltaje por medio de la CCM, mientras que las más bajas se registraron en los ciclos 7 y 8 con valores de 110 $\text{mL/d/L}_{\text{reactor}}$ y 140 $\text{mL/d/L}_{\text{reactor}}$, respectivamente (Figura 5.43), utilizando únicamente el efluente del fermentador y suministrando el voltaje por medio de una fuente de poder.

Con esto queda demostrado que las mejores condiciones operacionales de las CEMs se obtienen cuando se utiliza la mezcla de buffer de fosfatos con efluente de fermentador, ya que se regulan adecuadamente las variaciones de pH, evitando algún efecto inhibitorio en el crecimiento y funciones metabólicas de los microorganismos y ayudando a que la membrana de intercambio catiónica funcione adecuadamente y, cuando se utiliza el sistema acoplado CEM-CCM.

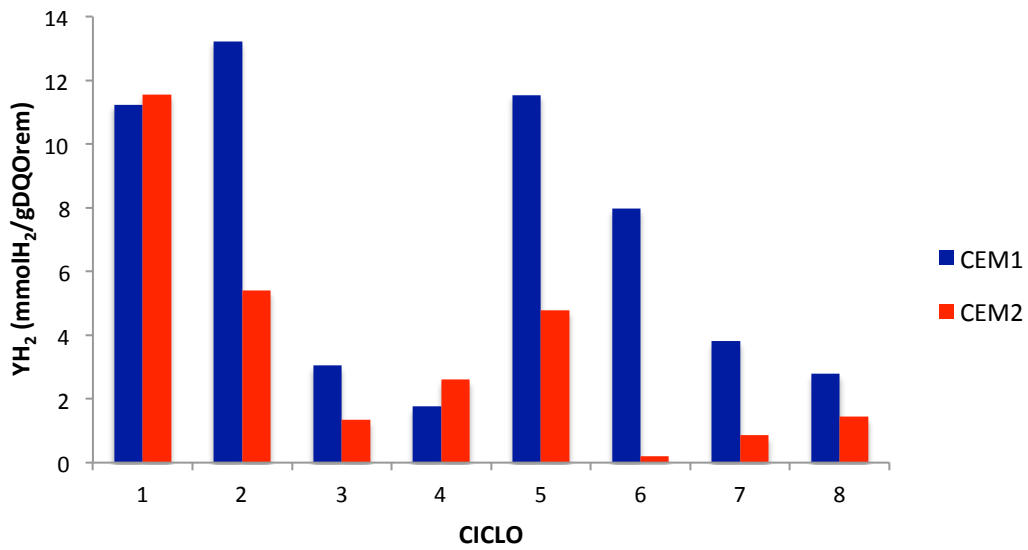


Figura 5.42. Tasa de rendimiento en mmolH₂/gDQO_{rem} obtenidas en las pruebas con el efluente del fermentador.

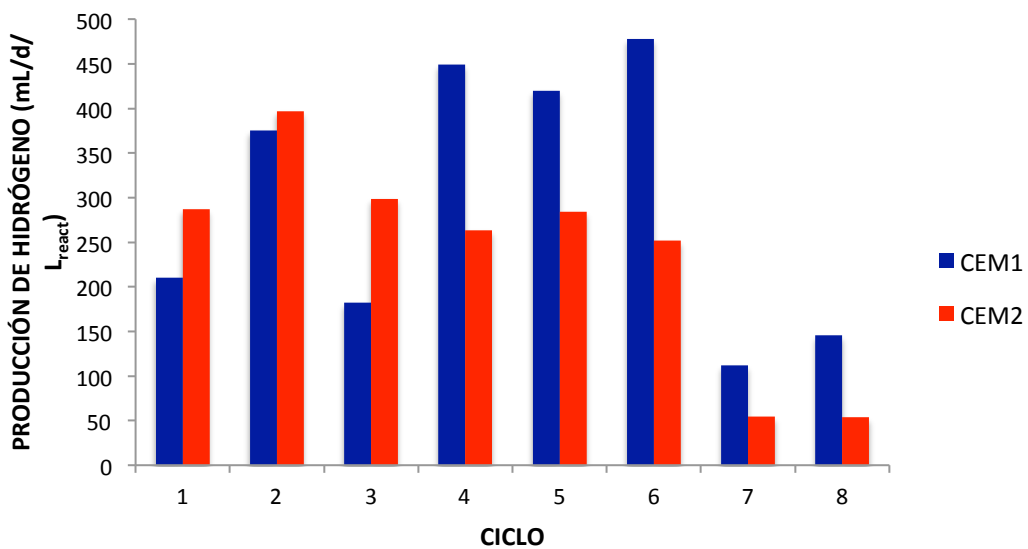


Figura 5.43. Producción de hidrógeno en mL/d/L_{reactor} durante las pruebas realizadas con el efluente de un fermentador.

Cheng et al. (2007 a) obtuvieron tasas de producción de hidrógeno de alrededor de 1500 mL/d/L_{reactor} utilizando un ánodo de grafito granular con un área específica de 1320 m²/m³ de volumen de solución anódica con acetato como sustrato y aplicando un voltaje de 0.8 V. Call y Logan (2008), reportaron una máxima tasa de producción de hidrógeno de 3120 mL/d/L_{reactor} con un voltaje aplicado de 0.8 V en un sistema de una sola cámara con un ánodo de cepillo de grafito de 0.22 m² en un reactor de 28 mL. Estas diferencias pueden deberse a la configuración utilizada y a que en un sistema convencional de CEM, la producción de hidrógeno puede mejorarse al aumentar el voltaje aplicado a la celda. Sin embargo, en un sistema acoplado el voltaje adicionado dependerá de la producción del mismo en la CCM, por lo cual, el voltaje adicionado a la CEM se encuentra limitado al máximo valor producido por la CCM. Cabe señalar que los resultados durante esta investigación fueron mejores en comparación con los obtenidos por Sun et al. (2008, 2009, 2010) utilizando ácido acético o propiónico como sustratos de manera individual. Esto demuestra que es posible mejorar las producciones de hidrógeno aún cuando se utiliza como fuente de sustrato materia orgánica compleja (como por ejemplo el efluente de un fermentador).

Durante algunos ciclos de operación de las CEMs se detectó la presencia de metano en la cámara anódica de las mismas (alrededor de un 18% en la CEM1 y 5% en la CEM2), por lo cual se adicionó BES en una concentración 50 mM para tratar de inhibir la actividad de las arqueobacterias metanogénicas y con ello mejorar las tasas de rendimiento de los sistemas; sin embargo, aún con esto se siguió detectando metano en un porcentaje menor. Por lo cual, se recomienda buscar un método efectivo que permita la inhibición completa de las arqueobacterias metanogénicas desde el proceso de inoculación del ánodo de las CEMs para con ello mejorar el funcionamiento de los sistemas.

De acuerdo a los resultados obtenidos durante esta última etapa experimental, se observó que las CEMs pueden ser utilizadas como sistema de post tratamiento del efluente de un fermentador. Los mejores resultados se registraron cuando la CEM se operó utilizando una mezcla de efluente y buffer de fosfatos con nutrientes en una relación 50:50, debido a que de esta manera pueden regularse adecuadamente las variaciones de pH y con ello evitarse problemas en el funcionamiento de la membrana de intercambio y posibles daños a la microbiota presente en el ánodo de las celdas. Sin embargo, el utilizar un efluente con buffer no resultaría práctico a nivel industrial, por lo cual se requieren algunas mejoras en el proceso, como por ejemplo, el desarrollar un consorcio anodofílico que sea capaz de tolerar pH ácidos en el medio. Con base en algunos estudios realizados en CCMs, se ha observado que puede llegar a generarse electricidad bajo condiciones anodofílicas a pH de 5.5 utilizando un consorcio mixto enriquecido (Mohan et al., 2008) y a pH 5.0 utilizando como inóculo lodo anaerobio (He et al., 2008). Otra opción viable podría ser el utilizar bicarbonato como solución buffer en lugar de fosfato (Fan et al., 2007). Una ventaja más de operar las CEM a pH bajos sería el evitar el desarrollo de arqueobacterias metanogénicas en la superficie del ánodo.

Además, se comprobó que al utilizar una CCM se puede adicionar el voltaje necesario para llevar a cabo los procesos de óxido-reducción en la CEM. Los resultados obtenidos utilizando el sistema acoplado fueron comparables con los registrados utilizando una fuente de poder como suministro de energía para las CEM, e inclusive, fueron mejores en algunos casos.

El controlar e inhibir la formación de metano en el ánodo de las celdas resultó más difícil al utilizar el efluente del fermentador en comparación con un agua residual sintética, en donde no se observó la presencia de este gas, por lo cual será necesaria la búsqueda de un tratamiento que evite el crecimiento de las arqueobacterias metanogénicas desde el momento de realizar la inoculación de los ánodos de las CEMs y permita la selección y formación de una biopelícula con bacterias específicas productoras de hidrógeno. De esta manera, se verá beneficiada la eficiencia de las CEMs.

En un sistema acoplado CEM-CCM se llevan a cabo cuatro reacciones de media celda, las cuales son: a) oxidación del sustrato en el ánodo de ambas celdas; b) reducción de oxígeno en el cátodo de la CCM y; c) reducción de protones en el cátodo de las CEMs. Estas cuatro reacciones se ven afectadas entre ellas y por lo tanto se requiere el llegar a un balance de las mismas para lograr la estabilidad en el funcionamiento del sistema. Bajo las condiciones de estabilidad, los protones necesarios para la reducción del oxígeno provienen de la oxidación del sustrato en la CCM y electrones de la CEM. Por otra parte, los protones necesarios para la producción de hidrógeno provienen de la CEM, mientras que los electrones provienen de la CCM. Por lo tanto, un parámetro importante a considerar es el generar una corriente constante en el circuito que permita que el flujo de electrones de la CCM sea el mismo que aquel presente en la CEM, con lo cual se pueda maximizar la producción de hidrógeno. Esto puede lograrse al utilizar una resistencia externa adecuada para conectar la CEM con la CCM o aumentando el voltaje aplicado a la CEM por medio de la conexión de varias CCMs en paralelo. Otras opciones viables consisten en la utilización de un convertidor de corriente directa que permita aumentar el voltaje aplicado a la CEM o el alternar múltiples CCMs que produzcan altos voltajes de manera intermitente.

CAPÍTULO 6

CONCLUSIONES GENERALES

Durante este proyecto de investigación se evaluó el desempeño de celdas electroquímicas microbianas alimentadas con los productos de la fermentación de aguas residuales utilizado para la remoción de materia orgánica y la producción simultánea de hidrógeno. Para ello se realizaron pruebas utilizando una mezcla de ácido acético y propiónico, con el objeto de evaluar su efecto en la producción de hidrógeno y dinámica poblacional de las CEMs. Posteriormente se utilizaron mezclas de ácido acético, propiónico y butírico, para conocer el efecto de cada uno de estos ácidos en el funcionamiento de las CEMs. Finalmente se utilizó el efluente de un fermentador como fuente de sustrato y se realizó el acoplamiento de un sistema CEM-CCM.

Como primer objetivo se identificaron los parámetros que afectan el desempeño de las celdas electroquímicas microbianas y celdas de combustible microbianas, encontrando que la configuración de las celdas, los materiales utilizados para su construcción, el sustrato, el voltaje aplicado y el inóculo que se utiliza para colonizar el ánodo de las celdas, juegan un papel importante en el desempeño de las mismas.

Posteriormente se diseñó un prototipo de celda electroquímica y celda de combustible microbiana a utilizar durante los diferentes experimentos. Se optó por una celda de doble cámara, con electrodos de papel carbón y papel carbón con platino, conectados por alambre de titanio. Con base en las pruebas preliminares realizadas, se hicieron algunas modificaciones en el diseño para lograr mejores resultados en las etapas experimentales.

Se evaluó el efecto que tenía el uso de una mezcla de ácido acético y ácido propiónico, con diferentes concentraciones, sobre la producción de hidrógeno y la dinámica poblacional de la Celda Electroquímica Microbiana, utilizando un Diseño Central Compuesto. De acuerdo a los resultados obtenidos, se encontró una máxima tasa de rendimiento de hidrógeno de $33.62 \text{ mmolH}_2/\text{gDQO}_{\text{rem}}$ y una máxima tasa de producción de hidrógeno de $265 \text{ mL/d/L}_{\text{reactor}}$ cuando se adicionó una mezcla de ácido acético en una concentración de 1500 mg/L y ácido propiónico de 250 mg/L como sustrato en la cámara anódica de las CEMs.

Tanto el ácido acético como el ácido propiónico fueron removidos eficientemente, con remociones del 62 al 92%, con lo cual se comprobó que el ácido propiónico puede ser aprovechado eficientemente por las bacterias anodofílicas para la producción de hidrógeno.

El análisis estadístico realizado demostró que la concentración a la que se adicionan éstos ácidos no tiene un efecto tan significativo en el funcionamiento de las CEMs como el que presentan el tipo de microorganismos que se encuentren adheridos en la biopelícula formada en la superficie del ánodo de las celdas y las condiciones de operación utilizadas en las mismas.

Al realizar el análisis microbiológico de las biopelículas adheridas al ánodo de las celdas, se comprobó que diferentes consorcios microbianos pueden desarrollarse dependiendo de las concentraciones de ácido acético y propiónico que se adicionen como sustrato a las CEMs. Así mismo, se demostró que el inóculo juega un papel determinante en el desarrollo de la microbiota

independientemente de los parámetros operacionales utilizados. La composición y diversidad de los consorcios microbianos pueden influir significativamente en las tasas de rendimiento y producción de hidrógeno de las CEMs, tal y como se observó en los resultados correspondientes a la parte operacional de las celdas.

Los principales filos identificados fueron las *Proteobacteria*, *Firmicutes* y *Bacteroidetes*, seguido de *Synergistetes* y *Tenericutes*. En todos los reactores, *Clostridiales* y *Bacteroidales* fueron los principales órdenes encontrados de *Firmicutes* y *Bacteroidetes*, respectivamente, y en el caso de las *Proteobacteria*, los *Rhodocyclales*, *Campylobacteriales*, *Desulfobacterales* y *Desulfovibrionales* fueron los órdenes más representativos durante las pruebas experimentales. A nivel de género *Arcobacter*, *Desulfomicrobium*, *Desulfobulbus*, *Pseudomonas*, *Macromonas* y *Azovibrio*, fueron los más representativos.

Se identificó la presencia de bacterias *homoacetogénicas* por medio de la cuantificación del gen *formil tetrahidrofolato sintetasa (FTHFS)* y además se cuantificó el número de copias de *Geobacter* presentes en el ánodo de las CEMs. De estos resultados se encontró que las muestras con el número de copias más alto de *homoacetogénicos* fueron también las que presentaron un mayor número de *Geobacter*, confirmando con ello la relación sintrófica existente entre ambas especies. Además, se detectaron *metanógenos hidrogenotróficos* y *acetoclásticos* en todas las muestras aún cuando se adicionó una solución de bromoetilsulfonato para inhibir su crecimiento, siendo la especie dominante *Methanosaetaceae*.

Aún cuando se detectaron arqueobacterias metanogénicas, el metano producido en las CEMs no fue significativo, lo cual indicó que el airear los ánodos de las CEMs al final de cada ciclo operacional y antes de adicionar sustrato, ayudó a inhibir el crecimiento y proliferación de la mayoría de los metanógenos.

Durante las pruebas realizadas utilizando un agua residual sintética que contenía una mezcla de ácido acético, propiónico y butírico, se observó que aparentemente el ácido propiónico se remueve en un mayor porcentaje seguido del ácido butírico y finalmente el ácido acético. Debido a que, tanto el ácido propiónico como el butírico pueden ser removidos de dos maneras: la primera de ellas de manera directa para producción de hidrógeno y la segunda siendo fermentados primeramente a acetato para su posterior conversión a hidrógeno, lo cual tiene como consecuencia un aumento en la concentración de ácido acético en las CEMs.

Las mejores eficiencias de las CEMs se obtuvieron cuando se utilizó ácido acético o una mezcla de ácido acético y butírico como sustrato, con tasas de rendimiento en promedio de 2 mmol de $H_2/gDQO_{rem}$ y máximas tasas de producción de hidrógeno de 268 mL/d/ $L_{reactor}$. Con la adición de ácido propiónico puede generarse metano en la cámara anódica de las celdas o algunos otros subproductos que disminuyen los porcentajes de recuperación total de hidrógeno y tasas de rendimiento del sistema.

Se encontró que el sistema acoplado puede ser utilizado de manera eficiente para el tratamiento del efluente de un fermentador con la posterior producción de hidrógeno.

Los mejores resultados se registraron cuando la CEM se operó utilizando una mezcla de efluente y buffer de fosfatos con nutrientes en una relación 50:50, con una tasa de rendimiento de hidrógeno máxima de $13 \text{ mmolH}_2/\text{gDQO}_{\text{rem}}$ y una tasa de producción de hidrógeno máxima de $470 \text{ mL/d/L}_{\text{reactor}}$. Además, los resultados obtenidos con el sistema acoplado en cuanto a tasas de rendimiento y producción de hidrógeno fueron comparables con los registrados utilizando una fuente de poder para la adición de voltaje, con lo cual se demostró que al utilizar una CCM de dos cámaras se puede proveer la energía necesaria para llevar a cabo las reacciones de óxido-reducción en la CEM.

Durante el tratamiento del efluente del fermentador con el sistema acoplado se removieron la mayoría de los ácidos presentes en el mismo, siendo los que presentaron mayores porcentajes de remoción el ácido propiónico (50% en promedio), butírico (51%) e isobutírico (99%), seguido del ácido acético (41%) y por último isovalérico (en la mayoría de los ciclos hubo un aumento en su concentración).

Al adicionar únicamente el efluente de fermentación como solución anódica, el medio tiende a acidificarse, lo cual influye en el funcionamiento de la membrana de intercambio iónico utilizada para separar las cámaras de la CEM y también puede ocasionar daños irreversibles en las bacterias anodofílicas, por esto resulta necesario adicionar buffer de fosfatos para controlar las variaciones en el pH.

CAPÍTULO 7

RECOMENDACIONES PARA TRABAJOS FUTUROS

En general, se recomienda realizar estudios utilizando ahora una CEM de una sola cámara y variando los parámetros operacionales tales como la temperatura, acidez del medio y fuentes de inóculo, que permitirán desarrollar un consorcio microbiano adecuado para maximizar las tasas de rendimiento y producción de hidrógeno. Además, será necesario el desarrollar un consorcio microbiano que sea capaz de tolerar condiciones de acidez en el anolito, para con ello poder tratar el efluente del fermentador sin la necesidad de utilizar una solución tampón.

Otro aspecto importante y posible punto de estudio, será la búsqueda de un tratamiento que evite el crecimiento de arqueobacterias metanogénicas desde el momento de realizar la inoculación de los ánodos de las CEMs y que permita la selección y formación de una biopelícula con bacterias específicas productoras de hidrógeno.

En cuanto a la utilización del sistema acoplado CEM-CCM, se recomienda utilizar diferentes resistencias externas para realizar la conexión de la CEM con la CCM (lo cual quedó fuera de los alcances de esta tesis) o el utilizar un convertidor de corriente directa que permita aumentar el voltaje aplicado a la CEM.

REFERENCIAS

REFERENCIAS

- Anderson K.L., Tayne T.A., Ward D.M. (1987).** "Formation and fate of fermentation products in hot spring cyanobacterial mats". *Appl. Environ. Microbiol.* 53, 2343-2352.
- Agnenent L.T., Karim K., Al-Dahhan M.H., Wren B.A., Domínguez-Espinosa R. (2004).** "Production of bioenergy and biochemicals from industrial and agricultural wastewater". *Trends Biotechnol.* 22, 477-485.
- Aiyuk S., Forrez I., Lieven K., Verstraete W., van Haandel A., Verstraete W. (2006).** "Anaerobic and complementary treatment of domestic sewage in regions with hot climates- A review". *Bioresour. Technol.* 97, 2225-2241.
- Bergel A., Féron D., Mollica A. (2005).** "Catalysis of oxygen reduction in PEM fuel cell by sewer biofilm". *Electrochem. Commun.* 7, 900-904.
- Biffinger J.C., Pietron J., Bretschger O., Nadeau I.J., Johnson G.R., Williams C.C., Neelson K.H., Ringeisen B.R. (2008).** "The influence of acidity on microbial fuel cells containing *Shewanella oneidensis*". *Biosens. Biotechnol.* 24, 906-911.
- Bond D.R., Holmes D.E., Tender L.M., Lovley D.R. (2002).** "Electrode-reducing microorganisms that harvest energy from marine sediments". *Science* 295, 483-485.
- Bond D.R., Lovley D.R. (2003).** "Electricity production by *Geobacter sulfurreducens* attached to electrodes". *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 1548-1555.
- Bond D.R., Lovley D.R. (2005).** "Evidence for involvement of an electron shuttle in electricity generation by *Geothrix fermentans*". *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 2186-2189.
- Borole A.P., Hamilton C.Y., Vishnivetskaya T.A. (2011).** "Enhancement in current density and energy conversion efficiency of 3-dimensional MFC anodes using pre-enriched consortium and continuous supply of electron donors". *Bioresour. Technol.* 102, 5098-5104.
- Call D., Logan B.E. (2008).** "Hydrogen production in a single chamber microbial electrolysis cell lacking a membrane". *Environ. Sci. Technol.* 42, 3401-3406.
- Call D., Merrill M., Logan B.E. (2009).** "High surface area stainless steel brushes as cathodes in microbial electrolysis cells (MECs)". *Environ. Sci. Technol.* 43, 2179-2183.
- Caporaso J.G., Kuczynski J., Stombaugh J., Bittinger K., Bushman F.D., Costello E.K., Fierer N., Gonzalez Pena A., Goodrich J.K., Gordon J.I., Huttley G.A., Kelley S.T., Knights D., Koenig J.E., Ley R.E., Lozupone C.A., McDonald D., Muegge B.D., Pirrung M., Reeder J., Sevinsky J.R., Turnbaugh P.J., Walters W.A., Widmann J., Yatsunencko T., Zaneveld J., Knight R. (2010).** "QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data". *Nature Methods* 7(5), 335-336.
- Caporaso J.G., Bittinger K., Bushman F.D., DeSantis T.Z., Andersen G.L., Knight R. (2010).** "PyNAST: a flexible tool for aligning sequences to a template alignment". *Bioinformatics* 26, 266-267.

- Catal T., Xu S., Li K., Bermek H., Liu H. (2008 a).** "Electricity production from polyalcohols in single-chamber microbial fuel cells". *Biosens. Bioelectron.* 24, 855-860.
- Catal T., Li K., Bermek H., Liu H. (2008 b).** "Electricity production from twelve monosaccharides using microbial fuel cells". *J. Power Sources* 175, 196-200.
- Chae K.J., Choi M.J., Lee J., Arayi F.F., Kim I.S. (2008).** "Biohydrogen production via biocatalyzed electrolysis in acetate-fed bioelectrochemical cells and microbial community analysis". *Int. J. 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 cells". *Int. J. Hydrogen Energy* 35(24), 13379-13386.
- Chao A., Chazdon R.L., Colwell R.K., Shen T. (2005).** "A new statistical approach for assessing similarity of species composition with incidence and abundance data". *Ecology Letters* 8, 148-159.
- Chaudhuri S.K., Lovley D.R. (2003).** "Electricity generation by direct oxidants of glucose in mediatorless microbial fuel cells". *Nat. Biotechnol.* 21, 1229-1232.
- Cheng C.C., Marcus A.K., Rittman B.E. (2001).** "Kinetics of hydrogen production with continuous anaerobic cultures utilizing sucrose as the limiting substrate". *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 57, 56-64.
- Cheng S., Liu H., Logan B.E. (2006 a).** "Power densities using different cathode catalysts (Pt and CoTMPP) and polymer binders (Nafion and PTFE) in single chamber microbial fuel cells". *Environ. Sci. Technol.* 40, 364-369.
- Cheng S., Liu H., Logan B.E. (2006 b).** "Increased power generation in a continuous flow MFC with advective flow through the porous anode and reduced electrode spacing". *Environ. Sci. Technol.* 40, 2426-2432.
- Cheng H., Liu H., Logan B.E. (2006 c).** "Increased performance of single-chamber microbial fuel cells using an improved cathode structure". *Electrochem. Comm.* 8, 489-494.
- Cheng S., Logan B.E. (2007 a).** "Sustainable and efficient biohydrogen production via electrohydrogenesis". *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 104, 18872-18873.
- Cheng S., Logan B.E. (2007 b).** "Ammonia treatment of carbon cloth anodes to enhance power generation of microbial fuel cells". *Electrochem. Comm.* 9, 492-496.
- Clauwaert P., Toledo R., van der Ha D., Crab R., Verstraete W., Hu H., Udert K.M., Rabaey K. (2008).** "Combining biocatalyzed electrolysis with anaerobic digestion". *Water Sci. Technol.* 57, 575-579.
- Cohen B. (1931).** "The bacterial culture as an electrical half-cell". *Bacteriol.* 21, 18-19.
- Coppi M.V., O'Neil R.A., Lovley D.R. (2004).** "Identification of an uptake hydrogenase required for hydrogen-dependent reduction of Fe (III) and other electron acceptors by *Geobacter sulfurreducens*". *J. Bacteriol.* 186, 3022-3028.

- Cusick R.D., Kiely P.D., Logan B.E. (2010).** "A monetary comparison of energy recovered from microbial fuel cells and microbial electrolysis cells fed winery or domestic wastewater". *Int. J. of Hydrogen Energy* 35(17), 8855-8861.
- Ditzig J., Liu H., Logan B.E. (2007).** "Production of hydrogen from domestic wastewater using a bioelectrochemically assisted microbial reactor (BEAMR)". *Int. J. Hydrogen Energy* 32, 2296-2304.
- Derringer G. and Suich R. (1980).** "Simultaneous optimization of several response variables". *J. Qual. Technol.* 12(4), 214-219.
- DeSantis T.Z., Hugenholtz P., Larsen N., Rojas M., Brodie E.L., Keller K. (2006).** "Greengenes, a chimera-checked 16S rRNA gene database and workbench compatible with ARB". *Appl. Environ. Microb.* 72(7), 5069-5072.
- De Windt W., Boon N., Siciliano S.D., Verstraete W. (2003).** "Cell density related H₂ consumption in relation to anoxic Fe(O) corrosion and precipitation of corrosion products by *Shewanella oneidensis* MR-1". *Environ. Microbiol.* 5, 1192-1202.
- Du Z., Li H., Gu T. (2007).** "A state of the art review on microbial fuel cells: a promising technology for wastewater treatment and bioenergy". *Biotechnology Adv.* 25, 464-482.
- Dumas C., Basseguy R., Bergel A. (2008).** "Microbial electro-catalysis with *Geobacter sulfurreducens* biofilm on stainless steel cathodes". *Electrochim. Acta* 53, 2494-2500.
- Dutta P.K., Rabaey K., Yuan Z., Keller J. (2008).** "Spontaneous electrochemical removal of aqueous sulfide". *Water Res.* 42, 4965-4975.
- Edgar R.C. (2010).** "Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST". *Bioinformatics* 26(19), 2460-2461.
- Erbale B., Bergel A. (2009).** "First air-tolerant effective stainless steel microbial anode obtained from a natural marine biofilm". *Bioresource Technol.* 100, 3302-3307.
- Erbale B., Duteanu N.M., Ghangrekar M.M., Dumas C., Scott K. (2010).** "Application of electro-active biofilms". *Biofiling* 26, 57-71.
- Escapa A., Lobato A., García D.M., Morán A. (2012).** "Hydrogen Production and COD Elimination Rate in a Continuous Microbial Electrolysis Cell: The Influence of Hydraulic Retention Time and Applied Voltage". *Environ. Progress and Sustainable Energy* 00, 1-6.
- Faith D.P. (1992).** "Conservation, evaluation and phylogenetic diversity". *Biol. Conserv.* 61(1), 1-10.
- Fan Y., Hu H., Liu H. (2007).** "Sustainable power generation in microbial fuel cells using bicarbonate buffer and proton transfer mechanisms". *Environ. Sci. Technol.* 41, 8154-8158.
- Fang H.H., Liu H., Zhang T. (2001).** "Characterization of a hydrogen-producing granular sludge". *Biotechnol. Bioeng.* 78, 44-52.

- Fang H.H., Zhang T., Liu H. (2002).** "Microbial diversity of a mesophilic hydrogen-producing sludge". *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 58, 112-118.
- Fang Y.Z., Hangqians H., Liu H. (2007).** "Enhanced Coulombic efficiency and power density of air-cathode microbial fuel cells with an improved cell configuration". *Power Sources* 171, 348-354.
- Freguia S., Rabaey K., Yuan Z., Keller J. (2007 a).** "Electron and carbon balances in microbial fuel cells reveal temporary bacterial storage behavior during electricity generation". *Environ. Sci. Technol.* 41, 2915-1921.
- Freguia S., Rabaey K., Yuan Z., Keller J. (2007 b).** "Non-catalyzed cathodic oxygen reduction at graphite granules in microbial fuel cells". *Electrochim. Acta* 53, 598-603.
- Freguia S., Rabaey K., Yuan Z., Keller J. (2008).** "Sequential anode-cathode configuration improves cathodic oxygen reduction and effluent quality of microbial fuel cells". *Water Res.* 42, 1387-1396.
- Freguia S., Teh E.H., Boon N., Leung K.M., Keller J., Rabaey K. (2010).** "Microbial fuel cells operating on mixed fatty acids". *Bioresour. Technol.* 101, 1233-1238.
- Gil G.C., Chang I.S., Kim B.H., Kim M., Jang J.K., Park H.S., Kim H.J. (2003).** "Operational parameters affecting the performance of a mediator-less microbial fuel cell". *Biosens. Bioelectron.* 18, 327-334.
- Ginkel S.V., Sung S., Lay J.J. (2001).** "Biohydrogen production as a function of pH and substrates concentrations". *Environ. Sci. Technol.* 35, 4726-4730.
- Gorby Y.A., Yanina S., McLean J.S., Rosso K.M., Moyles D., Dohnakova A., Beveridge T.J., Fredrickson J.K. (2006).** "Electrically conductive bacterial nanowires produced by *Shewanella oneidensis* strain MR-1 and other microorganisms". *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103, 11358-11363.
- Greenman J., Galvez A., Giusti L., Ieropoulos I. (2009).** "Electricity from landfill leachate using microbial fuel cells: comparison with a biological aerated filter". *Enzyme Microb. Technol.* 44, 112-119.
- Ha P.T., Tae B., Chang I.S. (2008).** "Performance and bacterial consortium of microbial fuel cell fed with formate". *Energy Fuels* 22, 164-168.
- Haas B.J., Gevers D., Earl A.M., Feldgarden M., Ward D.V., Giannoukos G. (2011).** "Chimeric 16S rRNA sequence formation and detection in Sanger and 454-pyrosequenced PCR amplicons". *Genome Research* 21, 494-504.
- Hallenbeck P.C., Ghosh D. (2009).** "Advances in fermentative biohydrogen production: the way forward?". *Trends in Biotechnology* 27, 287-297.
- Handley K.M., Wrighton K.C., Piceno Y.M., Andersen G.L., DeSantis T.Z., Williams K.H., Wilkins M.J., N'Guessan A.L., Peacock A., Bargar J., Long P.E., Banfield J.F. (2012)** "High-density PhyloChip profiling of stimulated aquifer microbial communities reveals a complex response to acetate amendment". *FEMS Microbiology Ecology* 81, 188-204.
- HaoYu E., Cheng S., Keith S., Logan B. (2007).** "Microbial fuel cell performance with no-Pt cathode catalysts". *Power Sources* 171, 275-281.

- He Z., Huang Y., Manohar A.K., Mansfeld F. (2008).** "Effect of electrolyte pH on the rate of the anodic and cathodic reactions in an air-cathode microbial fuel cell". *Bioelectrochemistry* 74, 78-82.
- He Z., Shao H., Angenent I.T. (2007).** "Increased power production from a sediment microbial fuel cell with a rotating cathode". *Biosens. Bioelectron.* 22, 3252-3255.
- Hesselsoe M., Fuereder S., Schloter M., Bodrossy L., Iversen. N., Roslev P., Halkjær Nielsen P., Wagner M., Loy A. (2009).** "Isotope array analysis of Rhodocyclales uncovers functional redundancy and versatility in an activated sludge". *ISME J.* 3, 1349-1364.
- Heijne A., Hamelers H.V.M., de Wilde V., Rozendal R.A., Buisman C.J.N. (2006).** "A bipolar membrane combined with ferric iron reduction as an efficient cathode system in microbial fuel cells". *Environ. Sci. Technol.* 40, 5200-5205.
- Heijnen, J.J. (1999).** "Bioenergetics of microbial growth". John Wiley & Sons. In *Encyclopedia of Bioprocess Technology: Fermentation, Biocatalysis and Bioseparation* (Flinckinger, M.C. and Drew, S.D., eds), 267-291.
- Heilmann J., Logan B.E. (2006).** "Production of electricity from proteins using a microbial fuel cell". *Water Environ. Res.* 78, 531-537.
- Hernández M.E., Kappler A., Newman D.K. (2006).** "Phenazines and other redox-active antibiotics promote microbial mineral reduction". *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 921-928.
- Holmes D.E., Bond D.R., O'Neil R.A., Reimers C.E., Tender L.R., Lovley D.R. (2004).** "Microbial communities associated with electrodes harvesting electricity from a variety of aquatic sediments". *Microb. Ecol.* 48, 178-190.
- Holt J.G., Krieg N.R., Sneath P.H.A., Staley J.T., Williams S.T. (1994).** "Bergey's Manual of Determinative Bacterology", 9th ed., Lippincott Williams and Wilkins, Baltimore, MD.
- Hu H., Fan Y., Liu H. (2008).** "Hydrogen production using single-chamber membrane-free microbial electrolysis cells". *Water Res.* 42, 4172-4178.
- Hu H., Fan Y., Liu H. (2009).** "Hydrogen production in single chamber tubular microbial electrolysis cells using non-precious metal catalysis (NiMo, NiW)". *Int. J. Hydrogen Energy* 34, 8535-8542.
- Jeremiase A.W., Hamelers H.V.M., Buisman C.J.N. (2010).** "Microbial electrolysis cell with a microbial biocathodes". *Bioelectrochem.* 78(1), 39-43.
- Jong B.C., Kim B.H., Chang I.S., Liew P.W.Y., Choo Y.F., Kang G.S. (2006).** "Enrichment, performance and microbial diversity of a thermophilic mediatorless microbial fuel cell". *Environm. Sci. Technol.* 40, 6449-6454.
- Jung S., Regan J.M. (2007).** "Comparison of anode bacterial communities and performance in microbial fuel cells with different electron donors". *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 77(2), 293-402.

- Kiely P.D., Rader G., Regan J.M., Logan B.E. (2011).** "Long-term cathode performance and the microbial communities that developed in microbial fuel cells fed different fermentation end products". *Bioresour. Technol.* 102, 361-366.
- Kim B.H., Chang I.S., Gadd G.M. (2007).** "Challenges in microbial fuel cell development and operation". *Microbiol. Biotechnol.* 76, 485-494.
- Kim B.H., Hyun H.J., Park D.H. (1999 a).** "Direct electrode reaction of Fe(III)-reducing bacterium, *Shewanella putrefaciens*". *Microbiol. Biotechnol.* 9(2), 127-131.
- Kim B.H., Ikeda T., Park H.S., Kim H.J., Hyun M.S., Kano K., Takagi K., Tatsumi H. (1999 b).** "Electrochemical activity of and Fe(III)-reducing bacterium, *Shewanella putrefaciens* IR-I, in the presence of alternative electron acceptors". *Biotechnol. Tech.* 13, 475-478.
- Kim G.T., Hyun M.S., Chang I.S., Kim H.J., Park H.S., Kim B.H., Kim S.D., Wimpenny J.W.T., Weightmann A.J. (2005).** "Dissimilatory Fe(III) reduction by an electrochemically active lactic acid bacterium phylogenetically related to *Enterococcus gallinarum* isolated from submerged soil". *Appl. Microbiol.* 99, 978-987.
- Kim H.J., Park H.S., Hyun M.S., Chang I.S., Kim M., Kim B.H. (2002).** "A mediator-less microbial fuel cell using a metal reducing bacterium, *Shewanella putrefaciens*". *Enzyme Microb. Technol.* 30, 145-152.
- Kim N., Youngjing C., Jung S., Kim S. (2000).** "Effect of initial carbon sources on the performance of microbial fuel cells containing *Proteus vulgaris*". *Biotechnol. Bioeng.* 70, 109-114.
- Lalurette E., Thammannagowda S., Mohagheghi A., Maness P.C., Logan B.E. (2009).** "Hydrogen production from cellulose in a two-stage process combining fermentation and electrohydrogenesis". *Int. J. of Hydrogen Energy* 34, 6201-6210.
- Lee H.S., Parameswaran P., Kato-Marcus A., Torres C.I., Rittman B.E. (2008).** "Evaluation of energy-conversion efficiencies in microbial fuel cells (MFCs) utilizing fermentable and non-fermentable substrates". *Water Res.* 42, 1501-1510.
- Lee H.S., Torres C.I., Parameswaran P., Rittmann B.E. (2009).** "Fate of H₂ in an upflow single-chamber microbial electrolysis cell using a metal-catalyst-free cathode". *Environ. Sci. Technol.* 43, 7971-7976.
- Lee H.S., Vermass F.J., Rittman B.E. (2010).** "Biological hydrogen production: prospects and challenges". *Trends in Biotechnology* 28, 262-271.
- Lettinga G., van Velsen A.F.M., Hobma B.W., de Zeeuw W., Klapwijk A. (1980).** "Use of the upflow sludge blanket (USB) reactor concept for biological wastewater-treatment, especially for anaerobic treatment". *Biotechnol. Bioeng.* 22, 699-734.
- Li C., Zhang L., Ding L., Ren H., Cui H. (2011).** "Effect of conductive polymers coated anode on the performance of microbial fuel cells (MFCs) and its biodiversity analysis". *Biosens. Bioelectron.* 26(10), 4169-4176.

- Liang P., Fan M.Z., Cao X.X., Peng X., Wang S., Gong Q.M., Liang J. (2008).** "Electricity generation by microbial fuel cells using carbon nanotube as the anode". *Environ. Sci.* 29, 2356-2360.
- Lise A., Baeyens J., Degreve J., Dewill R. (2008).** "Principles and potential of the anaerobic digestion of waste-activated sludge". *Progr. Energ. Combust. Sci.* 34, 755-781.
- Liu W., Huang S., Zhou A., Zhou G., Ren N., Wang A., Zhuang G. (2012).** "Hydrogen generation in microbial electrolysis cell feeding with fermentation liquid of waste activated sludge". *Int. J. Hydrogen Production* 37, 13859-13864.
- Liu H., Cheng S., Logan B.E. (2005 b).** "Power generation in fed-batch microbial fuel cells as a function of ionic strength, temperature and reactor configuration". *Environ. Sci. Technol.* 39, 5488-5493.
- Liu H., Grot S., Logan B.E. (2005 a).** "Electrochemically assisted microbial production of hydrogen from acetate". *Environ. Sci. Technol.* 39, 4317-4320.
- Liu H., Cheng S.A. and Logan B.E. (2005 c).** "Production of electricity from acetate or butyrate using a single-chamber microbial fuel cell". *Environ. Sci. Technol.* 39, 658-662.
- Liu H., Logan B.E. (2004).** "Electricity generation using an air-cathode single chamber microbial fuel cell in the presence and absence of a proton exchange membrane". *Environ. Sci. Technol.* 38, 4040-4046.
- Liu H., Ramnarayanan R., Logan B.E. (2004).** "Production of electricity during wastewater treatment using a single chamber microbial fuel cell". *Environ. Sci. Technol.* 38, 2281-2285.
- Logan B.E., Cheng S., Watson V., Estadt G. (2007).** "Graphite fiber brush anodes for increase power production in air-cathode microbial fuel cells". *Environ. Sci. Technol.* 41, 3341-3346.
- Logan B.E., Hamelers B., Rozendal R., Schroder U., Keller J., Fregua S., Aelterman P., Verstraete W., Rabey K. (2006).** "Microbial fuel cells: methodology and technology". *Environ. Sci. Technol.* 40, 5181-5192.
- Logan B.E., Murano C., Scott K., Gray N.D., Head I.M. (2005).** "Electricity generation from cysteine in a microbial fuel cell using bicarbonate buffer and proton transfer mechanisms". *Environ. Sci. Technol.* 41, 8154-8158.
- Logan B.E., Oh S.E., Kim I.S., Van Ginkel S. (2002).** "Biological hydrogen production measured in batch anaerobic respirometers". *Environ. Sci. Technol.* 36, 2530-2535.
- Logan B.E., Regan J.M. (2006).** "Electricity-producing bacterial communities in microbial fuel cells". *Trends Microbiol.* 14, 512-518.
- Lovley D., Phillips E. (1988).** "Novel mode of microbial energy metabolism: organic carbon coupled to dissimilatory reduction of iron or manganese". *Appl. Environ. Microbiol.* 54, 1472-1480.
- Lovley D.R. (2006).** "Bug Juice: harvesting electricity with microorganisms". *Nat. Rev. Microbiol.* 4, 497-508.
- Lozupone C., Knight R. (2005).** "UniFrac: a new phylogenetic method for comparing microbial communities". *Appl. Environ. Microbiol.* 71(12), 8228-8235.

- Lu L., Ren N., Xing D., Logan B.E. (2009).** "Hydrogen production with effluent from an ethanol-H₂-coproducing fermentation reactor using a single-chamber microbial electrolysis cell. *Biosens. Bioelectron.* 24, 3055-3060.
- Lu L., Xing D., Liu B., Ren N. (2012).** "Enhanced hydrogen production from waste activated sludge by cascade utilization of organic matter in microbial electrolysis cells". *Water Research* 46, 1015-1026.
- Matthies C., Evers S., Ludwig W., Schink B. (2000).** "Anaerovorax odorimutans gen., nov., sp., nov., a putrescine-fermenting, strictly anaerobic bacterium". *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 50, 1591-1594.
- Mehanna M., Kiely P.D., Call D.F., Logan B.E. (2010).** "Microbial electro dialysis cell for simultaneous water desalination and hydrogen gas production". *Environ. Sci. Technol.* 44(24), 9578-9583.
- Min B., Kim J., Oh S., Regan J.M., Logan B.E. (2005).** "Electricity generation from swine wastewater using microbial fuel cells". *Water Res.* 39, 4961-4968.
- Min B., Logan B.E. (2004).** "Continuous electricity generation from domestic wastewater and organic substrates in a flat plate microbial fuel cell". *Environ. Sci. Technol.* 38, 5809-5814.
- Mohan S.V., Mohanakrishna G., Purushotham Reddy B., Saravanan R., Sarma P.N. (2008).** "Bioelectricity generation from chemical wastewater treatment in mediatorless (anode) microbial fuel cell (MFC) using selectively enriched hydrogen producing mixed culture under acidophilic microenvironment". *Biochem. Eng. J.* 39, 121-130.
- Newman D.K., Kolter R. (2000).** "A role of excreted quinones in extracellular electron transfer". *Nature* 405, 94-97.
- Nielsen M., Larsen L.H., Jetten M.S.M., Revsbech N.P. (2004 a).** "Bacterium-based NO₂-biosensor for environmental applications". *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 6551-6558.
- Niessen J., Schroder U, Scholz F. (2004).** "Exploiting complex carbohydrates for microbial electricity generation- a bacterial fuel cell operating on Storch". *Electrochem. Commun.* 6, 955-958.
- Oh S.E., Van Ginkel S., Logan B.E. (2003).** "The relative effectiveness of pH control and heat treatment for enhancing biohydrogen gas production". *Environ. Sci. Technol.* 37, 5186-5190.
- Ontiveros-Valencia A., Ilhan Z. E., Kang D.-W., Rittmann B. E., Krajmalnik-Brown R. (2013).** "Phylogenetic analysis of nitrate and sulfate reducing bacteria in a hydrogen-fed membrane biofilm reactor". *FEMS Microbiol. Ecol.* 85, 158-167.
- Parameswaran P., Torres C.I., Lee H.S., Krajmalnik-Brown R., Rittmann B.E. (2009).** "Syntrophic Interactions Among Anode Respiring Bacteria (ARB) and Non-ARB in a Biofilm Anode: Electron Balances". *Biotechnol. Bioeng.* 103(3), 513-523.
- Parameswaran P., Zhang H.S., Torres C.I., Rittman B.E., Krajmalnik-Brown R. (2010).** Microbial community structure in a biofilm anode fed with a fermentable substrate: the significance of hydrogen scavengers- *Biotechnol. Bioeng.* 105(1), 69-78.

- Park D.H., Zeikus J.G. (2000).** "Electricity generation in microbial fuel cells using neutral red as an electronophore". *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 1292-1297.
- Park D.H., Zeikus J.G. (2002 a).** "A mediator-less microbial fuel cell using a metal reducing bacterium, *Shewanella putrefaciens*". *Enzyme Microb. Technol.* 30, 145-152.
- Park D.H., Zeikus J.G. (2002 b).** "Impact of electrode composition on electricity generation in a single-compartment fuel cell using *Shewanella putrefaciens*". *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 59, 58-61.
- Park D.H., Zeikus J.G. (2003).** "Improved fuel cell and electrode designs for producing electricity from microbial degradation". *Biotechnol. Bioeng.* 81, 348-355.
- Park H.S., Kim B.H., Kim H.S., Kim H.J., Kim G.T., Kim M., Chang I.S., Park Y.K., Chang H.I. (2001).** "A novel electrochemically active Fe(III)-reducing bacterium phylogenetically related to *Clostridium butyricum* isolated from a microbial fuel cell". *Anaerobe* 7, 297-306.
- Patil S.A., Surakasi V.P., Koul S., Ijmulwar S., Vivek A., Shouche Y.S., Kapadnis B.P. (2009).** "Electricity generation using chocolate industry wastewater and its treatment in activated sludge based microbial fuel cell and analysis of developed microbial community in the anode chamber". *Biores. Technol.* 100, 5132-5139.
- Pham C.A., Jung S.J., Phung N.T., Lee J., Chang I.S., Kim B.H., Chun J. (2003).** "A novel electrochemically active Fe(III)-reducing bacterium phylogenetically related to *Aeromonas hydrophila*, isolated from a microbial fuel cell". *FEMS Microbiol. Lett.* 223, 129-134.
- Pham T.H., Boon N., Aelterman P., Clauwaert P., de Schampelaire L., Vanhaecke L., de Maeyer K., Torres C.I., Hôfe M., Verstraete W., Rabaey K. (2008).** "Metabolites produced by *Pseudomonas sp.* enable a gram –positive bacterium to achieve extracellular electron transfer". *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 77, 1119-1129.
- Pham T.H., Rabaey K., Aelterman P., Clauwaert P., de Schampelaire L., Boon N., Verstraete W. (2006).** "Microbial fuel cells in relation to conventional anaerobic digestion technology". *Eng. Life Sci.* 6, 285-292.
- Potter M.C. (1911).** "Electrical effects accompanying the decomposition of organic compounds". *Proc. Biol. Sci.* 84, 260-276.
- Price M.N., Dehal P.S., Arkin A.P. (2010).** "FastTree 2-Approximately Maximum-Likelihood Trees for Large Alignments". *Plos One* 5(3).
- Qiao Y., Bao S.J., Li C.M., Cui X.Q., Lu Z.S. Guo J. (2008).** "Nanostructures polyaniline/titanium dioxide composite anode for microbial fuel cells". *ACS Nano* 2, 113-119.
- Rabaey K., Van de Sompel K., Maignien L., Boon N., Aelterman P., Clauwaert P., De Schampelaire L., Pham H.T., Vermeulen J., Verhaege M., Lens P., Verstraete W. (2006).** "Microbial fuel cells for sulfide removal". *Environ. Sci. Technol.* 40, 5218-5224.
- Rabaey K., Boon N., Hofte M., Verstraete W. (2005 a).** "Microbial phenazine production enhances electron transfer in biofuel cells". *Environ. Sci. Technol.* 39, 3401-3408.

- Rabaey K., Boon N., Siciliano S.D., Verbaege M., Verstraete W. (2004).** "Biofuel cells select for microbial consortia that self-mediate electron transfer". *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 5373-5382.
- Rabaey K., Clauwaert P., Aelterman P. and Verstraete W. (2005 b).** "Tubular microbial fuel cells for efficient electricity generation". *Environ. Sci. Technol.* 39, 8077-8082.
- Rabaey K., Lissens G., Siciliano S.D., Verstraete W. (2003).** "A microbial fuel cell capable of converting glucose to electricity at high rate and efficiency". *Biotechnol. Lett.* 25, 1531-1535.
- Rabaey K., Rodríguez J., Blackall L.C., Keller J., Gross P., Batstone L., Verstraete W., Neelson K.H. (2007).** "Microbial ecology meets electrochemistry: electricity-driven and driving communities". *ISME J.* 1, 9-18.
- Rabaey K., Ossieur W., Verhaege M. and Verstraete W. (2005 c).** "Continuous microbial fuel cells convert carbohydrates to electricity". *Water. Sci. Technol.* 52, 515-523.
- Reguera G., McCarthy K.D., Mehta T., Nicoll J.S., Tuominen M.T., Lovley D.R. (2005).** "Extracellular electron transfer via microbial nanowires". *Nature*, 1098-1101.
- Ringersen B.R., Henderson E., Wu P.K., Pietron J., Ray R., Little B., Biffinger J.C., Jones-Meehan J.M. (2006).** "High power density from a miniature microbial fuel cell using *Shewanella Oneidensis* DSP10". *Environ. Sci. Technol.* 40, 2629-2634.
- Rismani-Yazdi H., Christy A.D., Dehority B.A., Morrison M., Yu Z., Tuovinen O.H. (2007).** "Electricity generation from cellulose by rumen microorganisms in microbial fuel cells". *Biotechnol. Bioeng.* 97, 1398-1407.
- Riviere D., Desvignes V., Pelletier E., Chaussonnerie S., Guermazi S., Weissenbach J., Li T., Camacho P., Sghir A. (2009).** "Towards the definition of a core of microorganisms involved in anaerobic digestion of sludge". *ISME. J.* 3, 700-714.
- Rosenbaum M., Zhao F., Quaas M., Wulff H., Schroder U., Scholz F. (2007).** "Evaluation of catalytic properties of tungsten carbide for the anode of microbial fuel cells". *Appl. Catal. B. Environm.*, 74, 261-269.
- Rosenbaum M.Z.F., Schroder U., Scholz F. (2006).** "Interfacing electrocatalysis and biocatalysis with tungsten carbide: a high performance, noble-metal-free microbial fuel cell". *Angewandte Chemie Int. Ed.* 45, 6658-6661.
- Rozendal R.A., Hamelers H.V.M., Euverink G.J.W., Metz S.J., Buisman C.J.N. (2006).** "Principle and perspectives of hydrogen production through biocatalyzed electrolysis". *Int. J. Hydrogen Energy* 31, 1632-1640.
- Rozendal R.A., Hamelers H.V.M., Rabaey K., Keller J., Buisman C.J.N. (2008 a).** "Towards practical implementation of bioelectrochemical wastewater treatment". *Trends in Biotechnology* 26, 450-459.
- Rozendal R.A., Hamerles H.V.M., Molenkamp R.J., Buisman C.J.N. (2007).** "Performance of single chamber biocatalyzed electrolysis with different types of ion exchange membranes". *Water Res.* 41, 1984-1994.

- Rozendal R.A., Jeremiase A.W., Hamerles H.V.M., Buisman C.J.N. (2008 b).** "Hydrogen production with a microbial biocathode". *Environ. Sci. Technol.* 42, 629-634.
- Rozendal R.A., Sleutels T.H.J.A., Hamelers H.V.M., Buisman C.J.N. (2008 c).** "Effect of the type of ion exchange membrane on performance, ion transport and pH in biocatalyzed electrolysis of wastewater". *Water Sci. Technol.* 57, 1757-1762.
- Selembo P.A., Merrill M.D., Logan B.E. (2009 a).** "The use of stainless steel and nickel alloys as low-cost cathodes in microbial electrolysis cells". *J. Power Sources* 190, 271-278.
- Selembo P.A., Perez J.M., Lloyd W.A., Logan B.E. (2009 b).** "High hydrogen production from glycerol or glucose by electrohydrogenesis using microbial electrolysis cells". *Int. J. Hydrogen Energy* 34, 5373-5381.
- Shannon C.E. (1984).** "A mathematical theory of communication". *The Bell System Technical Journal* 27, 379-423.
- Sharma Y., Li B. (2010).** "Optimizing energy harvest in wastewater by combining anaerobic hydrogen producing biofermentor (HPB) and microbial fuel cell (MFC)". *Int. J. Hydrogen Energy* 35, 3789-3797.
- Shi X.Y., Yu H.Q. (2004).** "Hydrogen production from propionate by *Rhodospseudomonas capsulata*". *Applied Biochemistry and Biotechnology* 117, 413-154.
- Shimoyama T., Komukai S., Yamazawa A., Ueno Y., Logan B.E., Watanabe K. (2008).** "Electricity generation from model organix wastewater in a cassette-electrode microbial fuel cell". *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 80, 325-330.
- Stams A.J.M., de Bok F.A.M., Plugge C.M., Van Eekert M.H.A. Dolfing J., Schroa G. (2006).** "Exocellular electron transfer in anaerobic microbial communities". *Environ. Microbiol.* 8, 371-382.
- Steinbusch K.J.J., Hamelers H.V.M., Buisman C.J.N. (2008).** "Alcohol production through volatile fatty acids reduction with hydrogen as electron donor by mixed cultures". *Water Res.* 42, 4059-4066.
- Sun M., Mu Z.X., Sheng N., Tong Z.H., Wang H.L., Yu H.Q. (2010).** "Hydrogen production from propionate in a biocatalyzed system with in-situ utilization of the electricity generated from a microbial fuel cell". *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 64, 378-382.
- Sun M., Sheng G.P., Mu Z.X., Liu X.W. (2009).** "Manipulating the hydrogen production from acetate in a microbial electrolysis cell-microbial fuel cell-coupled system". *J. Power Sources* 191, 338-343.
- Sun M., Sheng G.P., Zhang L., Xia C.R., Mu Z.X., Liu X.W., Wang H.L., Yu H.Q., Qi R., Yu T., Yang M. (2008).** "An MEC-MFC-Coupled System for Biohydrogen Production from Acetate". *Environ. Sci. Technol.* 42, 8095-8100.
- Sun Y., Luo H., Li Y., Sun C., Song J., Niu Y., Zhu Y., Dong L., Lu A., Tramontano E., Chen S. (2011).** "Pyrosequencing of the *Campylobacter acuminata* transcriptome reveals putative genes involved in campylobacter biosynthesis and transport". *BMG Genomics* 12:533.

- Tartakovsky B., Manuel M.F., Wang H., Guiot S.R. (2009).** "High rate membrane-less microbial electrolysis cell for continuous hydrogen production. *Int. J. Hydrogen Energy* 34, 672-677.
- Taylor B., Gardner T. (2007).** "Southeast Queensland recycled water aspects and soil impacts, In Proceedings of the AWA Queensland 2007 Regional Conference:9-11 November; Sunshine Coast, Australia". Australian Water Association.
- Tchobanoglous G., Metcalf and Eddy (2003).** "Wastewater Engineering: treatment and reuse". Mc Graw Hill. 4th Edition.
- Thevenieau F., Fardeau M.L., Ollivier B., Joulian C., Baena S. (2007).** "Desulfomicrobium thermophilum sp. nov., a novel thermophilic sulphate-reducing bacterium isolated from a terrestrial hot spring in Colombia". *Extremophiles*. 11(2), 295-303.
- Torres C.I., Markus A.K., Rittman B.E. (2007).** "Kinetics of consumption of fermentation products by anode-respiring bacteria". *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 77, 689-697.
- Torres C.I., Parameswaran P., Kato Marcus A., Wanger G., Gorby Y., Krajmalnik-Brown R., Rittmann B. (2009).** "Selecting anode-respiring bacteria based on anode potential: phylogenetic, electrochemical, and microscopic characterization". *Environ. Sci. Technol.* 43(24), 9519-9524.
- Tully J.G., Whitcomb R.F., Rose D.L., Bove J.M., Carle P., Somerson N.L., Williamson D.L., Edengreen S. (1994).** "*Acholeplasma brassiacae* sp., nov. and *Acholeplasma plamae* sp. nov., two non-Sterol-Requireing Mollicutes from plant-Surfaces". *Int. J. Syst. Bacteriol.* 44(4), 680-684.
- Ueno Y., Haruta S., Ishii M., Igarashi Y. (2001).** "Microbial community in anaerobic hydrogen producing microflora enriched from sludge compost". *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 57, 555-562.
- Valdez-Vázquez I., Ríos-Leal E., Esparza-García F., Cecchi F., Poggi-Varaldo H.M. (2005 a).** "Semi-continuous solid substrate anaerobic reactor for H₂ production from organic waste: mesophilic versus thermophilic regime". *Int. J. Hydrogen Energy* 30, 1383-1391.
- Valdez-Vázquez I., Sparling R., Risbey D., Rinderknecht-Seijas N., Poggi H.M. (2005 b).** "Hydrogen generation via anaerobic fermentation of paper mill wastes". *Bioresour. Technol.* 96, 1907-1913.
- Wagner R.C., Regan J.M., Oh S.E., Zuo Y., Logan B.E (2009).** "Hydrogen and methane production from swine wastewater using microbial electrolysis cells". *Water Res.* 43, 1480-1488.
- Wang X., Feng Y., Wang E., Li C. (2008).** "Electricity generation using nickel foam solely as biocathodic material in a two chambered microbial fuel cell". *Biotechnol.* 136, S662.
- Wang J.L., Wan W. (2008).** "Effect of temperature on fermentative hydrogen production by mixed cultures". *Int. J. Hydrogen Energy* 33, 5392-5397.
- Wang Q., Garrity G.M., Tiedje J.M., Cole J.R. (2007).** "Naive Bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy". *Appl. Environ. Microb.* 73(16), 5261-5267.

Xing D., Cheng S., Regan J.M., Logan B.E. (2009). "Change in microbial communities in acetate-and glucose-fed microbial fuel cells in the presence of light". *Biosens. Bioelectron.* 25(1), 105-111.

Yang C., Zhang W., Liu R., Li Q., Li B., Wang S., Song C., Qiao C., Mulchandani A. (2011). "Phylogenetic Diversity and Metabolic Potential of Activated Sludge Microbial Communities in Full-Scale Wastewater Treatment Plants". *Environ. Sci. Technol.* 45, 7408-7415.

You S.J., Zhao Q.L., Jiang J.Q., Zhang J.N., Zhao S.Q. (2006). "Sustainable approach for leachate treatment: electricity generation in microbial fuel cells". *Environ. Sci. Health Part A* 41, 2721-2734.

Zhao F., Rahunen N., Varcoe J.R., Chandra A., Avignone-Rossa C., Thumser A.E., Slade R.C.T. (2008). "Activated carbon cloth as anode for sulfate removal in a microbial fuel cell". *Environ. Sci. Technol.* 42, 4971-4976.

Zhao H.-P., Ilhan Z.E., Ontiveros-Valencia A., Tang Y., Rittmann B.E., Krajmalnik-Brown R. (2013). "Effects of multiple electron acceptors on microbial interactions in a hydrogen-based biofilm". *Environ. Sci. Technol.* 47, 7396-7403.

Zhao F., Hornisch F., Schroder U., Scholz F., Bogdanoff P., Hermann I. (2005). "Application of pyrolysed iron (III) phthalocyanine and CoTMPP based oxygen reduction catalysts as cathode materials in microbial fuel cells". *Electrochem. Commun.* 7, 1405-1410.

ANEXOS

ANEXO 1. Análisis estadístico de cada una de las variables de respuesta durante la primer etapa experimental.

Analysis of Variance for CODrem

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
A:Acetic	79.3623	1	79.3623	4.74	0.0951
B:Propionic	50.3783	1	50.3783	3.01	0.1579
AA	100.155	1	100.155	5.98	0.0708
AB	11.1934	1	11.1934	0.67	0.4596
BB	183.824	1	183.824	10.97	0.0296
blocks	1407.34	1	1407.34	84.00	0.0008
Lack-of-fit	133.102	3	44.3674	2.65	0.1851
Pure error	67.0167	4	16.7542		
Total (corr.)	1959.35	13			

R-squared = 89.7865 percent

R-squared (adjusted for d.f.) = 83.403 percent

Standard Error of Est. = 4.09319

Mean absolute error = 3.02246

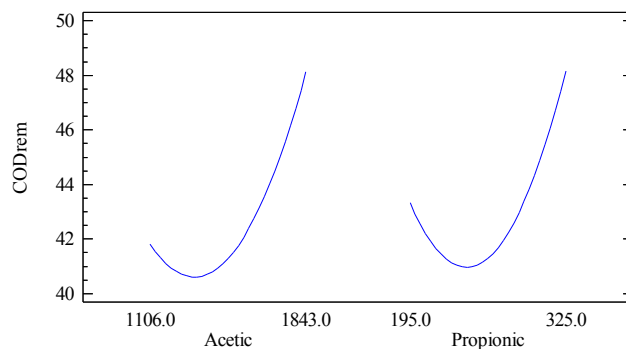
Durbin-Watson statistic = 3.02411 (P=0.9631)

Lag 1 residual autocorrelation = -0.546219

Regression coeffs. for CODrem

Coefficient	Estimate
constant	122.537
A:Acetic	-0.0531647
B:Propionic	-0.409062
AA	0.0000270456
AB	-0.0000693376
BB	0.0010544

Main Effects Plot for CODrem



Analysis of Variance for Acetic rem

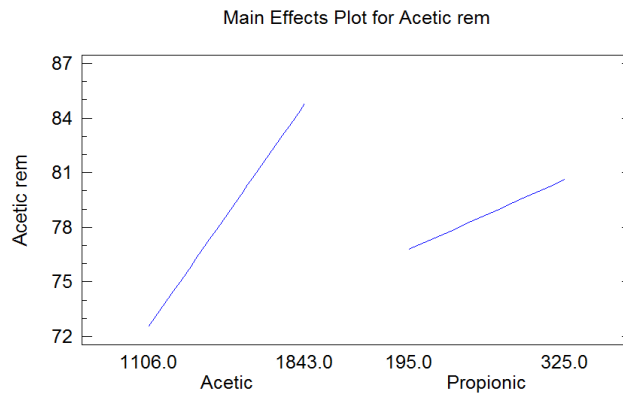
Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
A:Acetic	301.815	1	301.815	1.52	0.2850
B:Propionic	32.635	1	32.635	0.16	0.7058
blocks	930.823	1	930.823	4.69	0.0962
Lack-of-fit	363.723	6	60.6204	0.31	0.9051
Pure error	793.646	4	198.411		

Total (corr.)	2427.65	13			
---------------	---------	----	--	--	--

R-squared = 52.3256 percent
 R-squared (adjusted for d.f.) = 43.6575 percent
 Standard Error of Est. = 14.0859
 Mean absolute error = 6.45332
 Durbin-Watson statistic = 2.22136 (P=0.6449)
 Lag 1 residual autocorrelation = -0.121797

Regression coeffs. for Acetic rem

Coefficient	Estimate
constant	46.5343
A:Acetic	0.0165913
B:Propionic	0.0296134



Analysis of Variance for Propionic rem

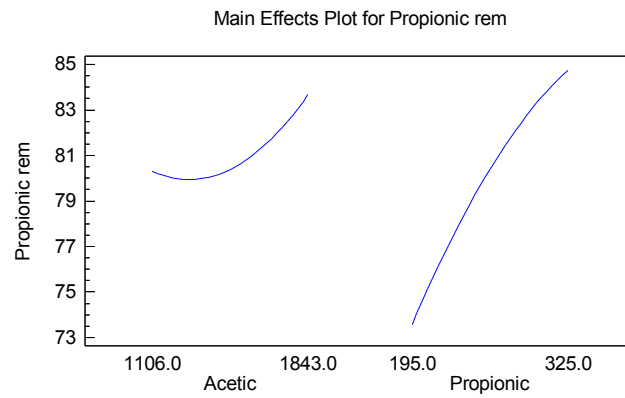
Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
A:Acetic	22.723	1	22.723	1.16	0.3416
B:Propionic	273.582	1	273.582	14.00	0.0201
AA	19.2257	1	19.2257	0.98	0.3774
AB	13.6434	1	13.6434	0.70	0.4504
BB	14.2311	1	14.2311	0.73	0.4415
blocks	1289.23	1	1289.23	65.98	0.0012
Lack-of-fit	36.4762	3	12.1587	0.62	0.6370
Pure error	78.1643	4	19.5411		
Total (corr.)	1704.88	13			

R-squared = 93.2758 percent
 R-squared (adjusted for d.f.) = 89.0731 percent
 Standard Error of Est. = 4.42053
 Mean absolute error = 2.20817
 Durbin-Watson statistic = 2.71128 (P=0.8507)
 Lag 1 residual autocorrelation = -0.381918

Regression coeffs. for Propionic rem

Coefficient	Estimate
constant	27.7988
A:Acetic	-0.0104581
B:Propionic	0.351628
AA	0.0000118496

AB	-0.0000765509
BB	-0.000293376



Analysis of Variance for CD

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
A:Acetic	0.0386176	1	0.0386176	2.04	0.2264
B:Propionic	0.0168616	1	0.0168616	0.89	0.3988
AA	1.21245	1	1.21245	64.04	0.0013
AB	0.00141415	1	0.00141415	0.07	0.7982
BB	0.23372	1	0.23372	12.34	0.0246
blocks	8.67017	1	8.67017	457.93	0.0000
Lack-of-fit	1.04054	3	0.346848	18.32	0.0084
Pure error	0.0757333	4	0.0189333		
Total (corr.)	11.475	13			

R-squared = 90.2721 percent

R-squared (adjusted for d.f.) = 84.1921 percent

Standard Error of Est. = 0.137598

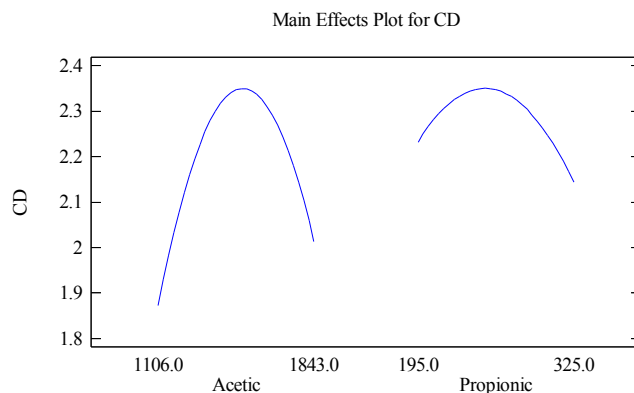
Mean absolute error = 0.260901

Durbin-Watson statistic = 2.07707 (P=0.3797)

Lag 1 residual autocorrelation = -0.186876

Regression coeffs. for CD

Coefficient	Estimate
constant	-7.06585
A:Acetic	0.00916701
B:Propionic	0.0200229
AA	-0.00000297573
AB	-7.79355E-7
BB	-0.000037597



Analysis of Variance for CE

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
A:Acetic	111.011	1	111.011	0.77	0.4293
B:Propionic	457.238	1	457.238	3.18	0.1492
AA	3365.5	1	3365.5	23.40	0.0084
AB	1.29073	1	1.29073	0.01	0.9291
BB	876.719	1	876.719	6.10	0.0690
blocks	1169.43	1	1169.43	8.13	0.0463
Lack-of-fit	2838.94	3	946.313	6.58	0.0501
Pure error	575.292	4	143.823		
Total (corr.)	9006.98	13			

R-squared = 62.0935 percent

R-squared (adjusted for d.f.) = 38.402 percent

Standard Error of Est. = 11.9926

Mean absolute error = 13.2348

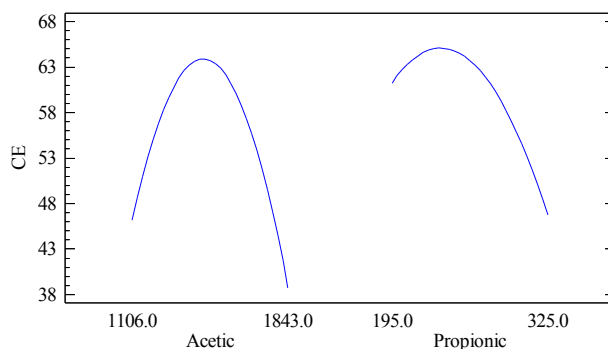
Durbin-Watson statistic = 2.61494 (P=0.7953)

Lag 1 residual autocorrelation = -0.327508

Regression coeffs. for CE

Coefficient	Estimate
constant	-379.848
A:Acetic	0.446088
B:Propionic	1.05125
AA	-0.000156779
AB	0.0000235454
BB	-0.00230269

Main Effects Plot for CE

**Analysis of Variance for rH2**

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
A:Acetic	27.7315	1	27.7315	0.77	0.4293
B:Propionic	114.535	1	114.535	3.19	0.1488
AA	841.48	1	841.48	23.41	0.0084
AB	0.315602	1	0.315602	0.01	0.9298
BB	219.218	1	219.218	6.10	0.0690
blocks	292.258	1	292.258	8.13	0.0463
Lack-of-fit	709.811	3	236.604	6.58	0.0501
Pure error	143.757	4	35.9392		
Total (corr.)	2252.04	13			

R-squared = 62.098 percent

R-squared (adjusted for d.f.) = 38.4093 percent

Standard Error of Est. = 5.99493

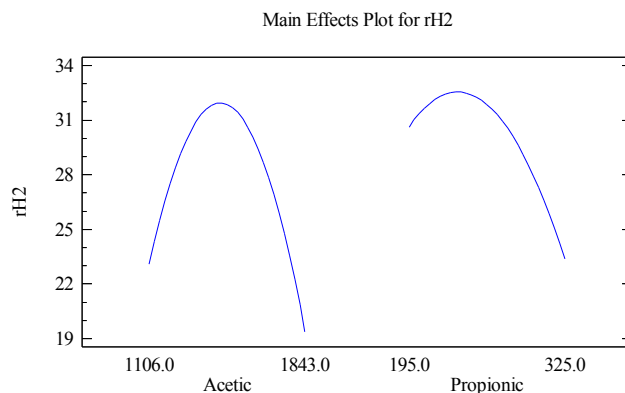
Mean absolute error = 6.61878

Durbin-Watson statistic = 2.61489 (P=0.7953)

Lag 1 residual autocorrelation = -0.327484

Regression coeffs. for rH2

Coefficient	Estimate
constant	-189.979
A:Acetic	0.223094
B:Propionic	0.525812
AA	-0.0000783941
AB	0.0000116428
BB	-0.00115145



Analysis of Variance for YH2

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
A:Acetic	10.8532	1	10.8532	0.77	0.4290
B:Propionic	44.695	1	44.695	3.18	0.1490
AA	328.811	1	328.811	23.42	0.0084
AB	0.124051	1	0.124051	0.01	0.9296
BB	85.5827	1	85.5827	6.09	0.0690
blocks	114.106	1	114.106	8.13	0.0464
Lack-of-fit	277.277	3	92.4256	6.58	0.0501
Pure error	56.1706	4	14.0426		
Total (corr.)	879.697	13			

R-squared = 62.0952 percent

R-squared (adjusted for d.f.) = 38.4047 percent

Standard Error of Est. = 3.74735

Mean absolute error = 4.13682

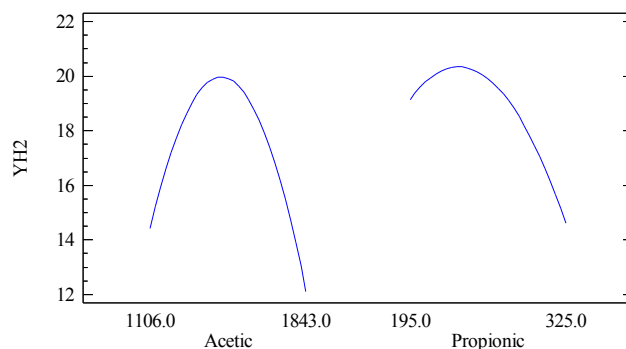
Durbin-Watson statistic = 2.61462 (P=0.7951)

Lag 1 residual autocorrelation = -0.327375

Regression coeffs. for YH2

Coefficient	Estimate
constant	-118.731
A:Acetic	0.139448
B:Propionic	0.328509
AA	-0.0000490043
AB	0.00000729941
BB	-0.000719447

Main Effects Plot for YH2

**Analysis of Variance for H2 production**

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
A:Acetic	2789.35	1	2789.35	1.68	0.2644
B:Propionic	186.808	1	186.808	0.11	0.7540
AA	10920.0	1	10920.0	6.58	0.0622
AB	1674.35	1	1674.35	1.01	0.3719
BB	2582.06	1	2582.06	1.56	0.2802
blocks	23841.2	1	23841.2	14.38	0.0192
Lack-of-fit	8961.88	3	2987.29	1.80	0.2865
Pure error	6634.0	4	1658.5		
Total (corr.)	57733.7	13			

R-squared = 72.9865 percent

R-squared (adjusted for d.f.) = 56.1031 percent

Standard Error of Est. = 40.7247

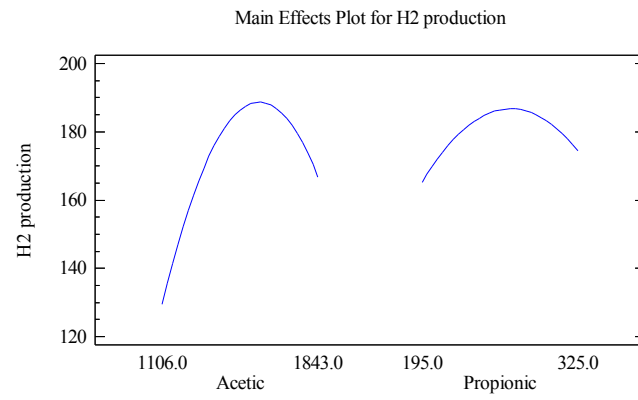
Mean absolute error = 28.0564

Durbin-Watson statistic = 2.82299 (P=0.9025)

Lag 1 residual autocorrelation = -0.46867

Regression coeffs. for H2 production

Coefficient	Estimate
constant	-462.975
A:Acetic	0.663104
B:Propionic	0.875712
AA	-0.000282405
AB	0.000848031
BB	-0.00395174



ANEXO 2. Datos obtenidos para la diversidad alfa utilizando el programa QIIME 1.6.0 (Pruebas variando la concentración de ácido acético y propiónico).

ID de la muestra	Números de adhesión NCBI SRA	Milielectrones equivalentes totales (meq/L)	Tasa de rendimiento de H ₂ (mmolH ₂ /gDQO _{rem})	Tasa de producción de H ₂ (mL/d/L _{react})	OTUs Observadas	Árbol filogenético completo de distancias métricas	Índice Chao1	Índice Shannon	Índice Simpson	Índice de equidad
PRIMER BLOQUE EXPERIMENTAL										
A1500/P250(C1)	SAMN02389562	247.08	12.43	265	533.10±7.01	35.27±0.59	968.37±50.71	7.43±0.02	0.98±0.00	0.82±0.00
A1500/P250(C2)	SAMN02389566	247.08	11.49	168	433.40±10.74	30.24±0.73	800.83±39.35	6.68±0.04	0.97±0.00	0.76±0.00
A1500/P250(C3)	SAMN02389568	247.08	12.56	170	475.90±8.70	32.97±0.58	849.68±73.67	7.17±0.03	0.98±0.00	0.81±0.00
A1843/P195	SAMN02389565	282.38	9.28	172	514.40±11.66	33.32±0.55	913.79±58.59	7.40±0.04	0.98±0.00	0.82±0.00
A1843/P325	SAMN02389563	306.95	9.02	256	250.90±9.80	20.25±0.49	469.16±42.13	4.39±0.05	0.79±0.00	0.55±0.00
A1106/P195	SAMN02389567	184.19	14.21	172	471.30±11.07	32.61±0.57	824.56±87.35	6.98±0.04	0.97±0.00	0.79±0.00
A1106/P325	SAMN02389564	208.76	12.11	171	456.30±17.40	32.26±0.83	771.45±74.72	7.01±0.07	0.98±0.00	0.79±0.00
SEGUNDO BLOQUE EXPERIMENTAL										
A1500/P250(C4)	SAMN02389569	247.08	24.36	159	308.30±8.67	25.60±0.49	558.59±64.86	4.08±0.06	0.67±0.01	0.49±0.01
A1500/P250(C5)	SAMN02389571	247.08	33.62	161	82.30±6.11	9.85±0.52	180.11±50.10	0.72±0.04	0.13±0.01	0.11±0.01
A1500/P250(C6)	SAMN02389572	247.08	24.64	187	371.80±6.648	28.05±0.53	632.92±33.44	5.88±0.04	0.92±0.00	0.68±0.00
A1500/P360	SAMN02389573	267.87	6.23	76	243.40±6.48	19.87±0.80	432.90±37.64	4.78±0.04	0.88±0.00	0.60±0.00
A2000/P250	SAMN02389570	313.70	5.46	66	259.50±1.72	21.60±0.46	551.38±64.26	4.75±0.05	0.84±0.00	0.59±0.01
A950/P250	SAMN02389575	173.81	6.18	27	175.40±12.06	16.45±0.82	374.76±58.05	2.10±0.07	0.39±0.01	0.28±0.01
A1500/P160	SAMN02389574	230.07	18.40	104	273.80±1.32	21.52±0.16	441.04±9.65	4.23±0.01	0.74±0.00	0.52±0.00

- Todos los índices métricos fueron calculados 10 veces para cada muestra a una profundidad de 2500 secuencias. ± representa la desviación estándar
- OTUs Observadas = Número de OTUs observadas después de remover los singletons
- Árbol filogenético completo de distancias métricas = Medida de la diversidad con base en la acumulación de la longitud de las ramas después de realizar el muestreo aleatorio
- Índice Chao1= Indica la riqueza
- Índices Shannon y Simpson= Otros índices de diversidad
- Equidad = Este muestra la uniformidad con la que se distribuyen los datos

ANEXO 3. Productividad Académica durante el Proyecto de Investigación.**Presentaciones en Congresos:**

1. XIV Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería
“Celdas electroquímicas microbianas, una nueva opción para el tratamiento de aguas residuales y la generación de hidrógeno”
Juriquilla, Querétaro. Del 19 al 24 de Junio del 2011. Presentación en cartel.
2. VI Congreso de Bioingeniería y Biotecnología del Sureste
“Uso de electrodos de carbón con tratamiento oxidativo en la formación de bioánodos para celdas de combustible microbiana”
Mérida, Yucatán. Del 24 al 26 de Octubre del 2012. Presentación oral.
3. 3rd IWA México Young Water Professionals
“Biohydrogen Production by Microbial Electrolysis Cells using a mixture of acetic acid and propionic acid”
San Luis Potosí, México. Del 24 al 26 de Abril del 2013. Presentación oral. Premio a mejor presentación oral.
4. 13th World Congress on Anaerobic Digestion, Recovering (bio) Resources for the World
“Hydrogen Production and Biofilm Bacterial Diversity in Microbial Electrolysis Cells Fed with a Mixture of Acetic and Propionic Acids”
Santiago de Compostela, España. Del 25 al 28 de Junio del 2013. Presentación en cartel.

Estancias de investigación:

Swette Center for Environmental Biotechnology de la *Arizona State University*. Uso de técnicas para caracterización de microorganismos. PCR en tiempo real y Pirosecuenciación Gen.

Artículos:

1. Vianey Ruiz, Zehra Esra Ilhan, Dae-Wook Kang, Rosa Krajmalnik-Brown, Germán Buitrón (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*. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jbiotec.2014.04.016>
2. Vianey Ruiz, Germán Buitrón. *“Effect of Acetic and Propionic Acids mixtures at different concentrations on Microbial Electrolysis Cells performance”*. En preparación.
3. Vianey Ruiz, Germán Buitrón. *“Hydrogen production by a MEC-MFC coupled system using a dark fermentation effluent as substrate”*. En preparación.