



MEDIO AMBIENTE
SECRETARÍA DE MEDIO AMBIENTE Y RECURSOS NATURALES



IMTA
INSTITUTO MEXICANO
DE TECNOLOGÍA DEL AGUA

**COORDINACIÓN DE GOBERNANZA DEL AGUA Y
FORTALECIMIENTO DE CAPACIDADES**

**SUBCOORDINACIÓN DE POSGRADO Y EDUCACIÓN
CONTINUA**

TESIS

**”PRODUCCIÓN DE BIO-HIDRÓGENO UTILIZANDO ALEACIONES METÁLICAS COMO
CÁTODOS DURANTE EL TRATAMIENTO DE AGUAS RESIDUALES DE ALTA CARGA
ORGÁNICA EN UN REACTOR ANAEROBIO BIO-ELECTROQUÍMICO (RABE)”**

que para obtener el grado de

Doctor en Ciencias y Tecnología del Agua

presenta

Manuel Posadas Hernández

Tutor: Dr. Edson Baltazar Estrada Arriaga

Jiutepec, Morelos

Año: 2023

F.C4.03.44.1

Paseo Cuauhnáhuac No. 8532, Col. Progreso, C.P. 62550, Jiutepec, Morelos.
Tel.: (777) 329 36 00 www.gob.mx/imta





Con fundamento en los artículos 21 y 27 de la Ley Federal del Derecho de Autor y como titular de los derechos moral y patrimoniales de la obra titulada "Producción de bio-hidrógeno utilizando aleaciones metálicas como cátodos durante el tratamiento de aguas residuales de alta carga orgánica e un reactor anaerobio bio-electroquímico (RABE)", otorgo de manera gratuita y permanente al Instituto Mexicano de Tecnología del Agua, autorización para que fijen la obra en cualquier medio, incluido el electrónico, y la divulguen entre su personal, estudiantes o terceras personas, sin que pueda percibir por tal divulgación una contraprestación.

Manuel Posadas Hernández

Jiutepec, Mor. 8 de agosto de 2023





MEDIO AMBIENTE



IMTA

DOCTORADO EN CIENCIAS Y TECNOLOGÍA DEL AGUA

Comité tutorial integrado por:

Dra. Petia Mijaylova Nacheva
Dra. Jennifer Alexis Bañuelos Díaz
Dr. Edson Baltazar Estrada Arriaga
Dra. Sasirot Khankure
Dra. Silvia Lucila Gejover Santiago

Director de tesis

Dr. Edson Baltazar Estrada Arriaga

Jutepec, Morelos, México, agosto 2023
Instituto Mexicano de Tecnología de Agua



Escaneado con CamScanner

Contenido

Portada-----	1
Créditos institucionales -----	2
Agradecimientos -----	3
Contenido -----	4
Índice de figuras -----	7
Índice de tablas -----	9
Abreviaturas-----	10
Resumen-----	11
Abstract-----	13
Introducción-----	15
Capítulo 1. Marco teórico-----	20
1.1. Diversidad de microorganismos como biocatalizadores productores de H ₂ -----	20
1.2. Métodos de producción de biohidrógeno-----	20
1.3. Fundamentos de la producción biológica de hidrógeno mediante Biofotólisis---	21
1.4. Biofotólisis directa-----	22
1.5. Biofotólisis indirecta-----	23
1.6. Fundamentos de la producción de hidrógeno por fermentación-----	24
1.6.1. Fermentación oscura-----	25
1.7. Producción híbrida de hidrógeno biológico mediante procesos electroquímicos--	27
1.7.1. Celdas de combustible microbianas (CCMs)-----	27
1.7.2. Celda des electrólisis microbianas (MECs)-----	28
1.8. Bacterias utilizadas en los sistemas bioelectroquímicos (SBEs) y transferencia electronica-----	32
1.9. Vinaza como contaminante-----	35
1.10. Melaza como residuo contaminante-----	36
1.11. Suero de leche o Lactosuero-----	36
1.12. Caracterización de la Actividad Bioelectroquímica-----	37
1.12.1. Potencial a Circuito Abierto-----	37
1.12.2. Voltametría de barrido lineal-----	38
1.12.3. Impedancia electroquímica galvanostática (Eisgalv)-----	38
1.13. Factores que afectan la producción de hidrógeno en una MEC-----	38
1.13.1. Arquitectura del reactor-----	38
1.13.2. Materiales de construcción de los electrodos-----	41
1.14. Resistividad eléctrica de los materiales conductores-----	42
1.15. Relación entre el área de los electrodos y el volumen del líquido-----	43
1.16. Reacción de evolución del H ₂ sobre el Ni como catalizador-----	43
1.17. Materiales usados para los cátodos-----	45
1.17.1. Cátodos de malla de acero inoxidable-----	45
1.17.2. Cátodos de Cobre y Níquel-----	46
1.18. Análisis del depósito de Ni-----	46
1.19. Tratamientos para modificar la superficie de los electrodos-----	46
1.19.1. Tratamiento del fieltro-----	47
1.19.2. Tratamiento del cátodo de Cobre-----	47
1.19.3. Tratamiento del cátodo de Fe-----	47
1.16.4. Tratamiento del cátodo de Malla # 60 de acero inoxidable-----	47
1.20. Composición química de la solución o sustrato-----	47
1.21. Operación en modo batch o de flujo continuo de la celda-----	47

1.22. Inóculo-----	48
1.22.1 Pre-tratamientos del inóculo-----	48
1.22.1.1. Tratamiento térmico-----	48
1.22.1.2. Tratamiento ácido-----	48
1.22.1.3. Tratamiento químico-----	49
1.22.1.4. Otros tratamientos-----	49
1.22.2. Análisis realizados a los inóculos-----	49
1.22.3. Relación de inóculo con respecto al volumen del sustrato-----	49
1.22.4. Determinación de la comunidad microbiana en el inóculo-----	49
Capítulo 2. Antecedentes	
2.1. Tratamiento de Aguas Residuales-----	51
2.1.1 Aguas residuales y biorrefinería-----	52
2.1.2. Parámetros que afectan el diseño de sistemas MEC para el tratamiento de--- aguas residuales	52
2.2. Hidrógeno biológico fermentativo-----	53
2.3. Hidrógeno producido en una MEC mediante electro-fermentación-----	54
2.4. Comparación entre la Tecnología MEC y la Electrólisis del Agua-----	56
2.5. Escalamiento-----	56
2.6. Ánodos y cátodos usados en la producción de hidrógeno-----	58
2.7. Aguas sintéticas utilizadas para la producción de hidrógeno-----	59
2.8. Aguas sintéticas de diferentes concentraciones y diferentes conductividades----- eléctricas	60
2.9 Antecedentes en la producción de biohidrógeno fermentativo, biohidrógeno----- producido en una MEC utilizando níquel y sus aleaciones como cátodos con aguas residuales reales y escalamiento de las MEC.	60
Capítulo 3. Hipótesis, objetivos, justificación y metodología	
3.0. Hipótesis-----	63
3.1. Objetivo General-----	63
3.2. Objetivos específicos-----	63
3.3. Justificación-----	63
3.4. Metodología-----	63
3.4.1. Plan de investigación-----	64
3.4.2. Primera etapa, obtención del Inóculo -----	65
3.4.3. Diseño del experimento y Matriz de experimentación-----	65
3.4.4. Materiales de los electrodos-----	67
3.4.5. Tratamiento de los electrodos-----	67
3.4.6. Configuración y funcionamiento de la MEC (agua sintética) -----	67
3.4.7. Análisis físico-químico, cromatográfico y cálculos-----	69
3.4.8. Cálculos energéticos-----	69
3.4.9. Caracterización electroquímica-----	70
3.4.10. Microscopía de barrido electrónico (SEM)-----	71
3.4.11. Arranque y operación de la MEC con aguas reales (Melaza, Vinaza y Lactosuero) -----	71
3.4.12. Arranque y funcionamiento del RABE-----	72
Capítulo 4. Investigación del inóculo	
4.1. Inóculo, plan de trabajo-----	73
4.2. Obtención de las fuentes ambientales del inóculo-----	73
4.3. Pretratamientos para el inóculo-----	74
4.4. Identificación de bacterias esporulantes productoras de hidrógeno-----	75
4.4.1. Pasos para el sembrado de bacterias-----	75
4.4.2. Identificación microbiológica -----	75

4.5. Pasos para la técnica de Gram-----	76
4.6. Pasos para la técnica de Wirtz-Conklin-----	76
4.7. Agares para el cultivo de bacterias provenientes del inóculo-----	77
4.7.1. Esterilización de agares-----	78
4.8. Diluciones para el cultivo bacteriano utilizadas -----	78
4.9. Sembrado de los agares (sembrado por dilución) -----	79
4.10. Incubación de los agares inoculados con las fuentes ambientales pretratadas-----	79
4.11. Poder de esporulación de los tres diferentes inóculos estudiados-----	80
4.12. Tinción Gram vista al microscopio -----	81
4.13. Técnica Wirtz-Conklin vista al microscopio -----	82
4.14. Aislamiento e identificación bacteriana-----	82
4.14.1. Aislamiento bacteriano para purificar la colonia-----	82
4.14.2. Identificación del género bacteriano de las bacterias predominantes-----	83
4.15. Análisis del ADN en la muestra de cultivo bacteriano aislado-----	84
4.16. Conclusiones del inóculo-----	85
Capítulo 5. Producción de hidrógeno en una MEC con un agua residual sintética	
5.1 Resultados y discusión-----	86
5.2. Producción de biohidrógeno y remoción de la DQO in la MEC usando diferentes materiales y configuraciones de los electrodos-----	86
5.3. Producción de VFAs y contenido de biogás-----	90
5.4. Recuperación de energía-----	93
5.5. Potenciales de inicio de la HER y tasa de producción de amperaje-----	94
5.6. Valores de la Ecuación de Gompertz obtenidos en las diferentes MECs-----	95
5.7. Espectroscopia de impedancia electroquímica-----	101
5.8. Circuito de potencial abierto (OCP)-----	104
5.9. Análisis de barrido electrónico (SEM)-----	105
5.10. Conclusiones de la investigación con agua sintética a nivel laboratorio-----	106
5.11 Referencias -----	107
Capítulo 6. Producción de hidrógeno en una MEC con agua residual real	
6.1. Resultados y discusión para la experimentación en una MEC utilizando aguas reales-----	110
6.1.1. Configuración de los electrodos y valores paramétricos de la Ecuación de Gompertz en una MEC con aguas residuales reales -----	110
6.2. Producción de H ₂ y remoción de DQO -----	111
6.3. Generación de VFAs y composición del biogás -----	112
6.4. Recuperación energética-----	115
6.5. Análisis electroquímico -----	117
6.5.1. Voltametría de barrido lineal (LSV)-----	117
6.5.2. Impedancia galvanostática electroquímica (Eisgalv)-----	117
6.5.3. Potencial de circuito abierto (OCP) -----	118
6.6. Valores de pH obtenidos en la MEC durante el tratamiento de un agua residual real -----	119
6.7. Conclusiones de la investigación con aguas reales a nivel laboratorio-----	123
6.8. Referencias-----	123
Capítulo 7 Obtención de hidrógeno en un RABE usando aguas residuales reales	
7.1. Resultados y discusión-----	124
7.2. Producción de biohidrógeno y remoción de DQO en los RABEs-----	124
7.3. Generación de VFAs y contenido de biogás-----	126
7. 4. Análisis electroquímico -----	128
7.4.1. Voltametría de barrido lineal (LSV) -----	128
7.4.2. Impedancia galvanostática electroquímica (Eisgalv)-----	128

7.4.3. Potencial de circuito abierto (OCP)-----	129
7.5. Recuperación de energía-----	130
7.6. Conclusiones de la investigación con aguas reales utilizando un RABE-----	134
7.7. Conclusiones generales-----	134
7.8. Referencias-----	135
7.9. Bibliografía-----	135
<i>Indice de figuras</i>	
Figura 1. Esquema de la diversidad biológica de microorganismos productores de Hidrógeno-----	21
Figura 2. Representación esquemática de las rutas biológicas para la producción de H ₂ -----	22
Figura 3. Representación esquemática de la producción fotobiológica de H ₂ y su uso en una celda de combustible microbiana-----	23
Figura 4. Biofotólisis directa de microalgas o cianobacterias-----	19
Figura 5. Esquema de una celda de combustible microbiana (CCM) de 2 cámaras con una membrana de separación entre ambas-----	29
Figura 6. Esquema típico de una MEC de dos cámaras-----	30
Figura 7. Esquema de los mecanismos de transferencia de electrones: directo (A y B) e indirecto (C)-----	33
Figura 8. Tipos de bacterias exoelectrogénicas -----	34
Figura 9. Clasificación de diferentes sustratos usados en celdas de electrólisis microbianas (MEC) -----	35
Figura 10. Aspecto del suero de leche (a), vinaza tequilera (b) ----- y melaza de caña (c).	36
Figura 11. Curva de potencial de circuito abierto (OCP) para un Sistema bioelectroquímico -----	37
Figura 12. Voltametría de barrido lineal-----	38
Figura 13. Esquemas e imágenes de MECs con membrana de separación (A) y sin membrana (B y C) -----	39
Figura 14. Resistividades de diferentes materiales -----	43
Figura 3.1. Esquema del diseño del plan de investigación para la producción de H ₂ utilizando aguas residuales reales (Melaza, vinaza y lactosuero) -----	64
Figura 3.2. Arreglo del experimento en una MEC sin membrana y de una sola cámara	68
Figura 3.3. Esquema de los RABEs y el arreglo de los electrodos-----	72
Figura 4.1. Diagrama de flujo para el tratamiento del inóculo -----	73
Figura 4.2. Muestra de LGA (A), rumen (B) estiércol de vaca (C)-----	73
Figura 4.3. Aspecto físico de las tres fuentes ambientales -----	74
Figura 4.4. Muestras del estiércol de vaca, rumen y LGA-----	74
Figura 4.5. Técnica de Gram (izq.) y vista al microscopio (der.) -----	76
Figura 4.6. Tinción de Wirtz-Conklin (izq.) y vista al microscopio (der.) (100x) -----	77
Figura 4.7. Preparación de los agares. A) Polvo de agar, B) agar base sangre, C) muestras de sangre humana, D) agar base sangre +sangre humana -----	78
Figura 4.8. Autoclave para esterilización a alta presión (15 psi) -----	78
Figura 4.9. Preparación del agua de dilución -----	79
Figura 4.10. Preparación de las diluciones -----	79
Figura 4.11. Sembrado de agares: A) agregado del inóculo, B) agregado del agar base Sangre + sangre humana, C) agregado del agar base sangre-----	79
Figura 4.12. Agares solidificados listos para su incubación. -----	80
Figura 4.13. Cámara de anaerobiosis (Agares en incubación a 37 °C) -----	80
Figura 4.14. Crecimiento bacteriano de a) Estiércol de vaca, b) Rumen de vaca -----	80
Figura 4.15. Crecimiento bacteriano de LGA -----	81

Figura 4.16. Cajas Petri sin crecimiento bacteriano -----	81
Figura 4.17. Cajas Petri con gran crecimiento bacteriano -----	81
Figura 4.18. Observación al microscopio de bacterias del LGA (mayoría Gram+) (40x) -----	81
Figura 4.19. Bacterias con Tinción Gram, A) LGA, B) estiércol de vaca, C) rumen de vaca -----	82
Figura 4.20. Bacterias Tinción de esporas: A) LGA, B) rumen de vaca C) estiércol de vaca -----	82
Figura 4.21. Lodo granular anaerobio, tinción de esporas con verde de malaquita -----	82
Figura 4.22. Primer aislamiento bacteriano a partir de la muestra de LGA con mayor crecimiento -----	83
Figura 4.23. Crecimiento bacteriano del primer aislamiento (obsérvese que aún no se obtiene una colonia aislada) -----	83
Figura 4.24. Crecimiento bacteriano del 2do. Aislamiento (Frotis tomado del 1er. aislamiento) -----	83
Figura 4.25. Crecimiento bacteriano del 3er. Aislamiento (frotis tomado del 2º. Aislamiento) -----	83
Figura 4.26. Crecimiento bacteriano en el 4º aislamiento para su identificación mediante técnica de PCR -----	84
Figura 5.1. Producción de biohidrógeno en una MEC usando diferentes configuraciones y electrodos -----	89
Figura 5. 2. Generación de VFAs (a) y contenido de biogás (b) durante el tratamiento de un agua residual de alta concentración en una MECs usando diferentes electrodos y diferentes configuraciones -----	92
Figura 5. 3. Voltametrías de barrido lineal para MECs bióticas (a) y MECs abióticas (b) -----	100
Figura 5. 4. Producción de densidad de corriente en las MECs durante el tratamiento de un agua residual de alta concentración -----	101
Figura 5.5. Gráficos de Nyquist para la determinación de la resistencia de transferencia de carga catódica -----	103
Figura 5. 6. Gráficos de OCP vs tiempo para análisis biótico (a), y abiótico (b) durante el tratamiento de un agua residual de alta concentración -----	105
Figura 5. 7. Imágenes del SEM para el cátodo Cu/Ni (a, b) y el ánodo SS304 malla plisada #60 (c, d y e) -----	106
Figura 6.1. Producción de hidrógeno acumulado durante el tratamiento de un agua residual real de alta concentración -----	112
Figura 6.2. Remoción de DQO y volumen de hidrógeno producido por día (HPR) para las seis MECs -----	112
Figura 6.3. Remoción de VFAs en el tratamiento de un agua residual real de alta concentración en una MEC -----	115
Figura 6.4. Composición del biogás durante el tratamiento de un agua residual de alta concentración en una MEC -----	115
Figura 6. 5. Análisis de Voltametría de barrido lineal realizado a tres aguas residuales reales de alta concentración durante el tratamiento en una MEC -----	117
Figura 6 .6. Valores de Impedancia galvanostática electroquímica (Eisgalv) obtenidas en el tratamiento de un agua residual en una MEC -----	118
Figura 6. 7. Valores de Potencial de circuito abierto (OCP) para seis MECs durante el tratamiento de un agua residual real -----	119
Figura 6. 8. pH inicial y final de un agua residual real durante el tratamiento en una MEC -----	120
Figura 7. 1. Volúmenes de hidrógeno acumulado en los RABEs durante el tratamiento de un agua residual real -----	125
Figura 7.2. HPR y % de remoción de DQO obtenida en los RABEs durante -----	

el tratamiento de un agua residual real -----	126
Figura 7. 3. VFAs generados durante el tratamiento en un RABE de un agua residual real -----	127
Figura 7.4. Densidades de corriente desarrolladas en los RABEs durante el tratamiento de un agua residual real -----	128
Figura 7.5. Valores de Impedancia galvanostática electroquímica (Eisgalv) generados en el tratamiento de un agua residual real realizados en un RABE -----	129
Figura 7.6. Valores de OCP generados en un RABE durante el tratamiento el tratamiento de un agua residual real -----	130

Índice de tablas

Tabla 1. Rutas biológicas para la producción de H ₂ y sus limitaciones técnicas-----	27
Tabla 2. Producción de hidrógeno en una celda de electrólisis microbiana-----	29
Tabla 3. Resistividades de diferentes materiales-----	42
Tabla 2.1. Rango de la demanda química de oxígeno (DQO) para las aguas residuales industriales con el tiempo de retención hidráulico (TRH) requerido -----	53
Tabla 2.2. Producción de H ₂ y valores paramétricos -----	58
Tabla 2.3. Aguas sintéticas utilizadas por diferentes investigadores para producir H ₂ en una MEC -----	59
Tabla 2.4. Composiciones de agua sintética de diferentes concentraciones y Conductividades eléctricas -----	60
Tabla 3.1. Diseño del experimento y fraccionamiento a ¼ del total de experimentos –	66
Tabla 4.1. Diluciones usadas para el cultivo bacteriano en agar -----	78
Tabla 4.2. Identificación de los géneros y especies bacterianas encontrados en el Lodo granular anaerobio, después de recibir un pretratamiento térmico y cultivado en agar sangre -----	85
Tabla 5. 1. La ecuación de Gompertz se usó para calcular los valores de máxima velocidad de producción de H ₂ (R _{max}), máxima producción de H ₂ (H _{máx}) y duración de la fase lag (λ) para todas las MECs -----	95
Tabla 5.2. Resumen de las eficiencias energéticas de las MECs de aguas residuales de alta concentración -----	96
Tabla 5.3. Comportamiento de las MECs durante el tratamiento de un agua residual de alta concentración -----	97
Tabla 6.1. Configuración de los electrodos en la MECs -----	110
Tabla 6.2. Valores paramétricos de la Ec. de Gompertz para las MECs con aguas residuales reales -----	110
Tabla 6.3. Principales parámetros energéticos evaluados en una MEC durante el tratamiento de un agua residual real de alta concentración -----	116
Tabla 6.4. Parámetros energéticos de las MECs durante el tratamiento de un agua residual de alta concentración -----	121
Tabla 6.5. Desempeño de las MECs durante el tratamiento de diferentes aguas residuales reales -----	122
Tabla 7.1. Arreglo de los electrodos en los RABEs -----	124
Tabla 7.2. Parámetros energéticos de los RABEs durante el tratamiento de un agua residual de alta concentración -----	132
Tabla 7.3. Rendimiento de los RABEs durante el tratamiento de aguas reales -----	133

Abreviaturas de los términos utilizados en la investigación

<p>AGS.-siglas en inglés de Lodo granular anaerobio</p> <p>AGV.-Ácido graso volátil. Es un compuesto orgánico, derivado del metabolismo celular microbiano</p> <p>BES.-siglas en inglés de sistema bioelectroquímico</p> <p>Biocombustible.- Son combustibles derivados de fuentes orgánicas como la biomasa y residuos orgánicos.</p> <p>Biomasa.-Es la fracción biodegradable de los productos, residuos y desechos de origen biológico procedentes de actividades agrarias</p> <p>CD.-siglas en inglés de densidad de corriente, que es la corriente que pasa a través del área transversal del electrodo</p> <p>CE.-Conductividad eléctrica, es la medida de la capacidad de un material o sustancia para dejar pasar la corriente eléctrica a través de él.</p> <p>DQO.- Determina la cantidad de oxígeno requerido para oxidar la materia orgánica presente en una muestra de agua</p> <p>ΔDQO.-Es la DQO consumida durante la degradación de la materia orgánica</p> <p>EAB.-Siglas en inglés de Bacterias electro activas</p> <p>EC.-Eficiencia culómbica, es la relación entre los electrones recuperados como corriente eléctrica y los electrones disponibles en la materia orgánica presente en el sustrato de la celda.</p> <p>Eisgalv.- Impedancia galvánica. Es la resistencia que se genera en un circuito eléctrico cuando una corriente alterna intenta transitar a través de ella.</p> <p>FO.-Fermentación oscura</p> <p>HER.-Reacción de evolución del hidrógeno $8\text{H}^+ + 8\text{e} \xrightarrow{-0.5-1.0\text{ V}} 4\text{H}_2$</p>	<p>HRT.-Tiempo de retención hidráulico</p> <p>HPR.-Tasa diaria de producción de hidrógeno</p> <p>LSV.-Voltametría de barrido lineal</p> <p>MEC.-Celda de electrólisis microbiana</p> <p>η_{th}.-Hidrógeno teórico debido a la DQO consumida</p> <p>η_{CE}.-Moles de hidrógeno debidas al voltaje aplicado</p> <p>OCP.-Potencial de circuito abierto</p> <p>OER.-Energía total recuperada ($\eta_{\text{E+S}}$)</p> <p>PCR.- Reacción en cadena de la polimerasa</p> <p>pH.-Medición del grado de acidez o alcalinidad de una solución</p> <p>Potencial eléctrico.-Es el voltaje aplicado o generado en un circuito eléctrico.</p> <p>r_{cat}.-Recuperación de biohidrógeno catódico (cociente de moles de H₂ producido entre los moles de H₂ debidos al voltaje aplicado.</p> <p>RABE.-Reactor anaerobio bio-electroquímico</p> <p>RE.-Resistividad eléctrica.-Es la fuerza con la que un material dado se opone al flujo de corriente eléctrica.</p> <p>Sobrepotencial.-Término electroquímico de la diferencia de potencial (en voltios) entre una semirreacción por su potencial termodinámico de reducción y el potencial en que se observa experimentalmente el proceso redox.</p> <p>W_{E} (kWh).- es la energía eléctrica aplicada</p> <p>W_{H_2} (kWh).-Recuperación de energía a partir del H₂</p> <p>W_{S} (kWh).- W_{S} en kWh es el contenido energético de la DQO consumida.</p>
--	---

“La imaginación es más importante que el conocimiento, porque el conocimiento se limita a todo lo que ahora sabemos y entendemos, mientras que la imaginación abarca todo el mundo y todo lo que siempre habrá que conocer y comprender”

Albert Einstein

Resumen

El desarrollo e implementación de tecnologías bioelectroquímicas para la generación de energías verdes es un factor clave para la protección del medio ambiente. El uso de celdas de electrólisis microbiana (MEC por sus siglas en inglés) para la producción de biohidrógeno a partir de aguas residuales con alto contenido de materia orgánica es de gran interés. La selección de un mejor material de electrodo y los estudios de las actividades electrocatalíticas de los electrodos son cruciales para aumentar la producción de biohidrógeno en una MEC. Esta tesis doctoral se enfocó en encontrar el mejor inóculo productor de biohidrógeno a partir del estudio de tres matrices ambientales, el par de electrodos que aumentarían la producción de biohidrógeno más allá de 50 m³/m³RD (Jeremiasse, *et al.*, 2011) utilizando como sustrato un agua residual con alto contenido de materia orgánica, en una celda de electrólisis microbiana (MEC por sus siglas en inglés) y escalar las mejores condiciones a un reactor anaerobio bioelectroquímico (RABE) de un volumen de 15 litros. La experimentación se realizó en cuatro etapas. Las tres primeras etapas se estudiaron en un volumen de 0.250 L, mientras que la cuarta y última etapa se desarrolló a un volumen de 15 litros. Las etapas estudiadas fueron las siguientes: 1) escogencia de un inóculo productor de biohidrógeno, 2) estudio de varios pares de electrodos, propuestos en base a los valores de resistividad de diferentes metales conductores usados como cátodos y su desempeño en una MEC usando agua residual sintética, 3) estudio del desempeño de los dos mejores pares de electrodos (provenientes del estudio con agua sintética) usando aguas reales de alta concentración (melaza, vinaza y lactosuero) y 4) estudio del desempeño de los electrodos del punto número 3 en un RABE de 15 litros usando aguas reales (melaza, vinaza y lactosuero).

La primera etapa consistió en el estudio de tres matrices ambientales (rumen de vaca, estiércol de vaca y lodo granular anaerobio) para escoger el mejor inóculo productor de biohidrógeno. La comunidad bacteriana desarrollada en el AGS tratado según el análisis filogenético basado en secuencias de ADNr 16S fueron los géneros *bacillus* y *anoxybacillus* con las siguientes especies: *paralicheniformis*, *licheniformis*, *sonorensis*, *haynesii*, *glicinifermentans* y *Anoxybacillus*.

En la segunda etapa y utilizando el AGS como inóculo de preferencia, se estudió la producción de biohidrógeno en una MEC de cámara única sin membrana (con un volumen de 0.250 L) alimentado con agua residual sintética con alto contenido de materia orgánica utilizando diferentes materiales y configuraciones de electrodos. Malla plana #60 de acero inoxidable (M1), malla plisada #60 de acero inoxidable 304 (M2) y fieltro de grafito (GF) se utilizaron como ánodos, por otro lado, la barra de cobre recubierta con níquel (Cu/Ni), malla plana #60 de acero inoxidable 304 (M1) y barra de hierro (Fe) se utilizaron como cátodos. Las MECs se alimentaron con agua residual sintética con una demanda química de oxígeno (DQO) de 18 g/L en modo discontinuo o por lote, con un voltaje aplicado de 0.8 V. El proceso de electrofermentación (EF) realizado en las diferentes MECs alimentadas con agua residual

de alta concentración, generó la producción de biohidrógeno y la eliminación de DQO significativamente más altas en comparación con el reactor de fermentación oscura convencional. La máxima tasa de producción de hidrógeno (HPR por sus siglas en inglés) obtenida fue de $314 \text{ m}^3 \text{ H}_2/\text{m}^3_{\text{RD}}$, utilizando la configuración de electrodos M2-M1 a 4 cm de distancia entre electrodos con una remoción de DQO del 79%. Bajo esta condición, la eficiencia de recuperación catódica (r_{cat}) y la recuperación total de biohidrógeno (r_{H_2}) fue de 1783 y 340% respectivamente. Para el reactor de fermentación oscura (FD), el HPR fue de $0.25 \text{ m}^3 \text{ H}_2/\text{m}^3_{\text{RD}}$ y se obtuvo una eliminación de DQO del 5.4%. La voltametría cíclica (CV), la voltametría de barrido lineal (LSV), la espectroscopia de impedancia electroquímica (Eisgalv) y el potencial de circuito abierto (OCP) mostraron que la configuración de electrodos M2-M1 y M2-Cu/Ni tenían la actividad catalítica más alta en comparación con las otras configuraciones de electrodos durante la producción de biohidrógeno. El potencial de inicio para la reacción de evolución de hidrógeno (HER) en la configuración de electrodos M2-M1 (0.60 V) fue significativamente menor que la configuración de los electrodos GF-GF (0.79 V).

Como tercera etapa de la experimentación, se estudiaron la producción de biohidrógeno y la actividad electrocatalítica de dos electrodos diferentes: malla plisada #60 de acero inoxidable 304 (M2) como ánodo y como cátodos Cu dopado con Ni (Cu/Ni) y malla plana #60 de acero inoxidable 304 (M1) en una MEC de cámara única sin membrana (volumen igual a 0.250 L) alimentada con vinaza, melaza o lactosuero como sustrato de aguas residuales reales y lodo granular anaerobio (AGS) como inóculo. Bajo un voltaje aplicado de 0.8 V (Ag/AgCl), la mayor producción obtenida de hidrógeno fue de $392 \text{ m}^3/\text{m}^3_{\text{RD}}$ utilizando melaza (17.2 g/L de DQO inicial) como sustrato, M2 como ánodo y Cu/Ni como cátodo con 2 cm de separación. La eficiencia de recuperación catódica (r_{cat}) y la recuperación de energía total ($\eta_{\text{E+S}}$) fueron 2799.12 y 470.1% respectivamente. El análisis de voltamperometría de barrido lineal del par M2-Cu/Ni tuvo la densidad de corriente más alta (107 A/m^2) en comparación con la otra configuración de electrodos de matriz durante la producción de biohidrógeno. La remoción de DQO obtenida fue del 73.05%.

En la cuarta y última etapa de la experimentación, se estudió la producción de biohidrógeno y la actividad electrocatalítica de dos electrodos diferentes: malla plisada #60 de acero inoxidable 304 (M2) como ánodo, Cu dopado con Ni (Cu/Ni) y malla plana #60 de acero inoxidable (M1) como cátodos, usando un reactor anaerobio bioelectroquímico de cámara única y sin membrana (RABE) con un volumen de 15 L, alimentado con Vinaza, Melaza o Suero como sustrato de agua residual real y lodo granular anaerobio (AGS) como inóculo. Se usó un voltaje aplicado de 0.8 V (Ag/AgCl como electrodo de referencia), la mayor producción obtenida de hidrógeno fue de $156 \text{ m}^3/\text{m}^3_{\text{RD}}$ utilizando melaza (18 g/L de DQO inicial) como sustrato, M2 como ánodo y Cu/Ni como cátodo con 2 cm de separación entre electrodos. La eficiencia de recuperación catódica (r_{cat}) y la recuperación de energía total ($\eta_{\text{E+S}}$) fueron 2606 y 4.81% respectivamente. El análisis de voltametría de barrido lineal del par M2-Cu/Ni tuvo la segunda densidad de corriente más alta (63 A/m^2) en comparación con la otra configuración de electrodos durante la producción de biohidrógeno. La remoción de DQO obtenida fue del 36,07%. La comunidad de bacterias desarrollada en el AGS tratado, fue la misma que en los otros experimentos.

Abstract

The development and implementation of bioelectrochemical technologies for generation of green energies is a key factor for the protection of the environment. The use of microbial electrolysis cells (MEC) for biohydrogen production using wastewater with a high content of organic matter is of great interest. The selection of a better electrode material and studies of the electrocatalytic activities of the electrodes are crucial to increase the biohydrogen production in a MEC. This doctoral thesis focused on finding the best biohydrogen-producing inoculum from the study of three environmental matrix, the pair of electrodes that will increase biohydrogen production beyond 50 m³/m³Rd (Jeremiasse, et al., 2011) using as substrate a wastewater with a high content of organic matter, in a microbial electrolysis cell (MEC) and scale the best conditions to an anaerobic bioelectrochemical reactor (BEAR) with a volume of 15 liters. The experimentation was carried out in four stages. The first three stages were studied in a volume of 0.250 L, while the fourth and last stage was developed in a volume of 15 liters. The stages studied were the following: 1) choice of a biohydrogen-producing inoculum, 2) study of several pairs of electrodes, proposed based on the resistivity values of different conductive metals used as cathodes and their performance in a MEC using synthetic residual water, 3) performance of the two best pairs of electrodes using real water with a high content of organic matter (molasses, vinasse and whey) and 4) study of the performance of the electrodes of point number 3 in a 15-liter RABE using real waters (vinasse molasses and whey).

The first stage consisted of the study of three environmental matrix (cow rumen, cow dung and anaerobic granular sludge) to choose the best biohydrogen-producing inoculum.

The bacteria community developed in the treated AGS according to phylogenetic analysis based on 16S rDNA sequences were *the genera bacillus and anoxybacillus* with the following species: *paralicheniformis*, *licheniformis*, *sonorensis*, *haynesii*, *glycinifermentans* and *Anoxybacillus*.

In the second stage and using the AGS as the preferred inoculum, biohydrogen production was studied in a MEC with a single chamber without a membrane (with a volume of 0.250 L) fed with synthetic wastewater with a high content of organic matter using different materials and electrode configurations. Stainless steel304 (SS) flat mesh 60 (M1), SS304 pleated mesh 60 (M2), and graphite felt (GF) were used as anode, and copper (Cu) bar coated with nickel (Ni) (Cu/Ni), SS304 flat mesh 60 (M1) and iron bar (Fe) were utilized as cathodes. The MEC was fed with synthetic wastewater with chemical oxygen demand (COD) of 18 g/L under batch mode at voltage input of 0.8 V. The electro-fermentation (EF) process carried out in the different MECs fed with high-strength wastewater was significantly higher biohydrogen production and COD removal compared to conventional dark fermentation reactor. The maximum hydrogen production rate (HPR) obtained was 314 m³ H₂/m³RD, using the electrode configuration M2-M1 at 4 cm of electrode distance with a high COD removal of 79%. Under this condition the cathodic recovery efficiency (r_{cat}) and overall biohydrogen recovery (r_{H_2}) was 1,783 and 340% respectively. For dark fermentation (DF) reactor, the HPR was 0.25 m³ H₂/m³RD and COD removal of 5.4% was obtained. Cyclic voltammetry, linear sweep voltammetry, electrochemical impedance spectroscopy, and open circuit potential showed that the electrode configuration M2-M1, and M2-Cu/Ni had the highest catalytic activity compared with the other array electrode configurations during the biohydrogen production. The onset potential for the hydrogen evolution reaction (HER) in

the electrode configuration M2-M1, (0.60 V) was significantly lower than electrode configuration GF-GF (0.79 V).

As a third stage of the experimentation, the production of biohydrogen and the electrocatalytic activity of two different electrodes were studied: pleated SS mesh (M2) as anode and Cu/Ni doped (Cu/Ni) and flat SS mesh as cathodes (M1) in a membrane-less single-chamber MEC (volume equal to 0.250 L) fed with Vinasse, molasse or Whey as real wastewater substrate and anaerobic granular sludge (AGS) as inoculum. Under an applied voltage of 0.8 V (Ag/AgCl), the highest production obtained for hydrogen was $392 \text{ m}^3/\text{m}^3_{\text{RD}}$ using molasse (17.2 g/L of initial COD) as substrate, M2 as anode and Cu/Ni as cathode with 2 cm of separation. Cathodic recovery efficiency (r_{cat}) and overall energy recovery ($\eta_{\text{E+S}}$) were 2799.12 and 470.1% respectively. Linear sweep voltammetry analysis of pair M2-Cu/Ni had the highest current density (107 A/m^2) compared with the other array electrode configuration during the bio-hydrogen production. COD removal obtained was 73.05%.

In the fourth and final stage of the experimentation, the production of biohydrogen and the electrocatalytic activity of two different electrodes were studied: pleated SS mesh (M2) as anode and Cu/Ni doped (Cu/Ni) and flat SS mesh as cathodes (M1) in a membrane-less single-chamber (RABE with a volume of 15 L) fed with Vinasse, molasse or Whey as real wastewater substrate and anaerobic granular sludge (AGS) as inoculum. Under an applied voltage of 0.8 V (Ag/AgCl as reference electrode), the highest production obtained for hydrogen was $156 \text{ m}^3/\text{m}^3_{\text{RD}}$ using molasse (18 g/L of initial COD) as substrate, M2 as anode and Cu/Ni as cathode with 2 cm of separation. Cathodic recovery efficiency (r_{cat}) and overall energy recovery ($\eta_{\text{E+S}}$) were 2606 and 4.81% respectively. Linear sweep voltammetry analysis of pair M2-Cu/Ni had the second highest current density (63 A/m^2) compared with the other array electrode configuration during the bio-hydrogen production. COD removal obtained was 36.07%. The bacteria community developed in the treated AGS was same as in the other before experimentations.

Introducción

Uno de los grandes cambios urgentes que requiere la humanidad en la actualidad, es el de obtener nuevas fuentes de energía renovables y que, además, sean amigables con el medio ambiente. El final de los combustibles fósiles es inminente a un corto plazo, por lo cual, su reemplazo será inevitable. Hasta hace poco, casi toda la energía necesaria era derivada de fuentes de energía fósil, tales como la generación eléctrica en general, en la industria (combustibles y energía eléctrica) y equipo de transporte, que usan combustibles fósiles como fuente de energía. Tales combustibles, además de ser fuentes de energía no renovable, tienen también serios impactos negativos sobre el medio ambiente, *v. g.* el suelo, el agua, el aire y el clima. Además, son causantes del excesivo calentamiento global climático, debido a las emisiones de contaminantes que generan el efecto invernadero, así como la formación de compuestos del tipo COx, NOx, SOx, CxHy, cenizas y otros compuestos orgánicos que son emitidos a la atmósfera como resultado de la combustión. Basado en las consideraciones anteriores, en años recientes se han realizado varios estudios para obtener fuentes de energía sustentables que puedan reemplazar a los combustibles fósiles y que además, no tengan un impacto negativo sobre el medio ambiente (Azwar, M. *et al.*, 2014). Las necesidades globales de energía y el incremento de las emisiones a causa de los combustibles fósiles, han comprometido a los investigadores a encontrar nuevas fuentes de energía y la tecnología para su obtención (Escapa, *et al.*, 2012). En 2003, el laureado con el Premio Nobel Dr. Richard Smalley declaró que "la energía es el desafío más crítico que enfrenta la humanidad". El mundo enfrenta un dilema épico. La mayor parte de la energía (> 86%) proviene de combustibles fósiles (petróleo, carbón y gas natural), que son recursos no renovables que en algún momento pueden agotarse por completo. Además, aumentan las preocupaciones sobre los impactos de estos recursos en el clima global, la salud humana y los ecosistemas, en todo el mundo están impulsando a los investigadores a encontrar alternativas renovables para satisfacer nuestra creciente demanda de energía. El hidrógeno tiene un tremendo potencial como fuente de energía y combustible. Quemar hidrógeno no contribuye a las emisiones de gases de efecto invernadero (GEI), a la lluvia ácida o al agotamiento de la capa de ozono debido a que su producto de oxidación es solo vapor de H₂O (Kadier *et al.*, 2016). Por otro lado, el hidrógeno es una de las fuentes alternativas de combustible sustituto de los combustibles fósiles ambientalmente aceptable que puede usarse en vehículos (Cheng, S. *et al.*, 2011; Service, 2004) y es considerado como un "portador de energía" con un futuro promisorio (Azwar, M. *et al.*, 2014). Posee un alto contenido energético de 122 kJ/g, que es 2.75 veces más grande que los combustibles de hidrocarburos. El hidrógeno juega un rol muy importante y su contribución en ésta era global basada en fuentes de energía renovables sustentables, deberá proveer mayores contribuciones al crecimiento económico mundial. El hidrógeno es un compuesto inodoro, incoloro, sin sabor, ligero y no tóxico. Producido a través de procesos biológicos, puede llegar a ser muy promisorio, debido a que tales procesos pueden operarse a temperatura y presión ambientales, con un mínimo consumo de energía, y pueden ser más amigables con el medio ambiente. La producción de gas hidrógeno puede realizarse a partir de materiales de biomasa renovables (Azwar, M. *et al.*, 2014). Tales biomasa pueden obtenerse de una gran variedad de desechos orgánicos de la industria del almidón, desechos industriales del biodiesel, materiales lignocelulósicos tales como la madera y sus productos, desechos de alimentos, desechos caseros (Cheng, S. *et al.*, 2011), los residuos agrícolas (residuos de cosechas o desechos de procesos agroindustriales o industrias alimentarias) tienen un costo insignificante y parecen ser materias primas

prometedoras no solo para el hidrógeno sino también para otros biocombustibles (producción de bioetanol, biobutanol y biodiesel) (Stamatelatou, *et al.*, 2011), no obstante, es posible extender esta definición de biomasa al contenido orgánico en aguas residuales y a la cantidad de microorganismos presentes en un medio dado. De esta forma, el contenido de materia orgánica y de microorganismos en aguas residuales también puede considerarse biomasa. Por otro lado, la producción de hidrógeno biológico o biohidrógeno usando biomasa rica en carbohidratos como una fuente renovable, se propone como uno de los métodos alternativos a la producción química, utilizando procesos anaerobios (fermentación oscura), y procesos fotosintéticos (Fotofermentación) (Azwar, *et al.*, 2014). Y desde luego, el proceso produce hidrógeno y al mismo tiempo biodegrada y reduce la materia orgánica presente en el agua residual. El H₂ es un portador de energía, que puede ser producido en forma sustentable en una celda de electrólisis microbiana (MEC), a partir de la materia orgánica presente en un agua residual. En el ánodo de la MEC, los microorganismos electrogénicos convierten la materia orgánica (v. g. el acetato) en bicarbonato, protones y electrones. Los electrones producidos se dirigen desde el ánodo hacia el cátodo, debido a la imposición de un voltaje externo. En el cátodo, los electrones se combinan con los protones mediante un proceso llamado reacción de evolución del hidrógeno (HER por sus siglas en inglés). El transporte de carga negativa a través de los electrones, se compensa con el transporte de carga a través de los iones de la celda (Jeremiase, *et al.*, 2011). El hidrógeno ha sido identificado, además, como una excelente alternativa para sustituir a los combustibles fósiles carbónicos que van en rápido agotamiento. Su alta densidad energética, así como su combustión ambientalmente segura y las ventajas de su utilización en condiciones ambientales de presión y temperatura, hacen del hidrógeno un combustible ideal para el futuro que puede explotarse comercialmente, para satisfacer la demanda energética mundial. Los métodos más comunes para la producción de hidrógeno a escala industrial son: reformación de hidrocarburos al vapor, pirólisis, reformación al plasma, electrólisis del agua, etc. Una revisión detallada de tales procesos químicos fue hecha por Holladay *et al.*, 2009. No obstante, tales métodos de producción de hidrógeno son caros y de alto consumo energético, por ello es necesario identificar otras fuentes y desarrollar métodos de producción de hidrógeno como una fuente energética eficiente y económica. La producción de hidrógeno a partir de biomasa es suficiente para las necesidades de un hidrógeno rentable. El biohidrógeno es el hidrógeno producido a partir de medios biológicos, mayormente por bacterias, algas o arqueobacterias a partir de biomasa o materiales de desecho. La mayor ventaja de producción de hidrógeno a partir de medios biológicos es que pueden realizarse a temperatura y presión ambientales, en comparación con los métodos químicos que se realizan a condiciones comparativamente extremas. Además, estos procesos reducen principalmente el costo de energía de transporte e insumos, ya que se pueden instalar a pequeña escala donde hay abundante biomasa disponible (Parkhey, *et al.*, 2017).

La producción de biohidrógeno a partir del tratamiento de aguas residuales con un alto contenido de materia orgánica mediante reacciones de bioelectrosíntesis, es una opción atractiva que genera un portador de energía renovable respetuoso con el medio ambiente (Keruthiga, *et al.*, 2021; Brar, *et al.*, 2022). Una celda de electrólisis microbiana (MEC) es un tipo de sistema bioelectroquímico (BES) que utiliza microorganismos externos de baja electricidad (entre 0.2 y 1.0 V) y exoelectrogénicos que generan reacciones bioelectroquímicas para producir biohidrógeno, metano y otros productos de valor agregado a partir de un sustrato orgánico. Los microorganismos exoelectrogénicos que respiran en el ánodo unidos al mismo, transforman los compuestos orgánicos en electrones, protones y

dióxido de carbono. Los electrones viajan directamente al ánodo, que luego se utilizan en el cátodo. Los protones generados en la cámara anódica de la MEC migran directamente al cátodo donde se combinan con los electrones para generar biohidrógeno (Aiken, *et al.*, 2019; Chaurasia, *et al.*, 2022). Un factor importante cuando se trabaja con MECs, es la selección de los materiales de los electrodos. Tanto el ánodo como el cátodo de la MEC deben tener altas actividades electrocatalíticas para mejorar las reacciones de evolución de hidrógeno (HER) y minimizar los sobrepotenciales, generando una mayor producción de biohidrógeno. Se requiere alta conductividad, baja resistividad eléctrica, baja resistencia a la corrosión, alta biocompatibilidad, alta área de superficie específica y bajo costo para que el ánodo y el cátodo obtengan una alta producción de biohidrógeno y un buen desempeño de la MEC (Zhao, *et al.*, 2020; Sánchez, *et al.*, 2022). Los electrodos de grafito (G) o carbón (C) en sus diferentes formas (fieltro, cepillos, telas, placas) son los materiales más utilizados como ánodos y cátodos en un MEC, debido a su compatibilidad con el biofilm electroquímicamente activo y sus bajos costos. Sin embargo, la resistividad eléctrica de los electrodos de grafito y carbono es muy alta (1.375 mWcm para el electrodo de grafito frente a 9.71 mWcm para el electrodo de hierro), lo que provoca altas pérdidas óhmicas en los electrodos en BES (Rozendal, *et al.*, 2008). Se ha informado que los electrodos de G o C generan baja HER y alto sobrepotencial. En varios trabajos, la tasa de producción de hidrógeno (HPR) en las MECs es baja, debido a la alta resistencia que presenta el uso de fieltro de grafito (GF) (Guo, *et al.*, 2017). Hasta el momento, la HPR ha alcanzado de 0.1 a 50 m³ H₂/m³R.d en una MEC utilizando diferentes electrodos y aguas residuales o sustratos orgánicos (Tang, *et al.*, 2022). Para disminuir la entrada de energía en términos de kWh/m³ H₂ y aumentar el HPR en la MEC, se usa un catalizador en el cátodo. Tang *et al.*, 2022 y Park *et al.*, 2022, indicaron recientemente que los materiales a base de metales, los materiales a base de nanomateriales de carbono y los materiales a base de metales no preciosos utilizados como cátodos, se han convertido en los electrodos más populares para aumentar la producción de hidrógeno en las MECs. Para reducir las pérdidas óhmicas de los electrodos y el alto sobrepotencial, los electrodos de G o C pueden soportarse o reemplazarse por materiales altamente conductores, como acero inoxidable (SS), níquel (Ni), hierro (Fe) o cobre (Cu) (Chaurasia, *et al.*, 2022; Tang, *et al.*, 2022; Dange, *et al.*, 2021). Recientemente, los cátodos a base de Ni, como la espuma de Ni, el óxido de Ni, el nanocatalizador Ni₂P, los electrodeósitos de Ni (Ni-Co, Ni-Co-P, Ni-W, Ni-Mo, Ni-Fe-Co-P, Ti-Ni, Zn-Ni, G-Ni), electrodos basados en SS (placas, mallas, cepillos y fieltro) soportados con Ni, Cu y otros metales de transición no nobles han mostrado resultados prometedores que mejoran la HER en las MECs (Chaurasia, *et al.*, 2022; Tang, *et al.*, 2022; Park, *et al.*, 2022; Zhang, *et al.*, 2020). Estos electrodos tienen una alta actividad electrocatalítica (0.79-3.43 mL H₂/cm²g.min), bajo sobrepotencial (140-250 mV) y alta densidad de corriente (0.442-20 mA/cm²) (Chaurasia, *et al.*, 2022). Varios investigadores han informado sobre la producción de biohidrógeno en una MEC, se basan en probar diferentes cátodos, dejando el ánodo fijo (en el que se utilizan principalmente electrodos de grafito) (Chaurasia, *et al.*, 2022; Gil-Carrera, 2013; Jeremiasse, *et al.*, 2011). Esto se debe a que se ha informado que la actividad electrocatalítica del cátodo es uno de los factores más importantes cuando se trata de reducir el protón a biohidrógeno para aumentar la producción de biohidrógeno y reducir la entrada de energía (Tang, *et al.*, 2022; Zhang, *et al.*, 2010). Sin embargo, no debemos olvidar que las principales reacciones de los mecanismos de transferencia de electrones se llevan a cabo en el ánodo, lo que ayuda a superar las barreras termodinámicas durante los mecanismos de reacción para la producción de biohidrógeno (Park, *et al.*, 2022). Los electrodos de carbono o los materiales a base de

carbono se usan como ánodo en una MEC, y solo unas pocas investigaciones usan electrodos metálicos como el acero inoxidable para producir biohidrógeno en una MEC (Park, *et al.*, 2022; Feng, *et al.*, 2018).

De acuerdo con esto, la investigación reciente durante la producción de biohidrógeno en una MEC debe basarse en probar simultáneamente diferentes materiales anódicos y catódicos, incluidos materiales a base de carbono, materiales a base de metales, materiales a base de polímeros, materiales a base de materiales preciosos, materiales a base de nanomateriales de carbono, y materiales basados en metales no preciosos, enfocándonos más en materiales basados en metales no preciosos hasta encontrar las mejores combinaciones ánodo-cátodo para obtener un alto HPR, una alta HER y bajos sobrepotenciales. Solo el 4% de los estudios realizados en las MECs para la producción de hidrógeno utilizaron biocátodos, por lo que es necesario profundizar en los estudios del efecto de los biocátodos en la producción de hidrógeno en una MEC (Tang, *et al.*, 2022). Varios estudios se limitan al uso de un par de electrodos y, por lo tanto, determinan el rendimiento de la MEC. Los materiales de los electrodos probados en una MEC resultan costosos y complicados de fabricar. Por lo que se recomienda trabajar con materiales de electrodos convencionales, económicos y de fácil acceso. En esta investigación trabajamos con diferentes materiales de electrodo convencionales, económicos y de fácil acceso, determinando las actividades electrocatalíticas de las diferentes combinaciones del material del electrodo en una MEC hasta obtener altas producciones de biohidrógeno y bajo sobrepotencial. Otro factor importante a considerar durante la producción de biohidrógeno en una MEC y otras tecnologías biológicas es el tipo de sustrato orgánico a utilizar. En este caso, las aguas residuales que contienen un alto contenido orgánico son un buen sustrato para que las bacterias electroquímicamente activas y las bacterias productoras de hidrógeno produzcan biohidrógeno (Keruthiga, *et al.*, 2021; Qyyum, *et al.*, 2022). Las aguas residuales industriales se caracterizan por contener concentraciones elevadas de materia orgánica biodegradable y no biodegradable que van desde 1.0 a 200.0 g DQO/L y otros contaminantes inorgánicos (Hamza, *et al.*, 2016; Pan, *et al.*, 2021). Las concentraciones de contaminantes en los efluentes industriales varían según el tipo de industria, los procesos industriales utilizados, los productos químicos utilizados y las prácticas de eliminación, por estas razones, todos los efluentes industriales pueden variar en diferentes niveles de concentración y tipo de contaminantes. Los efluentes industriales se conocen típicamente como aguas residuales de alto contenido de materia orgánica. Hay muchos tipos de aguas residuales de alta concentración ricas en contenido orgánico que se han utilizado para la producción de biohidrógeno, por ejemplo, aguas residuales sintéticas que contienen glucosa, sacarosa, celulosa y almidón, aguas residuales de cervecerías, aguas residuales del proceso del aceite de olivo y curtidurías, lactosuero o suero de leche, agua residual proceso de la leche, agua residual del proceso del vino (vinaza), residuos del proceso del azúcar (melaza) y agua residual del proceso de alimentos enlatados, entre otros (Qyyum, *et al.*, 2022). Los HPR obtenidos de diferentes MEC alimentados con aguas residuales de alta concentración están en el rango de 0.1 a 50 m³ H₂/m³ R.d con valores de DQO que van desde 1.0 a 8.2 g/L (Fudge, *et al.*, 2021; Muddasar, *et al.*, 2022). Varios de los estudios realizados en MECs alimentadas con aguas residuales de alto contenido orgánico, no muestran las actividades electrocatalíticas de los materiales de los electrodos durante la producción de biohidrógeno. Por lo tanto, es muy importante demostrar el rendimiento electroquímico y seleccionar la mejor combinación de diferentes materiales de electrodos para aumentar el HPR, mejorar la HER y disminuir los sobrepotenciales en una MEC. En este estudio se probaron diferentes

materiales de electrodos (malla plana de acero inoxidable, acero inoxidable plisado, GF, barra de Cu recubierta con Ni y barra de Fe) y configuraciones de electrodos para mejorar el HPR en una MEC de una sola cámara sin membrana usando agua residual de alta concentración como sustrato orgánico. Otro objetivo del estudio fue analizar la actividad electrocatalítica de una MEC para determinar la HER y las densidades de corriente durante la producción de biohidrógeno alimentado con aguas residuales de alta concentración.

Capítulo 1. Marco teórico

1.1. Diversidad de microorganismos como biocatalizadores productores de H₂

En la naturaleza, existe una gran variedad de microorganismos que incluyen a las bacterias *archae*, bacterias anaerobias y bacterias aerobio-facultativas, cianobacterias y eucariotas inferiores (v. g. algas verdes y protistas) que producen H₂, que pueden funcionar individualmente o como un consorcio de tipos similares o cultivos mixtos (Figura 1). Los principales biocatalizadores productores de H₂ son los heterótrofos típicos en el proceso de fermentación. Algunas bacterias de la fermentación oscura no requieren energía solar como fuente de energía y toleran condiciones deficientes de oxígeno; estos microorganismos son del tipo anaerobios obligados, se clasifican en función de su sensibilidad al O₂ y su temperatura de crecimiento, como puede observarse en la figura 1 (Chandrasekhar, *et al.*, 2015).

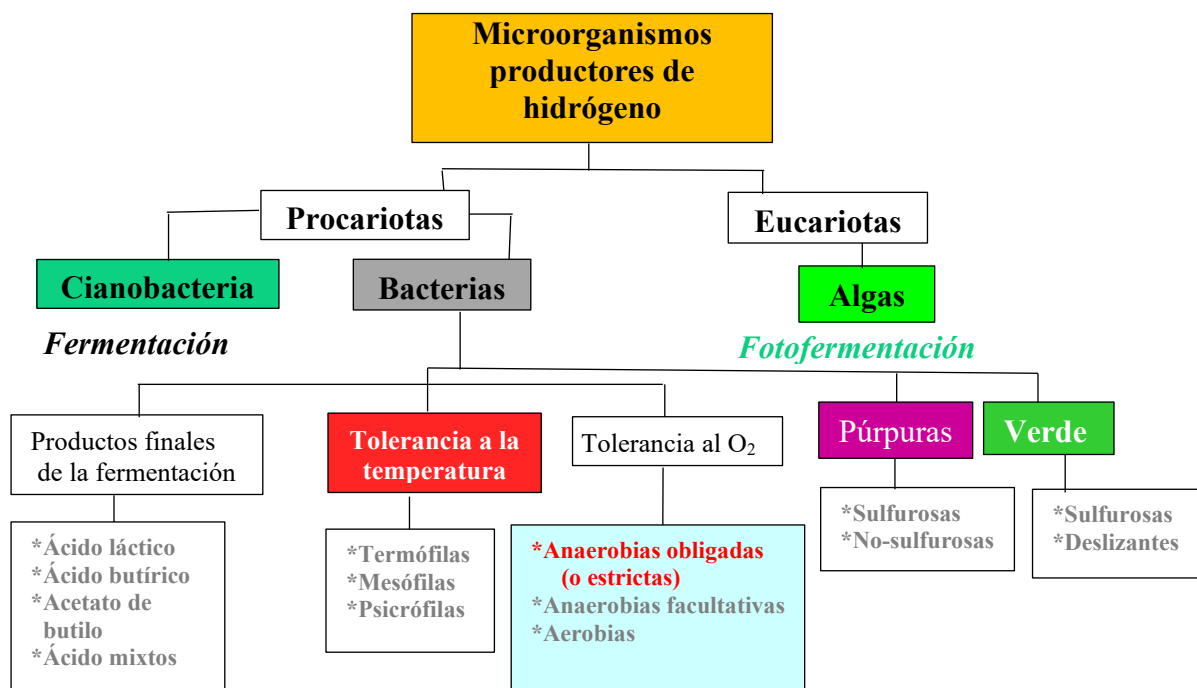


Figura 1. Esquema de la diversidad biológica de microorganismos productores de hidrógeno (Modificado de Chandrasekhar, *et al.*, 2015)

1.2. Métodos de producción de biohidrógeno

Los métodos de producción de biohidrógeno más comúnmente estudiados son la biofotólisis del agua por algas y la fermentación oscura, principalmente por bacterias anaerobias. Los métodos de fermentación son los métodos más ampliamente estudiados en la producción de biohidrógeno; sin embargo, las restricciones termodinámicas limitan el rendimiento máximo de hidrógeno de la fermentación a ~ 4 moles/mol de glucosa. Esto hace que la producción de biohidrógeno fermentativo sea prácticamente no competitiva para los otros biocombustibles que puedan generarse a partir de la misma biomasa (Parkhey, P. *et al.*, 2017). Sin embargo,

existen otros métodos de producción de H_2 , aparte de los ya mencionados, como podemos ver en la siguiente Figura 2:

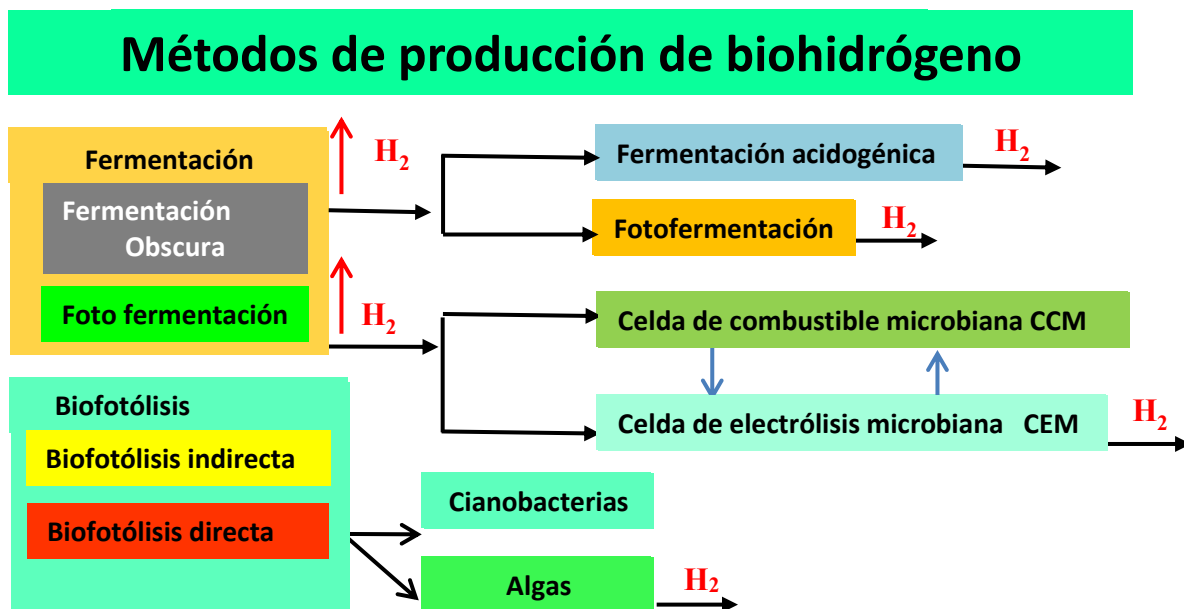


Figura 2. Representación esquemática de las rutas biológicas para la producción de H_2 (Modificado de Chandrasekhar, *et al.*, 2015)

1.3. Fundamentos de la producción biológica de hidrógeno mediante Biofotólisis

La Biofotólisis está relacionada con el proceso fotosintético de tipo vegetal como el de las algas azul-verdes (cianobacterias) que usan la luz para descomponer el agua y formar H_2 , el cual se lleva cabo bajo condiciones anaerobias. Aparte de producir hidrógeno al descomponer el agua, las cianobacterias usan los carbohidratos para almacenar energía mediante la fotosíntesis. La biofotólisis del agua para producir hidrógeno, puede ocurrir en varias especies de bacterias y micro-algas, que viven en el suelo o el agua natural como cianobacteria de la especie *Anabaena*, o la eucariota *Clamidomona Reinhart sp.* Las cianobacterias y las micro-algas pueden descomponer el agua en moléculas de hidrógeno y oxígeno usando la luz solar. En la siguiente Figura 3, se muestra el proceso de fotosíntesis para producir H_2 bajo condiciones anaerobias usando el alga verde *Clamidomona reinhardtii*. La ventaja de la bio-fotólisis es que no se requiere agregar sustrato como nutriente. El agua es el donador primario de los electrones requeridos para la producción de hidrógeno gaseoso, la luz solar y el CO_2 son los elementos básicos necesarios para cultivar las cianobacterias o micro-algas en el proceso de biofotólisis a través del hidrógeno como enzima. La producción de H_2 gaseoso por medio de las algas verdes y las cianobacterias, es uno de los métodos que produce energía renovable, pues no emite gases de efecto invernadero y que además cuenta con abundantes fuentes naturales como el agua y la energía solar. El hidrógeno producido puede utilizarse en celdas de combustible para generar electricidad (Azwar, *et al.*, 2014).

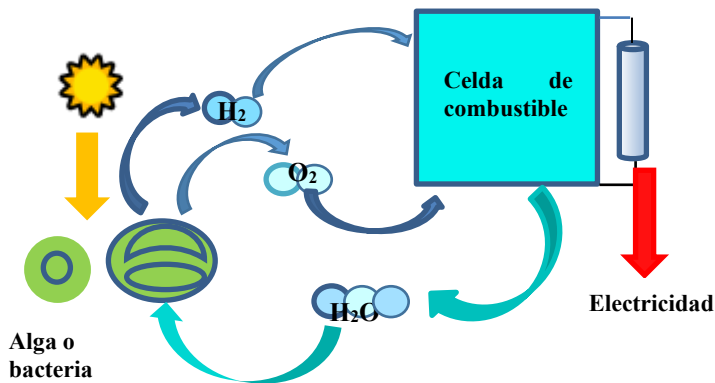
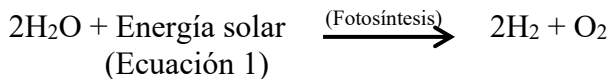


Figura 3. Representación esquemática de la producción fotobiológica de H₂ y su uso en una celda de combustible microbiana (Adaptado de Azwar *et al.*, 2014)

1.4. Biofotólisis directa

La biofotólisis directa es un proceso que puede producir hidrógeno directamente del agua usando la fotosíntesis de las microalgas para convertir la energía solar en energía química en forma de hidrógeno, la reacción es la siguiente:



En la biofotólisis directa de algas verdes o cianobacterias (Fig. 4), se produce H₂ a través de la fotosíntesis para dividir el agua en moléculas de H₂ y O₂. En este proceso también disminuyen la ferredoxina, hidrogenasa o la nitrogenasa, ya que estos compuestos son muy sensibles a la presencia de oxígeno. La ventaja de la biofotólisis es que incluso a bajas intensidades de luz, las algas verdes en condiciones anaerobios, son capaces de convertir hasta un 22% de la energía lumínica para usar el H₂ como un donador de electrones en el proceso de fijación de CO₂. Las microalgas poseen la maquinaria genética, las enzimas, el metabolismo y el foto-transporte de electrones, para producir foto-hidrógeno (Azwar, *et al.*, 2014).

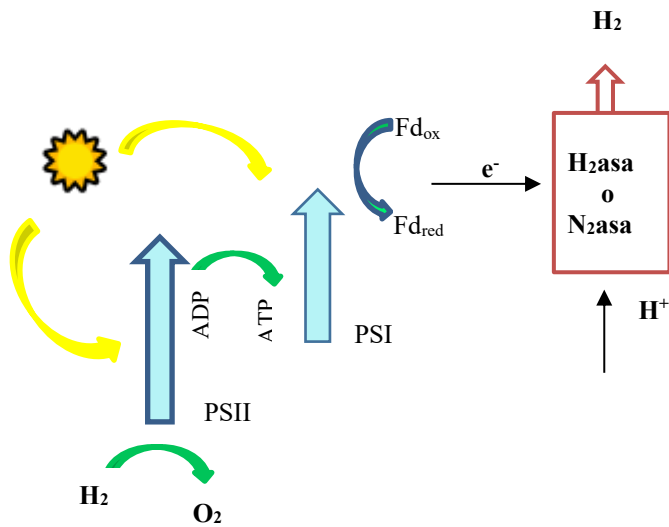
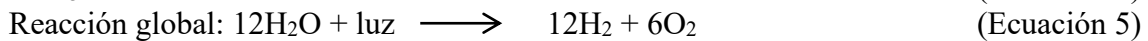
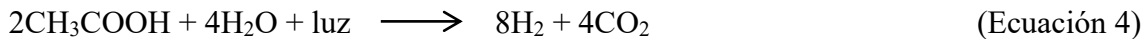
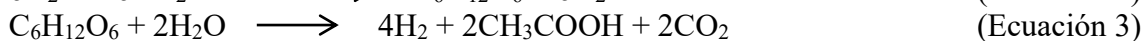


Figura 4. Biofotólisis directa de microalgas o cianobacterias
(Adaptado de Azwar, *et al.*, 2014)

1.5. Biofotólisis indirecta

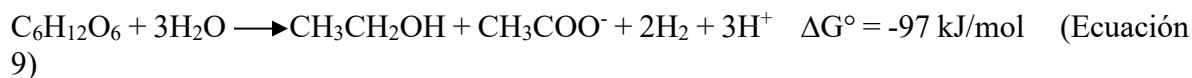
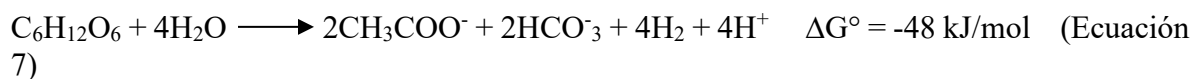
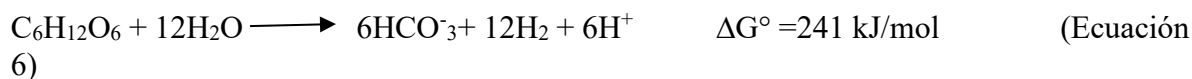
La biofotólisis indirecta es un proceso biológico que puede producir H₂ del agua usando la fotosíntesis de microalgas y cianobacterias para convertir la energía solar en energía química en forma de hidrógeno a través de varios pasos: (i) producción de biomasa por fotosíntesis, (ii) concentración de la biomasa, (iii) fermentación aerobia oscura para producir 4 moles de glucosa/mol de H₂/mol en la célula de la microalga, junto con 2 moles de acetato, y (iv) conversión de 2 moles de acetato en H₂. Este proceso puede clasificarse en 2 distintos grupos, uno que depende de la luz y el otro independiente de la misma; las reacciones involucradas se describen a continuación (Ecuaciones 2-5) (Azwar, *et al.*, 2014):



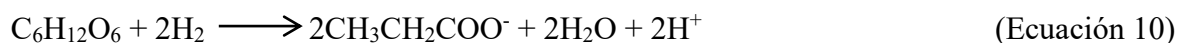
Como se describe en las reacciones anteriores, el mecanismo de la fotosíntesis para separar el oxígeno y el hidrógeno del agua, se realiza a través de varias fases. La oxidación de la cianobacteria almacena carbohidratos y produce hidrógeno. La energía necesaria para producirlo se obtiene también de las reservas de almidón de la actividad fotosintética previa. En el estado dos, el sistema *C. reinhardtii* limitado de azufre, ocurre bajo condiciones aerobias separado de las condiciones anaerobias, a pesar de algunos electrones derivados del almidón en el sistema. Esta fase se incluyó en la biofotólisis directa a causa de la operación de las células que están aún funcionando y proveen electrones a la hidrogenasa durante la anaerobiosis (Azwar, *et al.*, 2014).

1.6. Fundamentos de la producción de hidrógeno por fermentación

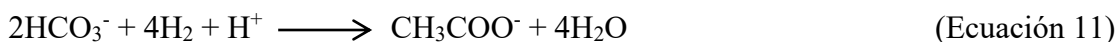
Otro de los procesos de producción biológica de hidrógeno es la fermentación, que puede producirlo sin la necesidad de la luz. Al comparar la fermentación con la biofotólisis, la producción de hidrógeno por fermentación, tiene mayor estabilidad y eficiencia. A escala industrial, la fermentación es más apropiada porque solo requiere un sistema de control simple, lo que conduce a que los costos de operación sean menores. Una de las ventajas de la producción de hidrógeno por fermentación es el uso de una gran variedad de desechos orgánicos como sustrato, así se reduce el desecho y al mismo tiempo se produce energía. Este proceso ha recibido una gran atención de investigadores y científicos en años recientes. En las siguientes reacciones se muestra la producción de hidrógeno por fermentación de la glucosa donde el subproducto más deseado es el acetato, con niveles de producción de 4 moles de H₂/mol glucosa teórico, y un máximo del 33% de la demanda química de oxígeno (DQO) que puede convertirse de glucosa a hidrógeno. El resto de la energía corresponde al acetato (Azwar, *et al.*, 2014).



Teóricamente la reacción (Ecuación 6) muestra que se pueden producir 12 moles de H₂ por mol de glucosa. Las energías libres de Gibbs para las reacciones anteriores a una temperatura de 25 °C se basan en los valores de Amend y Shock, 2001, donde se observa que la producción de 12 mol de hidrógeno (Ecuación 6) es termodinámicamente desfavorable. De acuerdo con Claassen y Van Lier, 1999, la transformación de acetato a hidrógeno es factible a través de la fotosíntesis, si la presión parcial del hidrógeno es muy baja y la temperatura de operación mayor a 40 °C (Azwar, *et al.*, 2014). En contraste, la producción de propionato disminuye la producción de hidrógeno como fue demostrado por Shin, *et al.*, 2004:



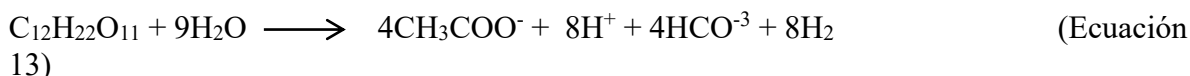
El consumo indeseable de hidrógeno (11) o glucosa (12) puede ser causado por la actividad de homoacetógenos como *Clostridium acetivum* (Hawkes, *et al.*, 2007):



En la práctica, se desea la fermentación con butirato como producto principal ya que es la mejor ruta para producir hidrógeno, con resultados de 2.9 mol de H₂/mol glucosa utilizando *Clostridium species*.

1.6.1. Fermentación oscura

La fermentación oscura es la conversión fermentativa o descomposición acidogénica del sustrato orgánico y materiales de biomasa para producir biohidrógeno que tiene lugar en condiciones anaeróbicas (atmósfera libre de oxígeno) y sin la presencia de luz, para producir un biogás compuesto principalmente de biohidrógeno y dióxido de carbono y un efluente que comprende metabolitos finales como el ácido acético, ácido butírico y etanol, entre otros (Zumar, *et al.*, 2017). Es un proceso complejo que se manifiesta por varios grupos de bacterias al involucrar una serie de reacciones bioquímicas. La producción de hidrógeno por fermentación oscura tiene varias ventajas en comparación con otros métodos biológicos de producción de hidrógeno, como la fotosíntesis y la foto-fermentación debido a su capacidad para producir hidrógeno continuamente sin la presencia de luz, mayor tasa de producción de hidrógeno, menor consumo de energía neta y uso de residuos de bajo valor como materias primas. La fermentación oscura produce hidrógeno a partir de compuestos orgánicos por microorganismos anaeróbicos, y también puede producir hidrógeno a partir de desechos orgánicos como se muestra en la siguiente ecuación (Azwar, *et al.*, 2014):

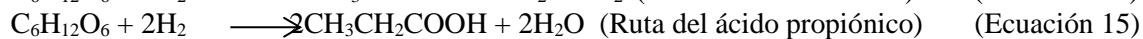
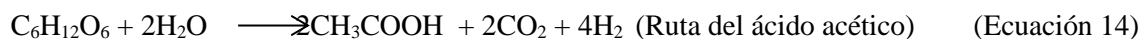


Hexosa (glucosa, fructosa, sacarosa, Constanza, *et al.*, 2015)

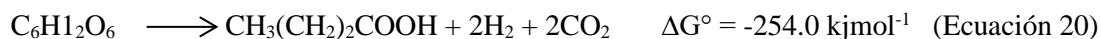
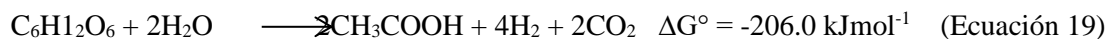
Para aumentar el rendimiento de hidrógeno en el proceso de fermentación oscura, es necesario controlar varios parámetros a saber: pH, alimentos orgánicos, velocidad de alimentación de nutrición, temperatura, Tiempo de retención de sólidos (TRS) y P_{H₂}. Uno de los parámetros más importantes en la producción de hidrógeno es el pH, ya que es un factor que influye en las actividades de la enzima hidrogenasa. Se han publicado varios estudios que indican que su actividad está directamente relacionada con la fermentación oscura del hidrógeno, lo que indica que el pH juega un papel muy importante en la producción del mismo. Muchos documentos han reportado que el efecto del pH en la producción de hidrógeno fermentativo a partir de glucosa y sacarosa, utilizan micro-flora mixta. Muchos estudios han informado que, si el valor del pH se mantiene bajo y se acorta el TRS, se limita el crecimiento de los metanógenos. En general, investigaciones basadas en varios estudios de fermentación oscura, el valor del pH se mantuvo en un rango de pH de 5,5 a 8,0, ya sea ajustándolo inicialmente, usando un tampón o utilizando un controlador automático de pH. Al aplicar estas técnicas, la eficiencia de conversión máxima se incrementó en un 60–70% (Azwar, *et al.*, 2014).

La glucólisis es la vía metabólica clave en la que un sustrato puede transformarse en piruvato, un intermediario metabólico central. En condiciones anaeróbicas, el piruvato ingresa en la ruta acidogénica junto con la producción de H₂, lo que resulta en la formación de ácidos grasos volátiles (VFASs) (es decir, ácido acético, ácido propiónico, ácido butírico y ácido málico, entre otros).

(Ecuaciones (14–18) (Chandrasekhar, *et al.*, 2015).



La Fermentación oscura (FO) es la descomposición acidogénica de la materia orgánica en un ambiente libre de oxígeno y privada de luz para producir un biogás compuesto principalmente de biohidrógeno y dióxido de carbono y un efluente que comprende metabolitos finales: el ácido acético, ácido butírico y etanol, entre otros. El rendimiento del biohidrógeno, así como la composición del efluente de la FO, depende en gran medida de la ruta metabólica que toman los microorganismos (piruvato: formato liasa (Pfl) o piruvato: ferredoxina oxidorreductasa (Pfor)). El rendimiento teórico de H₂ del proceso FO es 4 mol/mol de glucosa (con ácido acético como producto final) mientras que esto se reduce a 2 mol/mol glucosa (con ácido butírico como producto final) como se muestra en las ecuaciones (19) y (20). La energía libre de Gibbs es negativa para ambas reacciones, lo que indica que la formación de los ácidos acético y butírico son termodinámicamente favorables, lo que implica que ambos ácidos están normalmente presentes entre los metabolitos del producto final y el rendimiento de biohidrógeno es, por lo tanto, siempre inferior a 4 mol H₂ /mol de glucosa:



La baja eficiencia de conversión de sustratos a biohidrógeno, se atribuye a "el hecho de que las fermentaciones se han optimizado por evolución para producir biomasa celular y no hidrógeno". Esto es confirmado por las anteriores ecuaciones (19) y (20). Los bajos rendimientos de H₂ también se atribuyen a la presencia de consumidores de H₂, como homoacetógenos, metanógenos hidrotrofos, bacterias sulfato reductoras, bacterias reductoras de nitrato y productores de propionato que están presentes en la microflora mixta y disminuyen la producción neta de biohidrógeno. Con una baja eficiencia de conversión de sustratos a biohidrógeno y un rendimiento de biohidrógeno relativamente bajo, el proceso FO no es económicamente viable para la implementación a gran escala. Además, la baja conversión de sustratos a biohidrógeno da como resultado un efluente rico en ácidos grasos volátiles (VFAs), que requiere tratamiento antes de la descarga y, posteriormente, aumenta el costo operativo del proceso de FO y disminuye aún más su viabilidad económica (Bundhoo, 2017).

los tipos de bioprocesos para la producción de hidrógeno y sus características se resumen en la siguiente Tabla 1:

Tabla 1. Rutas biológicas para la producción de H₂ y sus limitaciones técnicas.

Tipo de bioproceso	Desafíos técnicos
Fermentación oscura	<ul style="list-style-type: none"> • baja eficiencia de conversión de sustrato • bajo rendimiento de H₂ • limitaciones termodinámicas • mezcla de H₂ y CO₂ lo cual requiere separación
Fotofermentación	<ul style="list-style-type: none"> • requerimiento de fuente de luz externa • el proceso está limitado por los ciclos de día/noche, con la luz solar como fuente de luz • bajo rendimiento de H₂ causado por una eficiencia de conversión de luz extremadamente baja
Biofotólisis directa	<ul style="list-style-type: none"> • generación de O₂ causada por la actividad de PS II (Fotosistema II que tiene que ver con los tilacoides. Es el lugar donde están las moléculas que permiten obtener energía química a partir de la energía lumínica (Julián Pérez Porto y María Merino, 2016). • necesidad de fotobiorreactores personalizados • bajo rendimiento de H₂ causado por una eficiencia de conversión de luz extremadamente baja
Biofotólisis indirecta	<ul style="list-style-type: none"> • bajo rendimiento de H₂ causado por la hidrogenasa • requerimiento de una fuente de luz externa • la eficiencia total de conversión de luz fue muy baja

Tomado de Chandrasekhar, *et al.*, 2015

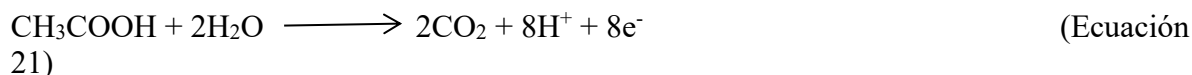
1.7. Producción híbrida de hidrógeno biológico mediante procesos electroquímicos

El sistema bioelectroquímico es una tecnología alternativa que utiliza microorganismos como catalizadores electroquímicos. Los microorganismos son capaces de catalizar la reacción de oxidación-reducción en ánodo y cátodo. Los sistemas bioelectroquímicos (SBE) se dividen en dos grupos principales, que son las celdas de combustible microbiano (MFC por sus siglas en inglés) y las celdas de electrólisis microbiana (MEC) (Azwar, *et al.*, 2014).

1.7.1. Celda de combustible microbiana (CCM)

En una CCM, los microorganismos son capaces de oxidar los sustratos orgánicos en el ánodo para producir CO₂, protones y electrones bajo condiciones anaerobias. La ecuación (21) muestra la oxidación del ácido acético (un metabolito final presente en el efluente de la fermentación oscura) en CO₂, protones y electrones. Estos electrones migran al cátodo a

través de un circuito externo, produciendo electricidad en el proceso, mientras que los protones se mueven al cátodo a través de una membrana semipermeable y reaccionan con el oxígeno para producir agua, según la ecuación (22) y representado en la Fig. 6 (Zumar, *et al.*, 2017).



1.7.2. Celda de electrólisis microbiana (MEC)

A diferencia de la CCM, la MEC se utiliza para producir biohidrógeno a partir de desechos orgánicos por microorganismos utilizando una corriente eléctrica, también se denomina electrohidrogenesis microbiana (Figura 7). El proceso es bastante similar a una CCM, excepto que la resistencia es reemplazada por una fuente de energía eléctrica y el compartimiento del cátodo está cerrado a la entrada de oxígeno. De manera similar a la CCM, los sustratos orgánicos son oxidados por los microorganismos en el ánodo para generar CO_2 , protones y electrones según la ecuación (21). Los protones se mueven al compartimiento del cátodo (anaeróbico en contraste con una CCM) a través de una membrana semipermeable, mientras que los electrones se mueven al compartimiento del cátodo a través del circuito externo similar a la CCM. Debido a que el compartimiento del cátodo es anaeróbico en la MEC, no hay oxígeno y, en consecuencia, no se produce agua. Sin embargo, la fuente de alimentación eléctrica en el sistema MEC suministra una corriente adicional que impulsa la reducción de protones a biohidrógeno en el cátodo según la Ecuación 23:



A pesar del hecho de que una MEC requiere un suministro de energía adicional, su idoneidad para utilizar una amplia gama de sustratos a saber *v. g.* las aguas residuales y la biomasa lo convierten en una técnica muy prometedora para la producción de biohidrógeno (Zumar, *et al.*, 2017). La tecnología de una MEC también es llamada electro-fermentación o celdas de electrólisis biocatalizadas. Su rendimiento está determinado por el tipo de microorganismo, los materiales de los electrodos, el tipo de membrana utilizada, el rango de potencial aplicado, la composición y la concentración del sustrato y el diseño. Inicialmente, las MEC se utilizaron con dos cámaras y se cambiaron más tarde a una configuración de una sola cámara, debido a la facilidad del proceso, una reducción significativa de la resistencia interna, una disminución del pH en la cámara del ánodo causada por la producción y la acumulación de H^+ y un aumento del pH en la cámara del cátodo causado por el “uso” de H^+ en la producción de H_2 . De hecho, la exclusión de la membrana redujo tanto el pH como las pérdidas de energía, incluida la energía óhmica en la operación de la MEC de una sola cámara, que era el principal problema de una MEC de dos cámaras. Las diferencias y los componentes de una CCM y una MEC están representadas en la Figura 6 y Figura 7. La tecnología MEC también se llama electrofermentación o celdas de electrólisis biocatalizada. La tecnología MEC se asemeja a una MFC en la que la principal diferencia es la necesidad de una pequeña entrada de voltaje externo. Basado en la termodinámica, un potencial superior a 0,110 V, además del generado por un microorganismo (-0,300 V), producirá H_2 . El potencial redox normal para

la reducción de H^+ a H_2 es -0.414 V; por lo tanto, el requisito potencial es muy bajo en comparación con el voltaje teóricamente requerido de 1.230 V para la electrólisis de H_2O . En la práctica, sin embargo, se requiere un potencial comparativamente más alto que este valor, debido a los sobrepotenciales creados por factores físicos, químicos y microbianos (Chandrasekhar *et al.*, 2015).

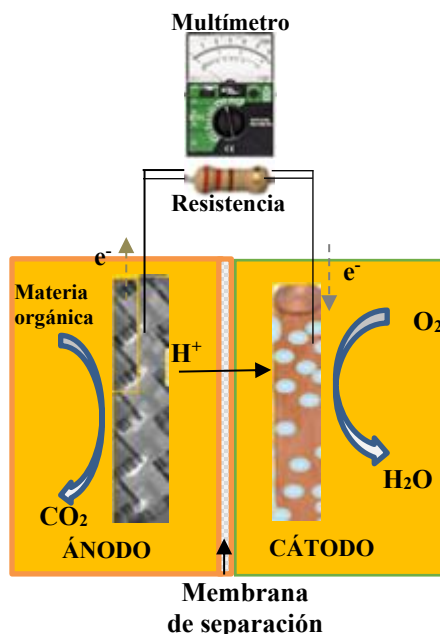


Figura 5. Esquema de una celda de combustible microbiana (CCM) de 2 cámaras con una membrana de separación entre ambas.

En el ánodo ocurre la oxidación de la materia orgánica gracias a los microorganismos presentes, la cual es simultánea a la transferencia de carga eléctrica desde el ánodo hacia el cátodo, en donde ocurre la reducción de los protones para producir hidrógeno gaseoso (ver Tabla 1 y Figura 7) (Kadier, *et al.*, 2016):

Tabla 2. Producción de hidrógeno en una celda de electrólisis microbiana

Reacción anódica	Reacción catódica
$CH_3COO^- + 4H_2O = 2HCO_3^- + 9H^+ + 8e^-$	$2H^+ + 2e^- = H_2$
$E_{an} = -279$ mV (ENH)*	$E_{cat} = -414$ mV ^a (ENH)
Oxidación del acetato	Reducción protónica (pH=7)
*ENH.- Electrodo Normal de Hidrógeno	
<p>a Se refiere al potencial mínimo requerido para la reducción protónica en el cátodo. La diferencia energética entre los potenciales anódico y catódico, deberá suplirse mediante la imposición de un voltaje de corriente directa.</p>	

(Modificado de Folusho, *et al.*, 2010)

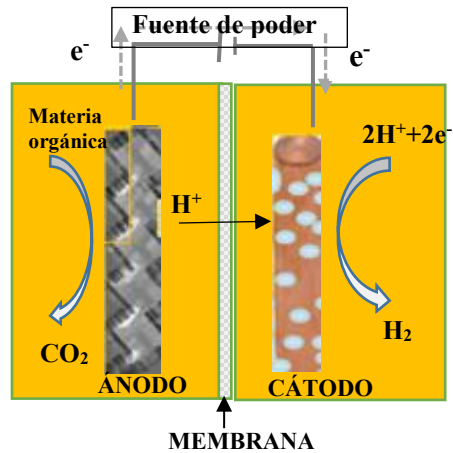


Figura 6. Esquema típico de una MEC de dos cámaras.

Las MECs fueron descubiertas en 2005 por dos grupos de investigadores independientes, un grupo de la Penn State University y otro de la Wageningen University en Holanda. En una MEC las bacterias electroquímicamente activas, oxidan la materia orgánica, generan CO_2 , electrones y protones. Las bacterias transfieren los electrones al ánodo y los protones son liberados a la solución. De allí, los electrones viajan a través de un alambre conductor hacia el cátodo y se combinan con los protones libres, presentes en la solución. El proceso anterior no ocurre espontáneamente, para ello se requiere la imposición de un voltaje externo sobre la MEC $\geq 0.2 \text{ V}$, bajo condiciones biológicas asistidas de $\text{pH}=7$, $T=30 \text{ }^\circ\text{C}$, $P= 1 \text{ atm}$ ($1.01 \times 10^5 \text{ Pa}$) (Kadier, A. *et al.*, 2016). El uso de una MEC como un proceso alternativo de producción de H_2 impulsado eléctricamente, resulta en la conversión de una amplia gama de sustratos orgánicos en H_2 . La tecnología MEC también se llama electrofermentación o celdas de electrólisis biocatalizada. Una MEC se asemeja a una CCM en la que la principal diferencia es la necesidad de una pequeña entrada de voltaje externo (Chandrasekhar, *et al.*, 2015).

La tendencia actual de la Biotecnología y del tratamiento de aguas residuales es la revaloración de los desechos y la producción de energías alternativas. Estos dos enfoques convergen en los Sistemas Bioelectroquímicos Microbianos (SBEM), los cuales se enfocan en la producción de electricidad, biogás, e hidrógeno a partir de la materia orgánica en efluentes y lixiviados de residuos sólidos. Los SBEM se caracterizan por conjuntar elementos de celdas electroquímicas: electrodos, membranas selectivas a iones, y en ocasiones fuentes de voltaje, con elementos de reactores que basan su funcionamiento en biopelículas (bacterias que crecen sobre soportes sólidos). Así pues, los electrodos sirven de soporte para el desarrollo de una biopelícula particular, la cual cuenta con la capacidad de ceder o recibir electrones, es decir, son biopelículas electroquímicamente activas. Cuando un SBEM es alimentado con la materia orgánica de efluentes se logran dos objetivos: la remoción de contaminación del efluente y la producción de energía. En celdas de combustible microbianas (MFC, por sus siglas en inglés) se genera electricidad, y cuando la cámara biológica es completamente anaerobia o carente de oxígeno, también es posible recuperar biogás que sirve como combustible. Por otro lado, en las MECs se produce hidrógeno en una cámara que no contiene microorganismos, y biogás en la que sí los contiene. Este sistema opera en forma

totalmente anaerobia. No obstante, a diferencia de las celdas de combustible, las celdas de electrólisis requieren un impulso de energía (del orden de 0.5 a 1.0 V), que es costeable dado el valor agregado y las ventajas del hidrógeno como fuente de energía limpia (Cercado, B. *et al.*, 2016). Por otra parte, la electrohidrogenesis es un enfoque reciente que ha ganado mucha atención debido a su competencia de conversión de sustrato casi completa y mayores tasas y rendimiento de producción de biohidrógeno (Parkhey, P. *et al.*, 2017). Sin embargo, los sistemas bioelectroquímicos (SBEM) o BES (por sus siglas en inglés) son manejados por microorganismos electroquímicamente activos especiales para alcanzar objetivos tales como (i) tratamiento de residuos para servir a la remediación ambiental, (ii) la producción de productos químicos y (iii) recuperación de energía renovable. En el último aspecto, las celdas de combustibles microbianas (MFC por sus siglas en inglés) y las celdas de electrohidrogenesis microbiana (MEC) se mostraron como enfoques viables. Se considera que las MEC combinan la tecnología de una MFC con la electrólisis. Tanto en una MFC como en una MEC, las bacterias trabajan bajo condiciones anaerobias en el ánodo, para oxidar varios sustratos que van desde compuestos simples, es decir, azúcares, ácidos orgánicos hasta materia orgánica compleja incluyendo aguas residuales de origen distinto, así como efluentes de fermentación. Como resultado, se obtiene un potencial bioeléctrico (en una MFC) o gas H₂ (en una MEC). En principio, Las MECs usan dos electrodos (el ánodo y el cátodo) en circunstancias anaeróbicas. El ánodo es el lugar donde las cepas exoelectrogénicas que, después de colonizar su superficie, forman una biopelícula de respiración anódica. Debido a la actividad metabólica de la biopelícula, los electrones y protones se liberan en la conversión/degradación exitosa del sustrato. Los electrones se transfieren al ánodo (como aceptor final de electrones) por diferentes mecanismos posibles y pasan posteriormente al cátodo a través de un circuito externo. En el cátodo, que desempeña el papel de un donador de electrones, tiene lugar la reducción de H⁺ a H₂ molecular gaseoso (Kumar, G. *et al.*, 2017). El proceso de la electrólisis microbiana, permite producir hidrógeno (H₂) como resultado de la reacción catódica, que atrae a los protones generados en la oxidación de la materia orgánica contenida en el sustrato (Verea, *et al.*, 2014). Las tasas de producción de hidrógeno en una MEC han variado desde un mínimo de 0.01 a 50 m³/m³d (Guo, *et al.*, 2017). Para aplicaciones prácticas de las celdas de electrólisis microbianas (MEC) se requieren altas tasas de producción de hidrógeno y un reactor compacto. Estas metas se pueden alcanzar, reduciendo el espacio entre los electrodos (ya que podría reducir la resistencia óhmica e incrementar la corriente), utilizando una gran área superficial anódica, así como cuidar el control del oxígeno, que cruza o viene desde el cátodo (Azwar, *et al.*, 2014). En las MECs se han utilizado tanto sustratos simples de composición conocida, así como materia orgánica presente en aguas residuales de composición compleja, o también hidrolizados o lixiviados de residuos sólidos. Los sustratos simples como el acetato y la glucosa se emplean en estudios para la comprensión de los procesos bioelectroquímicos, mientras que la materia orgánica compleja se utiliza en pruebas de concepto para el tratamiento de aguas o estudios de escalamiento. Se ha experimentado, que las aguas residuales que se utilizarán como sustrato, no deben contener compuestos tóxicos que inhiban la actividad microbiana, deberán poseer baja concentración de materia orgánica, y preferentemente compuestos no fermentables. Estas características son difíciles de cumplir en aguas residuales reales, por ello las investigaciones se dirigen a delimitar el efecto negativo de estas condiciones y proponer alternativas para resolver esas condiciones de proceso (Cercado, B. *et al.*, 2016). Así mismo, el proceso de electrohidrogenesis (generado en una MEC), tiene ciertas ventajas obvias sobre otros métodos biológicos de producción de

biohidrógeno. En primer lugar, puede utilizar cualquier compuesto orgánico biodegradable como carbohidratos, proteínas, efluentes industriales y agro-desechos como sustrato para la producción de hidrógeno. En segundo lugar, produce hidrógeno a tasas y rendimientos mucho más altos con una mayor eficiencia energética que otras rutas biológicas de producción de hidrógeno. En tercer lugar, el reactor MEC para electrohidrogenesis puede fabricarse utilizando materiales baratos tales como vidrio y plásticos; sin embargo, se prefieren los materiales basados en plástico tales como lexan, poliacrilato y policarbonatos sobre el vidrio, ya que tienen baja resistencia interna, tienen mayor durabilidad y son fáciles de ampliar. La tecnología MEC por lo tanto, significa una utilización perfecta del metabolismo microbiano para la producción de hidrógeno biológico de una manera eficiente de la energía. En el cátodo de una MEC, el medioambiente es anaerobio y, para que los electrodos liberados por las bacterias exoelectrogénicas (ver Figura 8) sean conducidos hacia el cátodo, se requiere la aplicación de un voltaje externo (0.2 V como mínimo) a través de la MEC. Así, los electrones liberados viajan hacia el cátodo de la MEC y reducen a los protones para producir hidrógeno gaseoso, el cual puede ser colectado de manera independiente. Tal voltaje adicional requerido para la producción de hidrógeno, indica que la reacción no es espontánea o termodinámicamente favorable. La eficiencia energética del proceso de evolución del hidrógeno depende en gran medida de la tensión de entrada, que a su vez depende del tipo de sustrato que se utiliza. Si bien algunos informes revelan una eficiencia energética máxima con voltajes de entrada de 0.5 V, muchos otros también reportan una eficiencia máxima de 0.8 o incluso 1 V. El voltaje externo, por lo tanto, es otro parámetro importante del proceso que define la eficacia del proceso. Se han utilizado numerosas fuentes de alimentación externas, como las celdas de combustible y las celdas solares, para impulsar la evolución del hidrógeno en las MEC. Otro aspecto importante relacionado con el proceso de la electrohidrogenesis es la resistencia interna del reactor MEC. La resistencia interna se rige por características tales como la resistencia electrolítica, el material de construcción MEC y la presencia o ausencia de membrana de intercambio iónico. La noción clave en la producción de hidrógeno es reducir la resistencia interna de la MEC para facilitar la transferencia de electrones a través de los electrodos (Parkhey, P. *et al.*, 2017).

1.8. Bacterias utilizadas en los sistemas bioelectroquímicos (SBEs) y transferencia electrónica

Los exoelectrógenos o bacterias de respiración anódica (BRA) más utilizados en los sistemas bioelectroquímicos, pertenecen a la familia de Gammaproteobacteria o Deltaproteobacteria. *Shewanella onediensis* y *Shewanella putrefaciens* pertenecen a la familia de Gammaproteobacteria, y *Geobacter sulfurreducens* a las Deltaproteobacteria, son las bacterias exoelectrogénicas más comúnmente reportadas para la producción de hidrógeno. Las bacterias pertenecientes a otros grupos genéticos como Alphaproteobacteria (*Rhodospirillum rubrum*, *Ochrobactrum*), Betaproteobacteria (*Rhodospirillum rubrum*), Epsilonproteobacteria (*Archaeobacter*), Actinobacteria (*Propionibacterium*), Firmicutes (*Clostridium*), Acidobacteria (*Geothrix*) también se han reportado como bacterias de respiración anódica. Estas BRA implican cualquiera de tres mecanismos para la transferencia extracelular de electrones. El primer mecanismo es el contacto directo, en donde los exoelectrógenos transfieren directamente el electrón a través de su membrana externa a la región donde la colonia está en contacto con el ánodo. Este mecanismo, aunque tiene una pérdida potencial extracelular más baja, solo puede lograr una alta densidad de corriente con

un alto contacto superficial entre el ánodo y la biomasa, cuando es una monocapa. El segundo mecanismo es a través de mediadores de electrones solubles, como las quinonas (*Shewanella putrefaciens*), las fenazinas (*Shewanella oneidensis* MR 1) y las flavinas (*Shewanella* (Parkhey, *et al.*, 2017), que transportan los electrones entre las bacterias y el electrodo por medio de transporte difusivo (Kadier, *et al.*, 2016). Este mecanismo resulta en una pérdida potencial inherente ya que el transporte difusivo de electrones requiere un gradiente de concentración (Parkhey, *et al.*, 2017). El tercer mecanismo de transferencia de electrones es a través de nanocables (pili celular, Kadier, *et al.*, 2016) o apéndices de conexión, más comúnmente reportado en *Shewanella* y *Geobacter* (Parkhey, *et al.*, 2017).

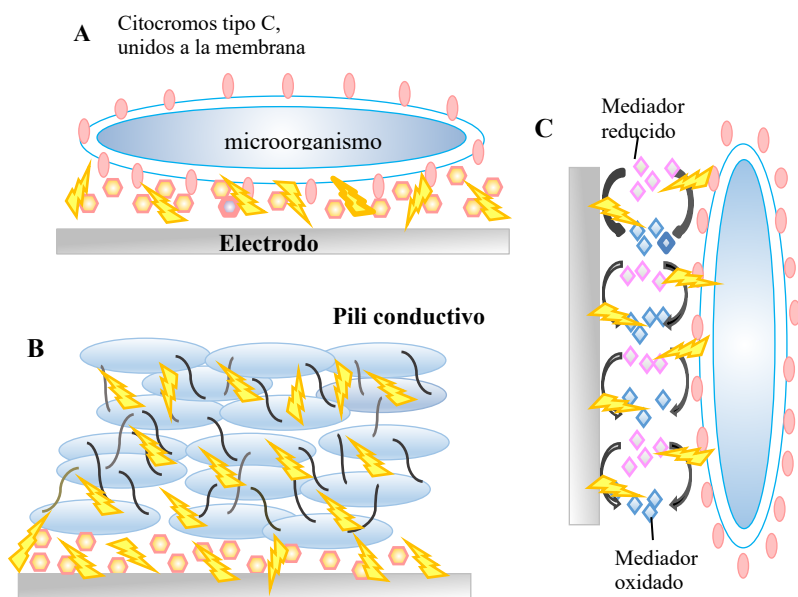


Figura 7. Esquema de los mecanismos de transferencia de electrones: directo (A y B) e indirecto (C) (Modificado de Lovley, 2012)

Por otro lado, la transferencia de electrones directa se realiza mediante el contacto directo de los microorganismos con la superficie de un electrodo. Las bacterias presentan en su membrana celular o en la matriz extracelular diversidad de proteínas redox activas como los citocromos o complejos enzimáticos asociados a membrana (Lovley, 2012). El mecanismo también incluye la transferencia de electrones mediante pilis conductivos o nanocables; estas estructuras tienen una forma de pelo muy delgado, los microorganismos los forman en respuesta a la transferencia limitada de electrones, y permiten a las células que no se encuentran unidas a los electrodos establecer un contacto directo (Reguera *et al.*, 2005). Transferencia de electrones indirecta: mediante moléculas redox orgánicas e inorgánicas, que los microorganismos pueden secretar al medio o liberar en la degradación de materiales biológicos. Estas moléculas son reducidas u oxidadas fuera de la membrana celular para posteriormente donar o aceptar los electrones hacia o desde un electrodo. Se conocen como mediadores redox endógenos y los más estudiados son las piocianinas y los ácidos húmicos (Rabaey *et al.*, 2007). Este mecanismo también funciona con moléculas redox artificiales que son agregadas al medio. Éstas moléculas son mediadores redox exógenos y los más utilizados

son el rojo neutro, el metil viológeno y el ácido antraquinona-2,6-disulfónico. A pesar de sus ventajas, los mediadores artificiales pueden ser tóxicos para los microorganismos y son un costo adicional de operación (Huang y Angelidaki, 2008) (Aguilar, *et al.*, 2016)

	<i>Shewanella onediensis</i>	Betaproteobacteria	<i>Rhodoferrax</i>
Gammaproteobacteria			
	<i>Shewanella putrefaciens</i>	Epsilonproteobacteria	<i>Arqueobacter</i>
Deltaproteobacteria	<i>geobacter sulfurreducens</i>	Actinobacteria	<i>Propionibacterium</i>
	<i>Rhodopseudomonas</i>	Firmicutes	<i>Clostridium</i>
Alphaproteobacteria			
	<i>Ochrobactrum</i>	Acidobacteria	<i>Geothrix</i>

Figura 8. Tipos de bacterias exoelectrogénicas (Parkhey, *et al.*, 2017; Kadier, *et al.*, 2016).

Los sustratos utilizados en una MEC, se consideran como uno de los factores más importantes que afectan la generación de H₂. El tipo, la concentración y la velocidad de alimentación del sustrato son vitales para la MEC, ya que determina el proceso de reacción y el rendimiento de H₂. Se puede utilizar una gran variedad de sustratos para la producción de H₂ en una MEC, que van desde compuestos puros hasta mezclas complejas de materia orgánica contenidas en las aguas residuales. La Figura 10, ilustra una clasificación de sustratos que se han utilizado en los estudios de una MEC:

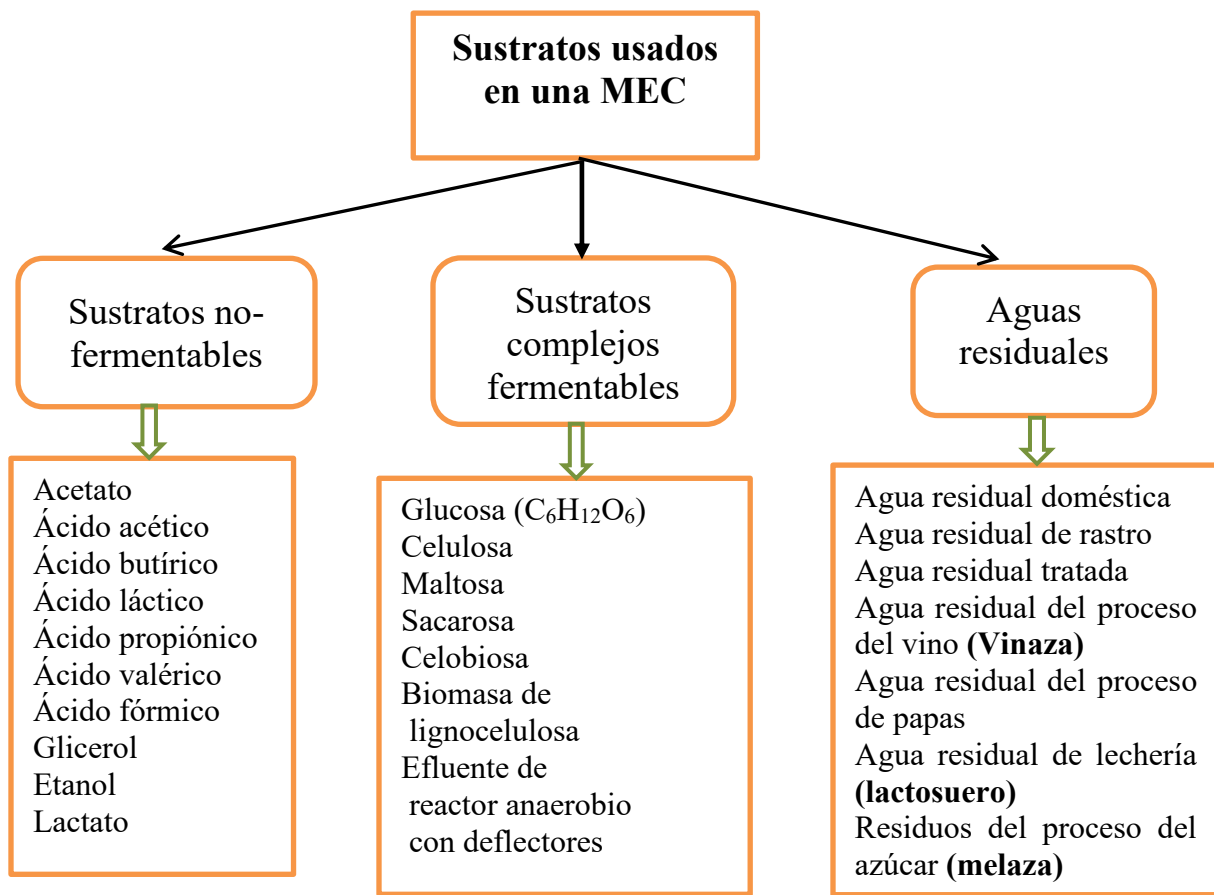


Figura 9. Clasificación de diferentes sustratos usados en celdas de electrólisis microbianas (MEC) (Kadier, *et al.*, 2016)

De las anteriores, la vinaza, el lactosuero y la melaza se utilizaron en esta investigación.

1.9. Vinaza como contaminante

La vinaza es un líquido de color café turbio, por el elevado contenido de sólidos en suspensión que contiene, presenta un olor característico a alcohol-caramelo, similar al adquirido por el agave cocido y se compone, en promedio, de 90% de agua y 10% de sólidos. La principal característica es su alta carga orgánica, lo que se refleja en las concentraciones de la Demanda Química de Oxígeno (DQO) y la Demanda Bioquímica de Oxígeno (DBO), cuyos parámetros varían en promedio en un intervalo de 60.0-100.0 y de 35.0-60.0 g/l, respectivamente, además de los sólidos en suspensión, cuyo rango es de 20.0 a 50.0 g/l y otras sustancias. Otro aspecto que hace a las vinazas agresivas al medio ambiente es su descarga a altas temperaturas (85 - 90 °C), lo cual las convierte, además, en un contaminante térmico. Las vinazas se han convertido en un problema ambiental que requiere atención inmediata ante las perspectivas de crecimiento del sector. Se vislumbran algunos usos de las vinazas, además de la agricultura: los biocombustibles, su uso como sustrato y la obtención de algunos compuestos se presentan como alternativas para su aprovechamiento. Tradicionalmente, las vinazas son vertidas a cuerpos de agua y campos de cultivo, sin embargo, el uso de vinazas para riego ha sido cuestionado, pues componentes como grasas y aceites se transforman en ceras que forman una película capaz de impermeabilizar los suelos,

evitando la filtración del agua; además, se ha demostrado que sus efectos en la microbiota y en la textura del suelo son negativos (López, *et al.*, 2010; Abreu, *et al.*, 2013).

1.10. Melaza como residuo contaminante

La melaza es el residuo de cristalización final del azúcar, del que no se puede obtener más azúcar por métodos físicos. México produjo 2,04 millones de toneladas de melaza en 2020/21, un aumento de 80 mil toneladas anuales (<https://www.czapp.com/es/analyst-insights/mexico-la-produccion-de-melaza-rebota-tras-la-sequia-3/>). Su aspecto es similar al de la miel de abeja aunque de color parduzco muy oscuro, prácticamente negro. El sabor es dulce, agradable, según los expertos, cuanto más oscura sea, más sabor y nutrientes tendrá. La melaza contiene de 75 a 83% de materia seca, 30 a 40% de sacarosa, 2.5 a 4.5% de compuestos nitrogenados (predominado aspartato y glutamato) y aproximadamente, 0.4 a 1.5% de nitrógeno. La melaza contiene de 26 a 40% de sacarosa y de 12 a 25% de azúcares reductores, con un contenido total de azúcar de más de 50 a 60%. El contenido de proteína cruda normalmente es bastante bajo (cerca del 3%) y variable, el contenido de ceniza varía de 8-10%, constituido principalmente por K, Mg, Ca, Cl y sales de azufre. Esta composición es precisamente lo que le da a la melaza un gran valor alimenticio como suplemento en la elaboración de piensos para la alimentación de ganado. La melaza se considera como un residuo industrial no tóxico (<http://ww.gov.mx/cms/uploads/attachment/file/171888/Nota Informativa Noviembre Melazas>).

1.11. Suero de leche o Lactosuero

El lactosuero o suero de leche se define como un producto lácteo obtenido de la separación del coágulo de la leche, de la crema o de la leche semidescremada durante la fabricación del queso, mediante la acción ácida o de enzimas del tipo del cuajo (renina, enzima digestiva de los rumiantes) (Poullikkas, *et al.*, 2017) que rompen el sistema coloidal de la leche en dos fracciones: 1). Una fracción sólida, compuesta principalmente por proteínas insolubles y lípidos, las cuales en su proceso de precipitación arrastran y atrapan minoritariamente algunos de los constituyentes hidrosolubles. 2) Una fracción líquida, correspondiente al lactosuero en cuyo interior se encuentran suspendidos todos los otros componentes nutricionales que no fueron integrados a la coagulación de la caseína (Poveda, *et al.*, 2013). Sin embargo, la mayor parte del lactosuero es vertido en los desagües, ríos u otros cuerpos de agua.

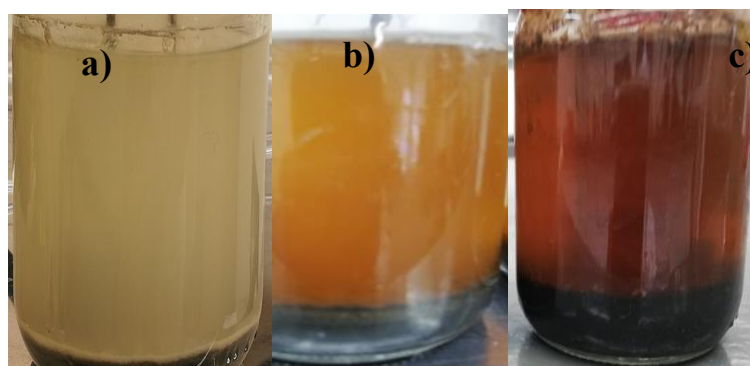


Figura 10. Aspecto del suero de leche (a), vinaza tequilera (b) y melaza de caña (c).

1.12. Caracterización de la Actividad Bioelectroquímica

Las MECs son analizadas y comparadas en términos de producción de corriente, tasas de producción de hidrógeno, recuperación de hidrógeno y recuperación de energía. La corriente es típicamente referida al área superficial de cualquier electrodo (m^2) o al volumen del reactor (m^3), lo que permite una mejor comparación entre los diferentes reactores que simplemente reportan la corriente en mA o A. La corriente relaciona directamente la tasa de producción de hidrógeno con los electrones que viajan al cátodo y que se convierten eventualmente en gas. El uso de grandes áreas superficiales anódicas, menor espacio entre los electrodos, diferentes materiales de fabricación de la membrana (si se usa) y mejores diseños en el reactor, han incrementado los rendimientos en la densidad de corriente y la recuperación de hidrógeno en una MEC (Kadier, *et al.*, 2016). Debido a la naturaleza electroquímica de las MEC, se han implementado diferentes técnicas electroquímicas para evaluar el desempeño de las mismas. Las MECs son sistemas más complejos que los sistemas electroquímicos tradicionales, pues los procesos de transferencia de electrones son mediados por microorganismos, por lo que se debe tener en claro el tipo de técnicas que se emplearán para obtener e interpretar correctamente la información. A continuación, se describen los principios electroquímicos y algunas de las técnicas empleadas:

1.12.1. Potencial a Circuito Abierto.

El potencial de circuito abierto (OCP por sus siglas en inglés) es el potencial de un electrodo medido contra un electrodo de referencia utilizando generalmente un potencióstato. El sobrepotencial, es la medida de la irreversibilidad de los procesos que ocurren, es decir, es la diferencia entre el potencial de equilibrio (reversible) de un electrodo con corriente neta cero y su potencial operativo con un flujo de corriente neta. Representa el voltaje máximo producido cuando la MEC se encuentra a circuito abierto. En la Figura 12 se observa una curva típica de PCA en un sistema biológico. En otras palabras, el análisis del OCP determina el voltaje producido en un BES o el potencial generado por una reacción redox durante la corrosión de materiales de electrodos sumergidos en una solución.

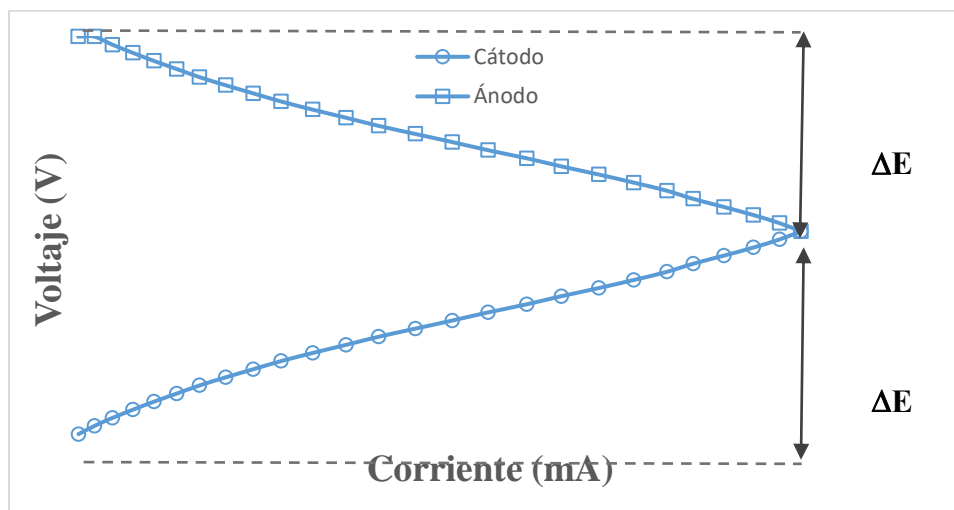


Figura 11. Curva de potencial de circuito abierto (OCP) para un sistema bioelectroquímico.

1.12.2. Voltametría de barrido lineal (LSV)

En este tipo de Voltametría, la celda se compone de tres electrodos sumergida en la disolución del analito. Al electrolito problema se le suele añadir un exceso de electrólito no reactivo "electrólito soporte". Se denomina "de barrido lineal" porque se modifica linealmente el potencial del microelectrodo durante el análisis (Figura 13) (Paz, *et al.*, 2016).

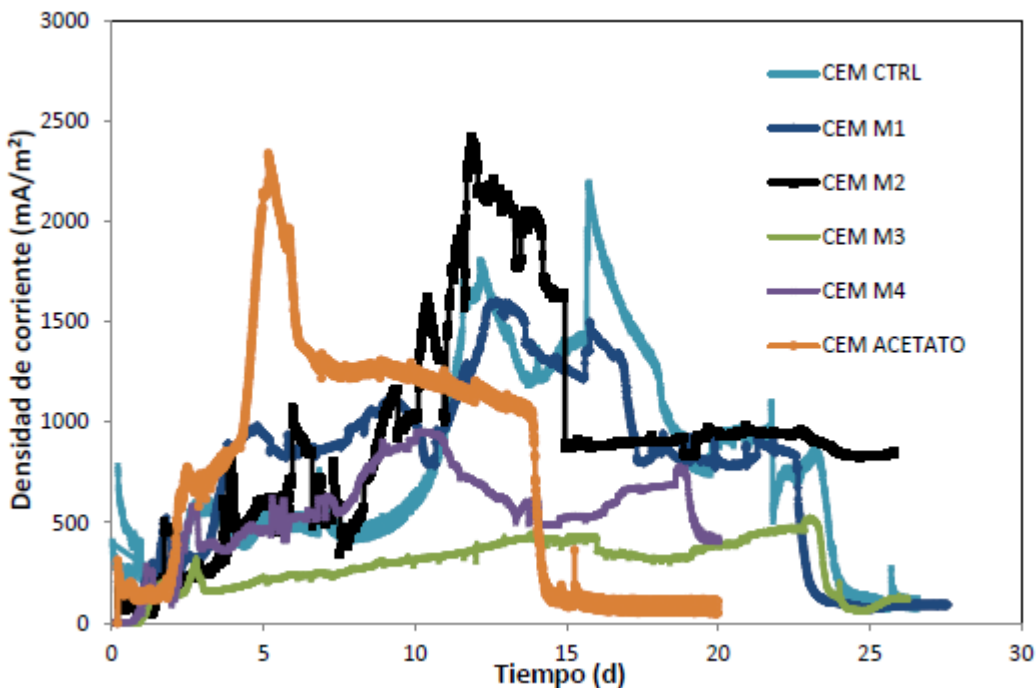


Figura 12. Voltametría de barrido lineal y la evolución de la densidad de corriente en el tiempo (Paz, 2016. Tesis IPICYT)

1.12.3. Impedancia electroquímica galvanostática (Eisgalv)

La impedancia es la medida de la oposición de un sistema ante una acción periódica ejercida sobre él, que puede tomar la forma de un voltaje, una fuerza o una onda de presión, entre muchas acciones posibles. La MEC, al ser un sistema bioelectroquímicos posee todas las propiedades inherentes a la electricidad como son la conductividad eléctrica y impedancia.

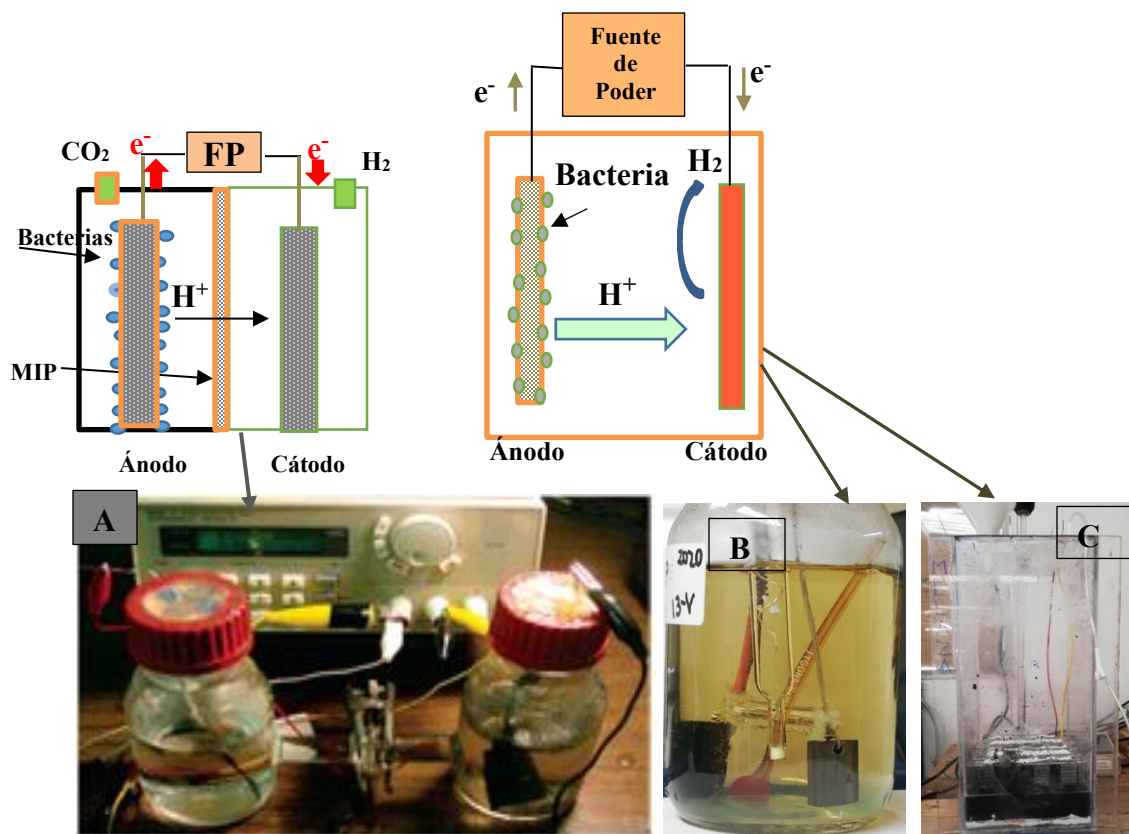
1.13. Factores que afectan la producción de hidrógeno en una MEC

Varios factores pueden afectar la tasa de producción de hidrógeno en una MEC que incluyen los siguientes: 1) la arquitectura del reactor, 2) materiales de construcción de los electrodos, 3) la composición química de la solución, 4) la operación en modo batch o de flujo continuo de la celda y 5) tamaño y tipo de inóculo.

1.13.1. Arquitectura del reactor

Las celdas de electrólisis microbiana se diseñan típicamente como un sistema de dos cámaras con las bacterias en la cámara del ánodo separada de la cámara del cátodo por una

membrana. El uso de una membrana no solo reduce el cruce de combustibles y bacterias del ánodo a la cámara del cátodo y ayuda a mantener la pureza del hidrógeno gaseoso generado en el cátodo, sino que también funciona como separador para evitar cualquier cortocircuito. Sin embargo, el inconveniente de usar una membrana en una MEC es que puede afectar la transferencia de protones y/o iones hidroxilo a pH neutro y, por lo tanto, aumentar la resistencia interna. El principal desafío de usar este tipo de MEC (Figura 14) es la alta resistencia de la membrana, que puede contribuir a las bajas densidades de corriente ($0,2\text{--}0,3\text{ A/m}^2$) y la tasa de producción de hidrógeno ($0.015\text{--}1.1\text{ m}^3/\text{día/m}^3$) cuando se utiliza este tipo de MEC. Se desarrolló un sistema MEC de una sola cámara recientemente sumergiendo tanto el ánodo como el cátodo en la solución en una cámara (Figura 13B y 13C). El cuerpo se puede hacer con un frasco de vidrio (Figura 13B) o una caja rectangular de acrílico (Figura 13C). Una de las ventajas de usar MECs de una sola cámara es que la eliminación de la membrana puede reducir la pérdida de potencial causada por la resistencia de la membrana, lo que aumenta la densidad de corriente y la alta tasa de producción. Las densidades de corriente ($4.2\text{--}12\text{ A/m}^2$) generadas por las MEC de una sola cámara fueron generalmente más altas que las de los MEC de doble cámara con membranas ($0.4\text{--}3.3\text{ A/m}^2$). Otras ventajas de usar MEC de una sola cámara incluyen la facilidad de fabricación y esterilización en autoclave (con menos partes móviles) y la falta de problemas relacionados con las membranas, tales como incrustaciones, degradación y alto costo (Liu , *et al.*, 2010).



(Modificado de Karthikeyan, *et al.*, 2017)

Figura 13. Esquemas e imágenes de MECs con membrana de separación (A) y sin membrana (B y C)

La mayor ventaja de usar una MEC de cámara única es la reducción de pérdidas de potencial, como consecuencia de la eliminación de la membrana. Esto aumenta la densidad de corriente y la tasa de producción de hidrógeno apreciablemente. Los datos obtenidos indican que las densidades de corriente y las eficiencias coulombimétricas obtenidas en una MEC de una sola cámara (4.7–9.3 A/m²; 98–127%) son mucho mayores que las obtenidas en una MEC de doble cámara (0.4–2.9 A/m²; 28–68%). La razón de tal diferencia estriba en la mayor resistencia de la MEC de doble cámara debido a la presencia de la membrana de intercambio iónico. Sin embargo, la producción de metano por bacterias hidrogenotróficas con recuperaciones reducidas de hidrógeno es probablemente la desventaja más importante de una MEC sin membrana. Incluso se informó que Las MECs de doble cámara producen gas de hidrógeno contaminado con gases como el CO₂ y el metano. Una de las estrategias que se ha sugerido para reducir la producción de metano en una MEC sin membranas, es la exposición periódica del reactor al aire entre los ciclos de alimentación. Call y Logan 2008, informaron que a voltajes de entrada de más de 0,2 V, la producción de metano se limitó a alrededor del 4% mientras que el gas H₂ se produjo con más del 87% de pureza. Con un voltaje de entrada de 0.6 V, la concentración de metano se redujo aún más al 0.9%. Hu *et al.*, 2009, también informaron menos del 1% de concentración de metano con 15 minutos de exposición del ánodo al aire con un 64% de recuperación total de hidrógeno (Parkhey, *et al.*, 2017).

Un enfoque novedoso para reducir la metanogénesis fue presentado por Chae *et al.*, 2010, en el que utilizaron inhibidores químicos del 2-bromoetanosulfonato y la lumazina para prevenir el crecimiento de metanógenos. Informaron que una concentración de 286 μM redujo las pérdidas de electrones metanogénicas de 36.4% a 2.5% mejorando la eficiencia de producción de hidrógeno de 56% a 80% (Parkhey, P. *et al.*, 2017). Además, es importante agregar que en la última década, las MECs como una nueva fuente de biocombustibles han sido ampliamente revisadas. Estos incluyen información actualizada del inóculo, los materiales de los electrodos, la arquitectura de la celda, rendimiento y eficiencia energética de estos sistemas MEC, material del cátodo y catalizadores adecuados para generar H₂ en la MEC, los recientes avances en el mecanismo y operación de una MEC, los sustratos utilizados en la misma, así como las nuevas aplicaciones de las MEC y su rendimiento resultante. Los mecanismos de transferencia electrónica externa de dos bacterias principales en los estudios de los Sistemas Bioelectrolíticos (BES), *Geobacter sulfurreducens* y *Shewanella oneidensis* fueron descritos con gran detalle. Sin embargo, aún falta una revisión exhaustiva sobre las configuraciones de las MEC (Parkhey, P. *et al.*, 2017). Hasta donde se sabe, las tasas máximas de producción de hidrógeno (HPR por sus siglas en inglés) de las MEC de pequeña escala (volumen <100 ml) y talla mediana (100 ml <volumen <1 L) han alcanzado 50 L/L d y 2.8 L/ L d, respectivamente, mientras que para los mayores de 1 L, los HPR no han superado 1 L/L d. El bajo rendimiento de las MECs más grandes se atribuye en gran parte a la baja relación existente, entre la superficie del electrodo y el volumen del reactor, las grandes resistencias internas causadas por la alta resistencia de los electrodos de carbono y la deficiente transferencia de masa en el reactor más grande (Guo, *et al.*, 2017). De acuerdo con Sun *et al.*, 2016, algunos factores internos que pueden deteriorar el rendimiento de una BES son:

- (i) bioincrustación y bloqueo de la membrana (si se usa) (obstrucción del transporte de protones a la cámara del cátodo),
- (ii) crecimiento excesivo del biofilm anódico [causando capas no conductoras (muertas)], tasa de difusión de sustrato limitada e

- (iii) inactivación del cátodo debido a la deposición de agregados de sal (ocupando en parte los sitios reactivos y bloqueando el transporte de protones a la superficie). Además, la cantidad de electrones que alcanzan el ánodo (como aceptor de electrones en condiciones anaeróbicas) influirá en la densidad de corriente, que es la medida común para expresar la actividad electroquímica de la biopelícula y determina la recuperación catódica de H₂ así como la tasa de producción del mismo (Kumar, *et al.*, 2017).

1.13.2. Materiales de construcción de los electrodos.

Muchas estrategias se han adaptado para mejorar el rendimiento del ánodo en un MFC y MEC. No obstante que muchos factores afectan la resistencia interna, reducir el espacio entre los electrodos (Parkhey, *et al.*, 2017) y utilizando una gran área superficial anódica, así como cuidar el control del oxígeno, que cruza o viene desde el cátodo, podría reducir la resistencia óhmica e incrementar la corriente en una MEC *v. g.* el ánodo tipo brocha en una MEC, que tuvo una gran área superficial, con un espacio entre electrodos de 2 cm, generó una mayor tasa de producción de hidrógeno y mayor eficiencia energética que una MEC con un cátodo plano y 1 cm de espacio entre electrodos (Cheng, *et al.*, 2011). Un pequeño cambio en el espaciado de los electrodos provoca una gran disminución en la resistencia interna del sistema con una solución de baja conductividad. Mientras que en las soluciones de conductividades más altas, el efecto del espaciado de los electrodos en la resistencia interna no fue significativo. Hutchinson *et al.* 2011 informó que aumentar la separación de los electrodos de 0.4 a 1.4 cm y reducir la conductividad de la solución de 7.8 mS/cm a 1.8 mS/cm, incrementaba la resistencia interna del sistema (Khan, *et al.*, 2017). No obstante, la naturaleza del material y el diseño de los electrodos juegan un papel importante en la definición de la eficiencia de un reactor MEC para la producción de hidrógeno. Los electrodos deben ser altamente conductivos (es decir, deben tener baja resistencia eléctrica), no deben corroerse fácilmente, deben de conseguirse de manera fácil y económica y deben ser escalables (ver Tabla 2 y Figura 19). Los materiales a base de carbono, como el grafito, están por encima de otros metales en cuestiones de menor costo, alta durabilidad y menos corrosión. Las láminas y varillas de acero inoxidable también se utilizan como material de electrodo, ya que son baratas, de fácil acceso y se pueden personalizar en diversas formas y diseños. Fan *et al.*, 2011, describieron la aplicación de ánodos de grafito recubiertos con nanopartículas de oro (Au) y paladio (Pd) para una generación mejorada de corriente en una MEC con multiánodos. Sus hallazgos, usando *Shewanella onediensis* MR-1 revelaron que el ánodo con nanopartículas de Au producía 20 veces más y los ánodos con Pd producían densidades de corriente 50-150% más altas que los ánodos de grafito normal. Por otro lado, las modificaciones en el diseño y la disposición del ánodo han mejorado sustancialmente el rendimiento de las celdas bioelectroquímicas. Algunos de los enfoques más comunes son la optimización de la disposición del ánodo, el uso de ánodos porosos y ánodos recubiertos de nanopartículas para aumentar la producción actual. Liang *et al.*, 2011, estudiaron diferentes modos de arreglo del ánodo y concluyeron que al colocar los ánodos en disposición de apilamiento, la densidad de corriente y la tasa de producción de hidrógeno aumentaron a 621 ± 20.6 A/m³ y 5.56 m³/m³/d, lo que representó un incremento de 72% y 118% respectivamente. Sin embargo, el verdadero desafío es identificar y diseñar mejores cátodos para la producción de hidrógeno en una MEC (Parkhey, P. *et al.*, 2017).

1.14. Resistividad eléctrica de los materiales conductores

Una propiedad muy importante de los materiales conductores que nos sirve para diseñar mejores cátodos, es la resistividad o resistencia específica propia de un material. La resistividad indica qué tanto se opone el material al paso de corriente. La resistividad es la resistencia eléctrica específica de un material. Se designa por la letra griega rho minúscula (ρ) y se mide en ohmios por metro ($\Omega \cdot m$). Su valor describe el comportamiento de un material frente al paso de corriente eléctrica, por lo que da una idea de lo buen o mal conductor que es. Un valor alto de resistividad indica que el material es mal conductor mientras que uno bajo indicará que es un buen conductor. Generalmente la resistividad de los metales aumenta con la temperatura, mientras que la resistividad de los semiconductores disminuye ante el aumento de la temperatura (Serway. Physics for Scientists and Engineers). En la siguiente Tabla 2, se pueden observar las resistividades de diferentes materiales:

Tabla 3. Resistividades de diferentes materiales

Símbolo	Metal	Resistividad	
		ρ (20-5°C)	$1 \times 10^{-8} \Omega \cdot m$
		No.	Valor
Ag	Plata	1	1.59
Cu	cobre	2	1.7
Au	oro	3	2.44
Al	aluminio	4	2.82
W	tungsteno	5	5.6
Zn	cinc	6	5.9
Ni	níquel	7	6.4
Fe	hierro	8	8.9
Pt	platino	9	10.6
Pd	paladio	10	10.54
Sn	estaño	11	11.5
Pb	plomo	12	22
Cgr	grafito	13	60
SS301	S steel 301	14	72

(Fuente: www.unicrom.com consultado el 8/08/2018)

Al graficar los valores de la Tabla 3, obtenemos la gráfica de la Figura 14, en donde podemos observar, que los valores de las resistividades de los materiales utilizados para la construcción de los electrodos en una MEC (Carbono y sus derivados, Acero inoxidable (SS o Stainless Steel por sus siglas en inglés) y platino; los dos primeros tienen mayores resistividades que los otros materiales no utilizados en forma común en las diferentes investigaciones. Lo anterior nos sirve para diseñar mejores electrodos, que posean una menor resistividad, es decir que conduzcan de mejor manera la corriente eléctrica entre los electrodos y, así coadyuvar a la disminución de la resistencia interna de la MEC y mejorar el comportamiento de la misma. Por ejemplo, si analizamos los materiales que se encuentran por debajo del Plomo (Pb), todos tienen una menor resistividad a éste, así como al Carbono y sus derivados,

y aún más al acero inoxidable (SS) que posee la mayor resistividad de toda la muestra de materiales conductores. Por lo tanto, podemos escoger cualquiera de ellos, ya sea uno solo para ambos electrodos, o bien, uno diferente para el ánodo y otro para el cátodo.

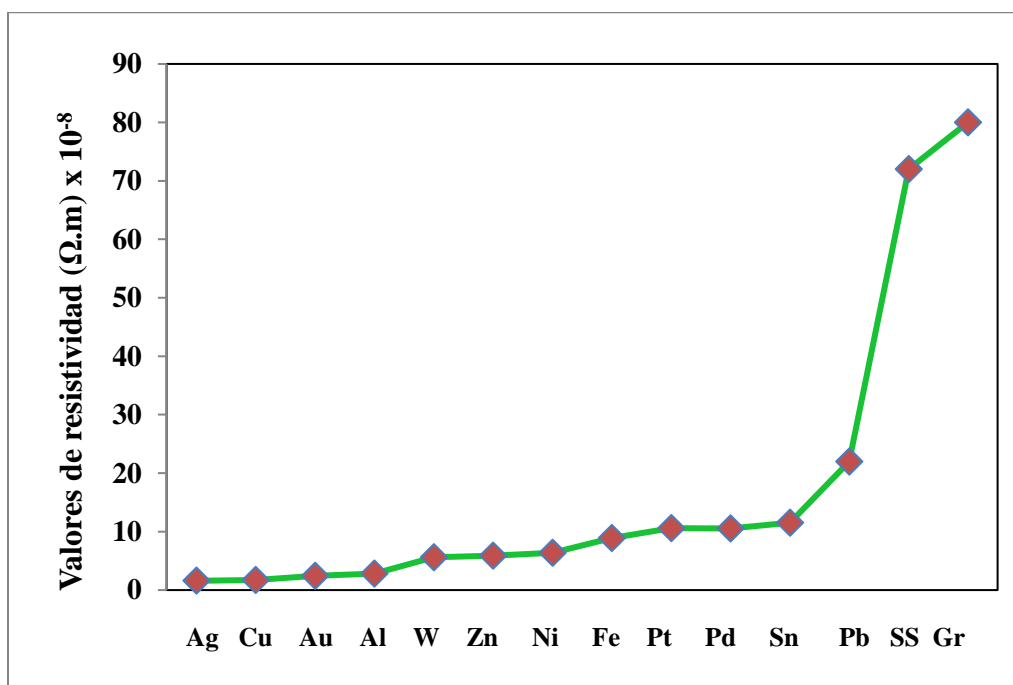


Figura 14. Resistividades de diferentes materiales.

La presencia de catalizadores de platino reduce los sobrepotenciales catódicos al disminuir la energía de activación y, por lo tanto, hace que la tasa de reacción en general sea favorable. Por lo tanto, es necesario identificar los sustitutos de platino que sean más baratos, pero su eficiencia en la evolución de hidrógeno permanezca comparable al catalizador de platino. El más común de estos materiales son los catalizadores de acero inoxidable y catalizadores basados en el níquel. Sus ventajas más evidentes son su bajo costo, fácil disponibilidad, bajo sobrepotencial y su estabilidad en soluciones alcalinas.

1.15. Relación entre el área de los electrodos y el volumen del líquido

Verea, *et al.*, 2014, estudiaron el efecto de la proporción entre el área de los electrodos y el volumen del líquido en el reactor ($A_{\text{electrodos}}/V_{\text{reactor}}$), encontrando que la relación mayor a 1 mejora la producción de hidrógeno.

1.16. Reacción de evolución del H_2 sobre el Ni como catalizador

Para disminuir el gasto de energía aplicada ($kWh/m^3 H_2$) y aumentar la tasa de producción de H_2 (es decir, $m^3 H_2/m^3 MEC \cdot d$) de una MEC, se utiliza un catalizador en el cátodo. El catalizador disminuye el potencial de activación de HER, es decir, la energía de activación para la reacción de transferencia de carga en la superficie del cátodo. Las primeras MECs utilizaron un cátodo con catalizador de Pt. Sin embargo, los altos costos de Pt han estimulado la búsqueda de catalizadores alternativos, como metales de transición no-nobles. Estudios

previos han mostrado que los cátodos basados en catalizadores de metales no-nobles como Fe y Ni, podrían utilizarse como cátodos en una MEC y obtener buenos resultados (Jeremiasse, *et al.*, 2011).

Un cátodo adecuado debe tener las siguientes propiedades: gran área de superficie activa, estabilidad electroquímica, alta área de superficie específica, alta tasa de producción de H₂, excelente estabilidad de ciclo y bajo sobrepotencial de hidrógeno. Dado que el Ni tiene un sobrepotencial más bajo y una densidad de corriente más alta, se considera un catalizador de metal no-noble muy prometedor para el cátodo de una MEC (Wang, *et al.*, 2018).

La mayoría de los métodos actuales de producción de hidrógeno utilizan procesos como el reformado con vapor y la gasificación del carbón que dependen de fuentes de energía no renovables. La electrohidrogenación utilizando células de electrólisis microbiana (MEC) es un enfoque prometedor para la producción de hidrógeno a partir de materia orgánica, incluidas las aguas residuales y otros recursos renovables. En un MEC, las bacterias exoelectrogénicas oxidan la materia orgánica en CO₂, electrones y protones. Las bacterias transfieren electrones de la reacción de oxidación al ánodo y liberan protones a la solución. El gas hidrógeno se forma por la reacción entre electrones y protones en el cátodo, que se logra al agregar un voltaje suplementario (0.114 V en teoría para el acetato como sustrato) al producido por las bacterias (aproximadamente 0.2 V) para superar la barrera endotérmica de la formación de hidrógeno (0.414 V) (Selembo, *et al.*, 2010).

La cinética de la evolución electroquímica del hidrógeno en un medio ácido se mejora aleando Ni con un metal de transición (hacia el lado izquierdo del Ni en la tabla periódica). Se encontró que dos efectos son responsables del comportamiento observado: (i) un aumento en la rugosidad de la superficie y (ii) un aumento en la actividad intrínseca del material debido a la modificación de la densidad de electrones en los orbitales d sobre o encima de la aleación (Navarro, *et al.*, 2005).

La pluralidad de fases implicadas en la reacción de evolución del H₂, apunta a un mecanismo bifuncional, en el que ciertos sitios ayudan a estabilizar el agua a medida que un protón se adsorbe en la superficie (Ecuación 24), y diferentes sitios catalizan un paso Tafel (Ecuación 25) o un paso de Heyrovsky (Ecuación 26):



Las aleaciones de níquel-molibdeno (Ni-Mo) en particular se han convertido en los catalizadores de metales no preciosos de mejor rendimiento para la HER, con potenciales de inicio competitivos con Pt electro-depositado. Sin embargo, si bien las aleaciones de Ni-Mo co-electro-depositadas y co-sintetizadas han sido objeto de un amplio estudio, la naturaleza del sitio o sitios activos y el mecanismo de mejora no han sido clarificados (Mckay, *et al.*, 2016).

1.17. Materiales usados para los cátodos

1.17.1. Cátodos de malla de acero inoxidable

Un desafío para la comercialización de la tecnología de una MEC, es diseñar un cátodo de bajo costo y altamente eficiente. El acero inoxidable (SS) es muy económico, y los cátodos hechos de este material con altas áreas de superficie específica pueden lograr un rendimiento similar al de los cátodos de carbono que contienen un catalizador de platino en una MEC. Los cátodos de malla de SS dieron un área de superficie más alta que los electrodos de placa plana. Así mismo, las pruebas de voltametría cíclica mostraron que el área de superficie electroquímicamente activa de una malla de cierto tamaño podría ser tres veces más grande que una lámina plana.

La malla de acero inoxidable al ser plana, permite un mayor acercamiento entre el cátodo y el ánodo, además, la malla puede producir áreas de superficie más altas que las láminas planas de este u otro metal. Las mallas se caracterizan en términos de número de malla (número de líneas de malla por pulgada), con diferentes diámetros de alambre y tamaños de poros. Si bien, con el uso de esta malla se pueden obtener mayores tasas de evolución del hidrógeno, debido al aumento del área superficial, también es cierto que la evolución de las burbujas de hidrógeno, se afectarían por el tamaño de los poros y los alambres. La composición química de la malla (tejida o expandida) de SS utilizada en la investigación, tuvo la siguiente composición: SS 304 (0.08% C, 2% Mn, 1% Si, 18-20% Cr y 8-11% Ni) (Zhang, *et al.*, 2010). Por otro lado, otras alternativas de cátodos basadas en Co y FeCo para sustituir al Pt, fueron examinadas por Cheng & Logan en 2008, en una celda electroquímica de tres cámaras; se encontró que estas alternativas tenían un rendimiento 40–80% mejor que las superficies no catalizadas, pero estas alternativas no igualaban el rendimiento de Pt en sus pruebas electroquímicas utilizando voltametría cíclica (Wang, *et al.*, 2011). Para lograr una alta tasa de producción de H₂ volumétrica mediante un voltaje aplicado menor, se deben minimizar las pérdidas de potencial. Las mayores pérdidas de potencial son causadas por el sobrepotencial del ánodo y el sobrepotencial del cátodo. El sobrepotencial del ánodo puede reducirse mejorando la carga y el transporte masivo del ánodo, por ejemplo, utilizando un flujo a través del ánodo. El sobrepotencial del cátodo puede disminuirse utilizando un cátodo basado en Pt (para disminuir el sobrepotencial de activación) y mejorando el transporte de masa (para disminuir el sobrepotencial de concentración). Sin embargo, el alto precio de los cátodos basados en Pt aumenta los costos de capital en una MEC. Por lo tanto, es necesario desarrollar un cátodo de metal no noble que sea más económico. La mayoría de los cátodos de metales no nobles investigados para una MEC se basan en Ni y sus aleaciones (Ni-P, Cu/Ni, Ni-W-P y otros), y malla de acero inoxidable. El Ni tiene un sobrepotencial de HER menor y es más estable en condiciones alcalinas que la mayoría de los otros metales no nobles, como el Fe (Jeremiasse, *et al.*, 2010). El cátodo es la parte más importante en una MEC donde se produce el H₂, y el precio del cátodo representa aproximadamente la mitad del costo total. La malla de acero inoxidable, tiene una gran área de superficie activa de hasta 78 m²/m³. Y así, el cátodo de malla de Ni es superior al Pt en la velocidad de producción y la densidad de corriente volumétrica. Un cátodo adecuado para la producción de H₂, debe tener las siguientes propiedades: gran área de superficie activa, estabilidad electroquímica, área de superficie específica alta, alta tasa de producción de H₂, excelente estabilidad en varios ciclos y bajo potencial de hidrógeno. Dado que el Ni tiene un sobrepotencial más bajo y una mayor densidad de corriente, se considera un catalizador de metal no noble muy

prometedor para el cátodo MEC. La deposición del Ni se realiza sobre una base que actúa como soporte, para ello se usan entre otros: papel carbón, cobre u otro metal, ya sea en forma sólida o en forma de malla (Wang, *et al.*, 2018).

1.17.2. Cátodos de Cobre y Níquel

Se han utilizado cátodos de cobre metálico recubierto con Ni, para reducir el costo en el uso de cátodos de Pt. La producción de hidrógeno utilizando el cátodo de Ni-W-P se estudió por primera vez en una MEC de una sola cámara sin membrana. A una tensión aplicada de 0.9 V, las MECs con cátodos de Ni-WP obtuvieron una tasa de producción de hidrógeno de 1.09 m³/m³d, con una recuperación catódica de hidrógeno del 74%, una eficiencia coulombica del 56% y una eficiencia de la energía eléctrica en relación con la energía aplicada del 139% (Wang, *et al.*, 2011). El níquel tiene un sobrepotencial de evolución de hidrógeno más bajo y una mayor densidad de corriente que el acero inoxidable, por lo que se considera un catalizador de metal no-noble prometedor para el cátodo de una MEC. Además, se ha reportado una alta actividad catalítica lograda por una pequeña cantidad de P en las aleaciones a base de níquel. La aleación de Ni-P no solo tiene buenas propiedades físicas y químicas, sino también un rendimiento superior en la evolución del hidrógeno (Fujian, *et al.*, 2017).

1.18. Análisis del depósito de Ni

La presencia de partículas de Ni depositadas se confirma mediante análisis de microscopía electrónica de barrido (SEM por sus siglas en inglés) y voltametría cíclica. La carga del depósito de Níquel se determina por la diferencia en peso (± 0.1 mg) antes y después de la electrodeposición. El electrodo se lava, enjuaga y se seca bajo vacío a 60 °C por 1 h antes y después de la electrodeposición. La reproducibilidad de la técnica de electrodeposición se verifica midiendo las cargas de Ni (v. g. 5 electrodos diferentes preparados en las mismas condiciones). Los resultados no deberán mostrar mucha diferencia entre sí (v. g. una variación dentro del 2%).

De acuerdo con la teoría electrocatalítica, se explica que dicha actividad, se debe al calor de adsorción de los intermediarios en la superficie del electrodo. Algunos metales con fuertes enlaces de hidrógeno como el Cu, el Fe y el Ni se eligen para la preparación de catalizadores. El metal de cobre con una superficie porosa, se utiliza en aplicaciones de electrocatálisis, celdas de combustible, baterías, condensadores y sensores. El beneficio de la superficie electrocatalítica porosa es que el área de superficie verdadera por unidad de área geométrica tiene más pliegues que conforman el área (Telli, *et al.*, 2018).

1.19. Tratamientos para modificar la superficie de los electrodos

La superficie de los electrodos se modifica con tratamientos especiales que modifican su estructura para mejorar el rendimiento en la oxidación (caso del ánodo) de la materia orgánica presente en el agua residual que es usada como sustrato en una MEC o en la reacción de reducción (caso del cátodo) para producir hidrógeno.

1.19.1. Tratamiento del fieltro

El fieltro de grafito se trata previamente sumergiéndolo durante 24 h, alternadamente primero en ácido clorhídrico 1 M, después se enjuaga con agua desionizada, luego se le da un tratamiento con hidróxido de sodio 1 M, también durante 24 horas y finalmente se enjuaga con agua desionizada (Shen, *et al.*, 2014).

1.19.2. Tratamiento del cátodo de Cobre

El cátodo de cobre se trata con una solución de HCl 1M durante la noche, para limpiar la superficie del óxido y otras impurezas que se le hayan formado al paso del tiempo. Después se enjuaga con agua desionizada y se seca en la estufa (Wang, *et al.*, 2011).

1.19.3. Tratamiento del cátodo de Fe

La superficie de Fe generalmente se limpia con una solución de HCl al 10% durante 30 minutos, luego se enjuaga con agua desionizada y se seca en la estufa.

1.19.4. Tratamiento del cátodo de Malla # 60 de acero inoxidable

La malla 60 de acero inoxidable se sumerge en solución de H₂SO₄ 1M durante 24 horas, para limpiar la superficie y disminuir la resistencia eléctrica (Rivera, *et al.*, 2017)

1.20. Composición química de la solución o sustrato

Se ha determinado que un solo sustrato no puede denominarse perfecto para la producción de hidrógeno en un reactor MEC y no es justificable comparar la eficiencia del rendimiento de MEC únicamente sobre la base del sustrato utilizado.

De manera similar, el desarrollo de metanógenos y producción de metano y las altas pérdidas óhmicas debido a la baja conductividad de las aguas residuales son otras áreas importantes de preocupación que deben ser clasificadas antes de desarrollar un sistema bioelectroquímico de tratamiento de aguas residuales como un enfoque potencial para la producción de hidrógeno. Las aguas residuales como sustrato desempeñan un papel importante en la regulación de la economía en el proceso de producción de hidrógeno, ya que hacen que aquel sea económicamente más barato ya que son efluentes principalmente industriales y no tienen ningún valor económico (Parkhey, P. *et al.*, 2017).

1.21. Operación en modo batch o de flujo continuo de la celda

Un flujo continuo en una MEC produce un alto amperaje (1630 A/m³), usando un espacio entre electrodos menor a 1 cm, sin embargo, se obtiene una baja producción de hidrógeno del orden de 4.3 m³/m³d (Lee and Rittmann, 2010). Esa baja recuperación de hidrógeno se debe a la oxidación bacteriana del mismo, así como la baja eficiencia en la conversión catódica (Cheng, S. *et al.*, 2011; Lee *et al.*, 2009). Debido a lo anterior, los estudios que se realizan en una MEC se prefieren en modo batch o por lote.

1.22. Inóculo

El consorcio microbiano natural de muchas fuentes es ampliamente utilizado para la producción de hidrógeno. El tipo de sustrato y las condiciones operativas aplicadas a los biodigestores del consorcio natural utilizado como inóculo afectan la variación de las especies y la cantidad de microbios que inducen la formación de biogás (Amekan, *et al.*, 2018). Adicionalmente, tanto la eliminación de las bacterias consumidoras de H₂ (BCH) como la no-eliminación de las bacterias productoras de H₂ (BPH), es importante para alcanzar una alta conversión de sustrato en H₂. En general, las BPH pueden esporular, por lo que son estables en ambientes hostiles. Por lo tanto, los métodos aplicados al inóculo para eliminar las bacterias indeseables son tratamientos drásticos que eliminan las bacterias en forma vegetativa, principalmente aquellos que no producen o consumen H₂ permitiendo la germinación de las esporas de las BPH que sobreviven al proceso. Los principales microorganismos indeseables que deben eliminarse en los tratamientos previos son las bacterias metanogénicas, que producen metano a partir del consumo de H₂. Existen varios tipos de inóculo entre los cuales se encuentran: lodo granular metanogénico de una planta de tratamiento de agua residual (Cisneros, *et al.*, 2015), lodo del digestor de residuos de fruta, estiércol de vaca y rumen de vaca, lodo del digestor de residuos de tofu (Amekan, *et al.*, 2018) y estiércol de elefante (Fiala, *et al.*, 2014). Por otro lado, existen varios tipos de pre-tratamiento del inóculo para la producción de hidrógeno, éstos pueden dividirse en tratamientos químicos y físicos. Los pre-tratamientos físicos son aquellos que usan el calor, las ondas ultrasónicas y la radiación ultravioleta. Los pre-tratamientos químicos incluyen el choque por el pH y activación e inhibición química mediante antibióticos (Braz, *et al.*, 2017).

1.22.1 Pre-tratamientos del inóculo

1.22.1.1. Tratamiento térmico

Varios autores han reportado las diferentes técnicas que utilizaron para dar un pre-tratamiento térmico al inóculo, en la producción de biohidrógeno por fermentación, entre las cuales se reportan las siguientes: El lodo granular es disgregado en una malla cerrada, después se pone en un recipiente con agua y se pone en ebullición durante 45 minutos (Cisneros, *et al.*, 2015). O bien, el tratamiento se realiza a 93 °C por 15 min a presión atmosférica normal, después se enfría a temperatura ambiente y finalmente se guarda en una solución sintética (Braz, *et al.*, 2017). Otra técnica utilizada por Danko, *et al.*, 2008, es pasar el lodo granular sobre una malla de 0.2 mm de abertura, para después darle tratamiento térmico en un autoclave durante 30 min. Fiala, *et al.*, 2014, trató el estiércol de elefante en un horno a 90 °C durante 3 h. Sin embargo, González, *et al.*, 2013, utilizaron una temperatura mayor (100 °C) y mayor tiempo de tratamiento (30 min). El tratamiento térmico es el más ampliamente usado en los estudios de producción fermentativa de hidrógeno, y su objetivo es el de inhibir y/o destruir las bacterias no productoras de hidrógeno.

1.22.1.2. Tratamiento ácido

Para el tratamiento ácido se utiliza HCl 0.5 N, a un pH entre 3 y 4 por un periodo de 24 horas. Después de ese tiempo, la solución se neutraliza con NaOH 0.5 N y así se desactivan los metanógenos hidrogenotróficos (Amekan, *et al.*, 2018). Por otro lado, Fiala, *et al.*, en 2014,

utilizaron estiércol de elefante, al cual le dieron un tratamiento con HCl 0.1 N hasta lograr un pH de 3.0-4.0, manteniéndolo agitado por 24 horas. Al finalizar la agitación, ajustaron el pH a 7.0 usando NaOH 0.1 N.

1.22.1.3. Tratamiento químico

En el tratamiento químico para desactivar o inhibir las bacterias metanogénicas, Danko *et al.*, en 2008, utilizaron bromoetanosulfonato (BES) a una concentración de 1.25 mM/mL de volumen del reactor. Mientras que Catal, *et al.*, 2015, usaron diferentes antibióticos con los siguientes resultados: 1.1 mM de sulfato de Neomicina inhibieron tanto la producción de metano como la de hidrógeno, mientras que el 2-Cloroetano sulfonato (20 mM), 2-Bromoetano sulfonato (20 mM), y 8-aza-hipoxantina (3.6 mM) pueden inhibir la generación de metano con aumento simultáneo en la producción de hidrógeno. El volumen del reactor utilizado fue de 300 mL aproximadamente.

1.22.1.4. Otros tratamientos

El lavado celular del inóculo en un reactor tipo tanque agitado (CSTR por sus siglas en inglés), es otro método para eliminar las bacterias metanogénicas. Es un proceso que requiere de varios días de agitación, por lo cual no es utilizado con frecuencia. Cisneros, *et al.*, 2015, operaron un reactor en continuo durante 10 días con un tiempo de retención hidráulico (TRH) de 8 horas el cual fue equivalente al tiempo de retención de sólidos (TRS); utilizaron 20 g de glucosa/Lr como sustrato, una agitación de 250 rpm, 37 °C de temperatura y un pH de 5.7.

1.22.2. Análisis realizados a los inóculos

Otro análisis importante para la identificación cualitativa de las cepas presentes en el inóculo, después del tratamiento para eliminar o inhibir las bacterias metanogénicas, se realiza por medio de tinción de Gram luego de un tiempo de incubación de 72 horas a 37 °C, sembrados en cajas Petri con un medio de cultivo Agar base sangre o agar base sangre + sangre fresca de res bajo condiciones anaerobias, luego de un tiempo de incubación de 48 horas a 37 °C, se aíslan y se identifican a través de la respuesta a la técnica de Wirtz-Conklin (verde de malaquita) y tinción de Gram para la determinación principalmente de Bacilos Gram positivos esporulados (*Bacillus* y *Clostridium*) (González, *et al.*, 2013).

1.22.3. Relación de inóculo con respecto al volumen del sustrato

Por lo general, la inoculación se realiza con un 10% de volumen del inóculo seleccionado, con respecto al volumen de sustrato en el reactor (Amekan, *et al.*, 2018).

1.22.4. Determinación de la comunidad microbiana en el inóculo

El siguiente paso para determinar el comportamiento del inóculo, es determinar la comunidad microbiana presente en las muestras de los reactores donde fue utilizado. Se analiza mediante los perfiles de los genes 16S rRNA, se cortan las bandas predominantes y así se determina su secuencia de ADN. *Clostridium* y representantes de *Enterobacteriaceae* son especies dominantes, con fuerte presencia del género *Lactobacillus* (Cisneros, *et al.*, 2015). Los ácidos

grasos como butírico, acético, fórmico y propiónico son los principales metabolitos solubles primarios producidos por los cultivos en la fermentación; el resultado demuestra que una mayor producción de ácido propiónico puede disminuir el rendimiento de hidrógeno. *Clostridium perfringens* y *Clostridium baratii* están presentes en la mayoría de los inóculos individuales y combinados. La evidencia experimental sugiere que el inóculo de diferentes biodigestores puede adaptarse bien a las condiciones ambientales y al nuevo sustrato después de un proceso de combinación como resultado de la flexibilidad metabólica derivada de la diversidad microbiana en la comunidad para producir hidrógeno (Amekan, *et al.*, 2018).

Capítulo 2. Antecedentes

La mayoría de las investigaciones citadas en la bibliografía, se han realizado usando aguas sintéticas, de muy variada composición, diferentes concentraciones de los compuestos para su conformación y diferente naturaleza de los mismos. En gran parte de los casos, se utilizan solamente compuestos de tipo inorgánico y, en otros casos, se agregan compuestos orgánicos. Sin embargo, solo unos pocos investigadores se aventuran a utilizar aguas reales, con el fin no solo de producir hidrógeno, sino también investigar si se logra disminuir la DQO del agua residual. Dentro de las aguas reales existen de muy variada concentración y las llamadas de alta concentración o alta carga orgánica.

2.1. Tratamiento de Aguas Residuales

Las aguas residuales son tratadas para removerles la materia orgánica presente en las mismas, la cual contiene contaminantes que pueden ser dañinos a la salud de los seres vivos que habitan en su seno o se sirven de ella. Una vez que las aguas tratadas poseen una concentración aceptable de contaminantes, estas proceden a disponerlas en cuerpos de agua o a reutilizarlas en actividades como la agricultura, la industria o la recreación. El proceso de tratamiento de aguas puede dividirse en tres pasos principales:

1. Pretratamiento. Se basa en procedimientos físicos de separación que permite la remoción de sólidos (basura) a través de rejillas de cribado. También, en esta etapa existen los desarenadores, los cuales permite remover partículas como arena y grava.
2. Tratamiento Primario. Es una serie de procesos físicos o fisicoquímicos que se realizan en un tanque de sedimentación, donde se remueve una parte de los contaminantes presentes al sedimentarse en forma de lodos. Este lodo puede ser reutilizado como abono.
3. Tratamiento Secundario. Es el tratamiento biológico en el cual, las bacterias consumen la materia orgánica que quedó después del tratamiento primario. Este es un proceso por lo general aerobio, aunque también puede ser anaerobio, por tanto, una buena aireación en conjunto con otros factores como temperatura, pH y tiempo de retención son determinantes para el crecimiento adecuado de los microorganismos.
4. Tratamiento Avanzado. En esta parte del proceso, se busca reducir los contaminantes remanentes que no pudieron ser oxidados por los microorganismos. Como ejemplo de tratamientos avanzados existen: 1) filtración; 2) desinfección y 3) procesos avanzados de oxidación. Actualmente, cuando los costos de energía se incrementan continuamente, al igual que la preocupación ambiental, es necesario desarrollar e implementar procesos de tratamiento de agua alternos a los existentes para disminuir el consumo energético y obtener mejores eficiencias de remoción de contaminantes. Algunos estudios sobre análisis de ciclo de vida han demostrado que los sistemas bioelectroquímicos (BES) -como es el caso de las celdas de combustible microbianas (MEC) y las celdas de electrólisis microbianas (MFC)-son útiles para la obtención de productos de alto valor agregado, como lo es el hidrógeno (Rubén Alonso Chacón Carrera. “Tratamiento de aguas residuales y producción de hidrógeno con un sistema bioelectroquímico asistido con dos diferentes membranas”. Tesis CIMAV. México. 2018).

2.1.1. Aguas residuales y biorrefinería

Las aguas residuales se pueden considerar también como materia prima para otros procesos. Se denomina “biorrefinería” al concepto que se ha utilizado para ver a la biomasa como una alternativa al petróleo como materia prima y a través de diferentes procesos (físico-químicos, electroquímicos y biológicos) se pueda transformar la biomasa en diferentes productos, tales como biocombustibles, productos químicos industriales y biomateriales. La biorrefinería surge como una alternativa de tratamiento para las aguas residuales, especialmente para aquellas que posean un alto contenido de materia orgánica (agroindustriales, industria alimentaria, derivados de la producción de bebidas alcohólicas y de confitería), de este modo se obtiene un doble beneficio: el tratamiento de las aguas residuales y la obtención de productos de valor agregado. En una primera etapa las aguas residuales se tratan por fermentación oscura donde se produce hidrógeno, el cual se sigue produciendo en un sistema bioelectroquímico (SBE) como lo puede ser una celda de electrólisis microbiana (MEC por sus siglas en inglés). Se utiliza este proceso en virtud de que una gran variedad de bacterias heterótrofas tiene la capacidad de producir hidrógeno y dióxido de carbono y a su vez pueden usar varios tipos de sustratos orgánicos como fuentes de carbono (René Cardeña Dávila “Evaluación de los factores que afectan la cámara anódica y catódica en celdas de electrólisis microbianas utilizadas para la producción de hidrógeno”. Tesis UNAM 2018, México).

2.1.2. Parámetros que afectan el diseño de sistemas MEC para el tratamiento de aguas residuales

Una de las variables más importantes a considerar al analizar y comparar las MECs para el tratamiento de aguas residuales y la producción de energía es la concentración y el tipo de materia orgánica. La identidad de la materia orgánica tiene un gran impacto en el rendimiento de las MECs. La concentración de las aguas residuales se refiere al nivel de contaminación del agua y dicta el tiempo de tratamiento, el tamaño del reactor y el requerimiento y producción de energía. Las aguas residuales de alta concentración tienen una mayor carga orgánica; por lo tanto, se puede recuperar más energía mediante otros métodos de tratamiento. Sin embargo, las aguas residuales de alta concentración suelen tardar más en tratarse, lo que conduce a mayores tiempos de retención hidráulico (TRH). La investigación debe buscar optimizar el TRH para ayudar a reducir el tamaño del reactor y afectar la producción/consumo de energía. La carga orgánica cambia drásticamente según las fuentes de aguas residuales, lo que a su vez afecta la tasa de carga orgánica (OLR por sus siglas en inglés). La Tabla 2. 1 muestra los valores de demanda química de oxígeno (DQO) de aguas residuales que han sido tratadas mediante sistemas bioelectroquímicos en estudios previos.

Tabla 2.1. Rango de la demanda química de oxígeno (DQO) para las aguas residuales con el tiempo de retención hidráulico (TRH) requerido.

Industria	Rango de DQO (g/L)	TRH requerido para obtener una OLR de 1400 mg DQO/L/h
Agua residual doméstica	0.3-0.5	5-9
Refinación de alcohol	5-22	86-377
Cerveza y malta	2-7	34-120
Café	3-15	51-257
Proceso de la leche	1.5-5.2	26-89
Carne y aves de corral	2-7	34-120
Procesamiento del pescado	2.5	43
Residuos porcinos	18.3	314
Glicerol crudo	925-1600	15857-27429
Lactosuero	50-102.1	857-1750

(Tomado de Fudge, *et al.*, 2021)

Las aguas residuales de alta concentración producen más energía, por lo que pueden ser económicamente más viables en términos de producción de energía, ya que las cargas orgánicas más altas contienen un mayor potencial energético. Por ejemplo, se logró una producción de energía neta normalizada de 76,2 kWh/m³/d para agua residual del cerdo, un agua residual de alta concentración, a un volumen de 16 L y una superficie anódica y catódica de 11,25 m²/m³. Sin embargo, en cuanto a las aguas residuales de baja concentración (<250 mg/L DQO), aunque tienen un TRH bajo, todavía es difícil que el tratamiento sea económicamente viable debido a la muy baja producción de energía asociada a su menor contenido orgánico. La Tabla 2.1 también destaca que los flujos de desechos tienen características variables y, por lo tanto, el método de tratamiento de aguas residuales debe variar. Es poco probable que haya una solución homogénea para todos los flujos de desechos orgánicos. Además, algunos flujos de desechos orgánicos no se pueden tratar en una MEC. El tratamiento del lactosuero, por ejemplo, usando una MEC no produjo gas; esto sugiere que los microorganismos presentes no pueden descomponer los desechos orgánicos, posiblemente debido a que la materia prima inhibe los metanógenos (Fudge, *et al.*, 2021).

2.2. Hidrógeno biológico fermentativo

Dentro de los procesos de producción de hidrógeno usando microorganismos, se encuentra el proceso de producción biológico fermentativo. González *et al.*, 2014 produjeron hidrógeno biológico por fermentación anaerobia a partir de vinaza con lodos anaerobios tratados térmicamente para eliminar los metanógenos. La fermentación anaeróbica de las vinazas duró 70 horas en modo batch o por lote y posteriormente durante 7 días en modo continuo en un reactor de 5 litros tipo tanque completamente agitado (CSTR, por sus siglas en inglés). Obtuvieron una producción máxima de 0.33 m³ de H₂/m³RD usando un pH de 5.5 y una temperatura de 37 °C. Por otro lado, Balachandar, *et al.*, 2020, estudiaron diferentes residuos

orgánicos tales como melaza de caña, efluentes de destilería y aguas residuales amiláceas como sustratos potenciales para la producción de biohidrógeno usando *Enterobacter cloacae* IIT-BT 08 como inóculo. La torta desaceitada de maní, se consideró como suplemento nutricional para mejorar los rendimientos de biohidrógeno. El rendimiento máximo de hidrógeno fue de 1.9 m^3 de $\text{H}_2/\text{m}^3_{\text{RD}}$ utilizando melaza de caña y torta desaceitada de maní, como cosustrato a escala piloto (50 L). La temperatura se fijó en $37 \text{ }^\circ\text{C}$ a un pH de 6.5, con una eficiencia de remoción de DQO y conversión de energía de $18.1 \text{ kg}/\text{m}^3$ y 37.9%, respectivamente. En otro estudio, Montoya, *et al.*, 2017, estudiaron la generación de hidrógeno a partir de la fermentación anaeróbica de residuos agroindustriales como el corazón de piña, utilizando como inóculo lodos pretratados provenientes de una planta de tratamiento de agua residual del tipo UASB. Los mejores resultados se obtuvieron utilizando un pH inicial de 5.5, con una concentración inicial de sustrato de 5 g de glucosa/ L_R y usando una formulación de nutrientes basada en magnesio, hierro, zinc y sodio. Posteriormente, utilizando las condiciones de operación anteriores, se realizó un escalamiento de la fermentación en un biorreactor de 5 L y se alcanzó un rendimiento máximo en la producción de hidrógeno de 0.32 m^3 de $\text{H}_2/\text{m}^3_{\text{RD}}$. Este rendimiento es comparable con datos reportados en la literatura cuando se ha usado glucosa como sustrato. Los resultados obtenidos sugieren que los residuos de corazón de piña podrían ser utilizados como una fuente renovable para la producción de hidrógeno. Vanessa Redondas Monteserín en su investigación de tesis de grado “Obtención de hidrógeno mediante la fermentación oscura de residuos de comida y lactosuero” Tesis 2014. Universidad de León, España, estudió la fermentación de residuos de comida y lactosuero para la producción de hidrógeno. Se utilizaron recipientes de 0.25 litros con agitación mecánica y como inóculo se utilizaron lodos anaerobios procedentes de una planta de tratamiento de aguas residuales municipales. La temperatura de trabajo fue mantenida en $34 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$, mientras que el pH se mantuvo entre 5 y 6 unidades usando una solución alcalina de NaHCO_3 , KH_2PO_4 y KOH . Se obtuvo una producción máxima de hidrógeno de $0.08 \text{ m}^3/\text{m}^3_{\text{RD}}$

2.3 Hidrógeno producido en una MEC mediante electro-fermentación

La producción de hidrógeno y metano a partir de lactosuero en un proceso de dos etapas ya se ha estudiado a escala de laboratorio en un reactor continuo de tanque agitado (CSTR) de 3 L y un reactor anaeróbico periódico con deflectores de 15 L, respectivamente. Stamatelatou, *et al.*, 2011, estudiaron a mayor escala el proceso de fermentación del lactosuero utilizando un biorreactor de 13.8 L tipo CSTR. La DQO del lactosuero alimentado al CSTR fue de 53.3 g/L. El pH en el biorreactor se mantuvo en 5.14 con la adición de NaOH . El hidrógeno producido alcanzó hasta $4.8 \text{ m}^3/\text{m}^3_{\text{RD}}$ con un tiempo de retención hidráulico de 24 h (correspondiente a un rendimiento de 1.3 mol H_2 /mol de carbohidratos consumidos), aproximadamente el doble de lo obtenido en experimentos previos a escala de laboratorio en un biorreactor de 3 L. Además, se utilizó lactosuero diluido en diferentes concentraciones iniciales como materia prima para la generación de electricidad, utilizando una celda de combustible microbiana (MFC, por sus siglas en inglés) de dos cámaras. Los experimentos demostraron que el rendimiento de la MFC no estaba limitado por la fuerza de las aguas

residuales, ya que la eficiencia de eliminación del sustrato y la potencia máxima no se vieron afectadas por el aumento de la concentración inicial. El tiempo necesario para la degradación completa del sustrato aumentó linealmente con la fuerza de las aguas residuales. La temperatura se mantuvo en 35 °C mediante un baño térmico; los electrodos usados fueron para el ánodo: tela de fibra de carbón, mientras que el cátodo fue hecho de tela de carbón recubierta con partículas de Pt (0.5 mg/cm²). Otra agua residual que ha sido estudiada es la orina humana; Kuntke, *et al.*, 2014, investigaron el uso de una celda de electrólisis microbiana (MEC) de dos cámaras, separadas por una membrana catiónica en la remoción de amonio, remoción de DQO y producción de hidrógeno a partir de orina diluida en cinco veces su concentración original. Durante la operación con un cátodo discontinuo, se logró una densidad de corriente de 23.07 A/m² correspondiente a una tasa de producción de hidrógeno de 49 m³ H₂ /m³RD, una tasa de remoción de amonio de 173.4 g N/m²d y una tasa de remoción de DQO de 171.0 g DQO/m²d. La extracción de amoníaco no fue posible en la MEC usada y la difusión de amoníaco desde el compartimiento del cátodo al ánodo condujo a un período de operación estable relativamente corto. El cátodo usado consistió de un campo platinizado en la cámara catódica mientras que el ánodo fue de fieltro de grafito. Los volúmenes de las cámaras fueron para la cámara anódica de 40 mL y cámara catódica de 10 mL. Se manejaron dos pH diferentes: pH=9.1 en la cámara anódica y en la catódica el pH fue de 7.0, la temperatura de 30 ± 1°C fue mantenida mediante un baño con controlador térmico. El potencial adicionado se aplicó mediante una fuente de poder con un valor de 1.0 V. Por otro lado, la molasa es un subproducto del proceso de la remolacha para producir azúcar que luego es usada para producir etanol. No obstante, el agua residual proveniente de las molasas posee un alto nivel de materia orgánica (DQO), que debe tratarse adecuadamente antes de ser descargada en un cuerpo de agua. Wang, *et al.*, 2014 usaron una MEC para producir H₂, a partir de aguas residuales de melaza. En dicho estudio se evaluó la factibilidad de operar la MEC a bajas temperaturas, ya que la temperatura promedio de las aguas residuales en la ciudad de Harbin, China, es inferior a 10 °C. Además, también se examinó la viabilidad de utilizar biocátodos como alternativa al costoso platino (Pt) como material del cátodo. Tanto las MEC catalizados con Pt como las MEC biocatólicas, se operaron a una temperatura de 9 °C. La recuperación total de hidrógeno del 72.2 % (E_{ap} = 0.6 V) se obtuvo cuando se utilizó el catalizador de Pt. Por el contrario, cuando se utilizó un catalizador más económico (biocátodo; E_{ap} = 0.6 V), se produjo hidrógeno con una recuperación del 45.4 %. Este estudio demostró que se podría generar hidrógeno a partir de aguas residuales de melaza a baja temperatura utilizando un material de cátodo más económico. La MEC consistió de una celda de una sola cámara y de forma cilíndrica. El volumen de la MEC fue de 35.3 mL, el ánodo usado fue un cepillo de grafito mientras que el cátodo consistió en tela de carbón. Se alcanzó una densidad de corriente máxima de 1.32 A/m² cuando se usó un biocátodo en lugar del cátodo de platino (2.4 A/m²). La producción máxima de hidrógeno fue de 1.31 m³ de H₂/m³RD a una temperatura de 9 °C. Otra investigación realizada sobre lactosuero fue hecha por Moreno, *et al.*, 2015, quienes investigaron la producción de hidrógeno en una MEC de una sola cámara para reducir la carga orgánica del lactosuero en paralelo con la producción de hidrógeno. El volumen de la MEC fue de 100 mL usando un ánodo de fieltro de carbón y un cátodo de difusión de gas recubierto con Ni. La temperatura fue controlada en 25 °C.

Concluyeron que el pH (4.7) ácido del efluente fermentativo alimentado al reactor bioelectroquímico, ayudó a controlar la actividad metanogénica y homoacetogénica en el reactor. La producción volumétrica de hidrógeno máxima alcanzada fue de 0.82 m^3 de $\text{H}_2/\text{m}^3_{\text{RD}}$, una densidad de corriente máxima de $2.4 \text{ A}/\text{m}^2$ y una remoción de la DQO del 82%.

2.4. Comparación entre la Tecnología MEC y la Electrólisis del Agua.

En comparación con la electrólisis del agua, la principal ventaja de los MEC es que no producen oxígeno (Chen *et al.*, 2016), lo que se considera parte de la seguridad del proceso; este activo de seguridad del proceso es esencial cuando se produce hidrógeno presurizado, como durante la electrólisis del agua, ya que cuando se produce hidrógeno presurizado a alta presión, existe un mayor riesgo de cruce de hidrógeno en el compartimiento del ánodo. Otra ventaja de las MEC es que el ánodo produce cloro a un potencial muy bajo, eliminando la necesidad de que el electrolito se disocie del cloro, que se requiere para la electrólisis del agua, lo que es otra ventaja de las MEC. Los MEC tienen otro parámetro operativo, que es el pH. El pH del electrolito es neutro, aunque muchas biopelículas microbianas no toleran los extremos de pH. Además, el pH neutro ofrece el beneficio adicional de seguridad del proceso de permitir que los electrolitos se manipulen sin necesidad de medidas de seguridad estrictas. Al desechar y reemplazar un tampón de fosfato con pH neutro, es mucho más sencillo que al desechar y reemplazar el hidróxido de potasio de pH 14, que se usa en la electrólisis del agua. Comparadas en términos de rendimiento energético teórico, las MECs también son más eficientes que la electrólisis del agua en términos de generación de energía. La reacción que produce hidrógeno en las MECs, consume una cantidad significativamente menor de energía que la electrólisis del agua, lo que resulta en un menor consumo de energía. Es una reacción endotérmica que requiere calor para que la reacción ocurra al voltaje de equilibrio de la celda (Dange, *et al.*, 2021).

2.5. Escalamiento

El escalamiento comprende la proyección de un experiment realizado a nivel pequeño (<100 mL) a una mayor del orden de 1 litro o más, donde se puedan obtener grandes volúmenes de producción del compuesto que se está obteniendo. Respecto del escalamiento desde un nivel laboratorio a nivel piloto, al estudiar la producción de hidrógeno en una celda de combustible microbiana usando lactosuero como sustrato, Stamatelatou, *et al.*, 2011, concluyeron que, en comparación con un biorreactor a escala de laboratorio (3 L) bajo la mismo TRH pero diferente regulación del pH (a través de la adición de alcalinidad), el biorreactor a mayor escala (15 L) produjo hidrógeno a una tasa de producción más alta (casi el doble). La conversión de carbohidratos fue mayor y la producción neta de lactato fue menor. Dado que gran parte de la materia orgánica (DQO) permanece en solución después de la producción de hidrógeno, la formación de metano es posible en condiciones diferentes de las seleccionadas para la producción de hidrógeno en un paso posterior. Es importante resaltar, que ellos en este trabajo, pretrataron térmicamente el lactosuero para la eliminación de las bacterias ácido-lácticas. Las bajas tasas de producción de energía que suelen observarse en los BES a escala pequeña, semi-piloto y piloto, junto con su bajo consumo de energía (en comparación con tecnologías más convencionales como tratamientos aeróbicos), sugieren que su objetivo

principal debería ser la eliminación de la contaminación orgánica en lugar de la producción de energía. Escapa, *et al.*, 2015, en su investigación plantearon que se requieren nuevas experiencias de escalamiento para adquirir conocimiento en los problemas de los diseños de las MECs. En su estudio evaluaron la capacidad de dos unidades MEC gemelas sin membrana (que eran parte de una MEC modular a escala piloto) para tratar agua residual doméstica (dWW). Las pruebas por lotes arrojaron eficiencias de eliminación de DQO del 92%, produciéndose la mayor parte del hidrógeno (>80% de la producción total) durante las primeras 48 h. Durante las pruebas continuas, el rendimiento de las MEC se deterioró significativamente (el consumo de energía fue relativamente alto y las eficiencias de eliminación de DQO cayeron por debajo del 10% en muchos casos), lo que se atribuyó a una configuración inadecuada de la cámara anódica, mezcla insuficiente dentro de esta cámara, ineficiente gestión de hidrógeno en el lado del cátodo y finalmente al agua residual doméstica (dWW) en sí misma. Un escalamiento exitoso de una MEC sin membrana para el tratamiento de dWW de fuerza media-baja requeriría prestar especial atención al manejo del hidrógeno y la dinámica de fluidos dentro de la cámara anódica, así como a la adaptación de las comunidades microbianas durante el arranque. Por otro lado, Guo, *et al.*, 2017, en su investigación de un nuevo diseño de MEC tubular aseveran lo siguiente: Desafortunadamente, la ganancia de eficiencia energética inducida por el uso de un ánodo microbiano se ve empañada por las bajas densidades de corriente (es decir, la tasa de producción de H₂) en comparación con los electrolizadores abióticos. Desde los primeros informes sobre las MECs, numerosos estudios han investigado materiales de electrodos y configuraciones de reactores para reducir el costo de capital y mejorar el rendimiento del sistema. Según nuestro mejor conocimiento, las tasas máximas de producción de hidrógeno (HPR) de MECs de pequeña escala (volumen <100 mL) y tamaño mediano (100 mL <volumen <1 L) han alcanzado 50 L/Ld y 2,8 L/Ld, respectivamente, mientras que para los mayores de 1 L los HPR no han superado 1 L/Ld. El mal desempeño de las MEC más grandes, se atribuyen en gran medida **a**) a la baja relación entre la superficie del electrodo y el volumen del reactor, **b**) las grandes resistencias internas causadas por la alta resistencia de los electrodos de carbono y **c**) la mala transferencia de masa en el reactor más grande. En la búsqueda de una mayor producción de hidrógeno al inicio de su investigación, plantearon que como la conductividad del ánodo de fieltro de acero inoxidable modificado es mucho mayor que la de los ánodos tradicionales basados en carbono, la distancia media entre el ánodo y el cátodo se redujo a 6 mm, además que la presencia de la membrana de intercambio aniónico (AEM por sus siglas en inglés) aseguró un ambiente estéril del cátodo (debido al alto pH manejado) y una alta recuperación de hidrógeno (100%), por lo tanto, una resistencia interna extremadamente baja, alta densidad de corriente volumétrica y alta tasa de producción de hidrógeno se lograron en este nuevo reactor MEC tubular. Debido a lo anterior, el reactor se puede escalar aún más aumentando la longitud de los componentes tubulares o ensamblando una serie de módulos tubulares en un tanque grande. En resumen, este diseño de MEC tubular tiene un gran potencial de escalamiento. Sin embargo, Rousseau, *et al.*, 2019 han argumentado que hasta ahora ha sido muy difícil aumentar la escala de los MEC eficientes más allá del tamaño de las pequeñas celdas de laboratorio. Muchos estudios han modificado químicamente la superficie del electrodo con el objetivo de mejorar la transferencia de electrones interfacial desde la biopelícula al material del ánodo. Este problema ha sido objeto de varias revisiones, pero a pesar de varios esfuerzos de investigación, todos los intentos de escalar a una MEC de gran tamaño han encontrado grandes dificultades. La mayoría de las MECs piloto con volúmenes de al menos varios litros

muestran una producción de hidrógeno muy baja, lo que corresponde a que el cátodo funcione a menos de 1 A/m². A modo de comparación, cabe recordar que los reactores de electrólisis de agua alcalina comerciales suelen funcionar a varios cientos de A/m², y las celdas de electrólisis de membrana de intercambio de protones (PEM) pueden alcanzar los 20 000 A/m². Incluso con densidades de corriente tan altas, se considera que la tecnología de electrólisis del agua necesita mejoras adicionales; esto muestra el largo camino que queda por recorrer para que las MECs puedan escalarse a volúmenes de un nivel piloto.

2.6. Ánodos y cátodos usados en la producción de hidrógeno

Respecto del material usado para los electrodos, se han utilizado ánodos de grafito y carbono, así como sus derivados (esponjas, papel, láminas). Por otro lado, para el material del cátodo, se ha utilizado una gran variedad de ellos, buscando aumentar el rendimiento de una MEC en la producción de hidrógeno. El platino es el metal que ha dado mejores rendimientos por su gran afinidad con el hidrógeno, ya que es el catalizador idóneo para la reacción de evolución de hidrógeno (HER por sus siglas en inglés), sin embargo, es un metal de un valor elevado, por lo cual, se han probado otros metales que lo puedan sustituir, pero que conserven o se aproximen al mismo rendimiento en una MEC. Se han utilizado metales tales como el cobre, níquel, hierro y titanio; también se han usado aleaciones, donde el elemento base es el carbono o grafito, recubiertos con un metal en forma de película, o bien, aleaciones de dos metales, donde uno de ellos es agregado en forma de película.

En la Tabla 2.2, podemos observar los diferentes tipos de ánodos y cátodos que se han utilizado en diferentes investigaciones, así como los valores en la producción de H₂ además de otros parámetros. Las composiciones de diferentes aguas sintéticas se reportan en la Tabla 2.3. En la Tabla 2.4, se reportan las composiciones que usaron Carrera, *et al.*, 2013, para determinar el comportamiento de una MEC en la producción de H₂, al usar un agua sintética con diferentes niveles de carga orgánica y conductividad eléctrica.

Tabla 2.2. Producción de H₂ y valores paramétricos usados en diferentes investigaciones

Referencia	Vol. de H ₂ (m ³ /m ³ _{R.d})	Ánodo	Cátodo	pH	Sustrato	Voltaje (V)	Δd ÁN-cát	T °C
Tartakovsky 2009	6.3	C _{filtro} *	C/Pt	7	AS ¹	1.15	0.3 mm	25
Selembo 2009	1.5	G _{filtro} **	SS/Ni	7	AS ¹	0.9	-	30
Jeremiasse 2010	0.11	G _{filtro}	G _{filtro}	7	AS ¹	0.5	0.3 mm	30
Wang 2014	1.69	G _{cepillo}	C _{tela}	7	melaza	0.8	4.0 cm	9
Zhang 2010	2.1	C _{tela}	SS _{malla60}	7	AS ¹	0.9-1.2	2.25 cm	30
Wang 2011	1.09	C _{papel}	Cu/Ni-W-P	7.0	AS ¹	0.9		33
Tartakovsky 2011	2.8	C _{filtro}	C _{papel} /Ni	7.0	AS ¹	0.4-1.2	0.7 mm	30
Kuntke 2014	48.6	G _{filtro}	Ti/Pt	7.0	orina	0.6-1.0	1.0 mm	30
Jeremiasse 2011	50	G _{filtro}	Cu/Ni,NiMo	7.0	AS ¹	0.5	1.0 mm	30
Rivera 2017	0.24	G _{filtro}	SS _{malla #60}	7.0	AS ¹	0.8	4 cm	32
Li 2017	2.29	C _{cepillo}	SS _{malla#70} /Ni	11.0	AS ¹	0.90	0.5 cm	30
Hrapovic 2010	7.72	SS _{filtro}	Ti _{malla} /Pt	7.4	AS ¹	1.0	1 mm	30
Feng 2018								

AS¹= agua sintética S*C=carbon **G=grafito SS= acero inoxidable

La mayoría de los ánodos que se han usado corresponden al grafito, carbon y sus derivados con uas pocas excepciones, mientras que en los cátodos hay un uso más variado, que van desde carbon dopado con Pt, pasando por metals recubiertos o dopados con otro elemento que funge como catalizador (Ni, Ni-P, etc.) hasta materiales con características muy específicas (malla de acero inoxidable, malla de titanio dopada con Pt).

2.7. Aguas sintéticas utilizadas en la producción de hidrógeno

Las aguas sintéticas usadas para producir biohidrógeno electrolítico, son de muy variada composición (Tabla 2.3), dependiendo de varios factores deseados para el comportamiento del sustrato como son la carga o concentración orgánica, la conductividad eléctrica, uso de compuestos químicos inorgánicos solamente o solo compuestos orgánicos o una mezcla de ambos.

Tabla 2.3. Aguas sintéticas utilizadas por diferentes investigadores para producir H₂ en una MEC

Referencia	Compuestos inorgánicos (g/L)						Comptos. orgánicos Levadura	HPR (m ³ /m ³ r.d)
	Na-acet.	NH ₄ Cl	KCl- NaCl	K ₂ /Na ₂ HPO ₄	KH ₂ PO ₄	E. traza		
Tartakovsky 2009	90.7	18.7	148.1	4 Na ₂ HPO ₄	40.7		6.7	6.3
Selembo 2009	-	0.31	0.13	Na ₂ HPO ₄ 4.58	NaH ₂ PO ₄ 2.45	Vits.	—	1.5
Jeremiasse 2010	0.1 MgSO ₄ ·7H ₂ O, 0.1 CaCl ₂ ·2H ₂ O	0.28	0.74-0.58	0.87	0.68			0.11
Ye 2010	0.20 MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.31	0.13	Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O 11.99	2.57 NaH ₂ PO ₄		—	1.02
Kyazze 2010	2.4 Acet-Na	0.31	0.13-26.6	4.330 Na ₂ HPO ₄	2.690 NaH ₂ PO ₄		—	0.2
Zhang 2010	1.0	0.31	0.13-0.0	4.58 g/L Na ₂ HPO ₄	2.45 g/L NaH ₂ PO ₄		—	2.1
Wang* 2011	1.20 MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.31	0.13-0.0	0.125 H ₃ BO ₃	0.1 ZnCl ₂	0.07 CuCl ₂ ,	0.12 (NH ₄) 6Mo ₇ O ₂₄ ·4H ₂ O	1.09
Tartakovsky*** 2011	55.34 acet-Na	18.7	148.1-0.0	64.0 K ₂ HPO ₄	40.7 KH ₂ PO ₄		**	2.8
Kuntke 2014	1.36 Acet-Na		0.74-0.58	0.87 K ₂ HPO ₄	0.68 KH ₂ PO ₄			48
Jeremiasse ⁶ 2011	2.72	0.28	0.74-0.58	0.87	0.68			50
Rivera 2017	1.23			0.8	0.4	Vits.		0.24
Hrapovic 2010	90.7 Acet-Na	18.7	148.1-0.0	64	40.7		6.7 ext. lev.	2.9
Feng 2018	2.0 NaHCO ₃	0.1	0.24 MgSO ₄ ·7H ₂ O	3.4	4.4			7.72

* 1.25 g/L Al₂(SO₄)₃·18 H₂O, 0.125 g/L CoCl₂·6H₂O, 0.125 g/L NiCl₂, 1.25 g/L EDTA, 0.1 g/L FeSO₄·7H₂O, 0.1 g/L CaCl₂·2H₂O

** (g/L).- Pepticasa (50), extracto res (50), extracto levadura (30), NH₄HCO₃ (17), K₂HPO₄ (1.5), KH₂PO₄ (1.75)

***0.1 mg/L MgSO₄·7H₂O

y 0.1 g/L CaCl₂·2H₂O, 0.01 g/L MgSO₄·7H₂O

2.8. Aguas sintéticas de diferentes concentraciones y diferentes conductividades eléctricas

Carrera, *et al.*, 2013 diseñaron varias aguas residuales sintéticas (Tabla 2.3) cuyas diferencias fueron las diferentes concentraciones de la materia orgánica presente (DQO) y las diferentes conductividades desarrolladas por las mismas. Estas aguas sintéticas sirven para llevar a cabo estudios donde el agua residual real que se tratará en una MEC, tiene como características la conductividad y la concentración de la materia orgánica contenida en el seno de la misma. Ellos diseñaron estas diferentes aguas sintéticas con el objetivo de abarcar cierta gama de aguas residuales que tuvieran en común tanto la conductividad eléctrica como la concentración de la materia orgánica presente y de esa manera poder hacer un estudio, primeramente con un agua sintética y después llevarlo a cabo con un agua real.

Tabla 2.4. Composiciones de agua sintética de diferentes concentraciones y conductividades eléctricas (Modificado de Carrera, *et al.*, 2013)

Solución	Sucrosa (g/L)	Pepticasa (g/L)	Ext. de res (g/L)	Ext. de levadura (g/L)	NH ₄ HCO ₃ (g/L)	K ₂ HPO ₄ (g/L)	KH ₂ PO ₄ (g/L)	NaCl (g/L)	H ₂ L/L _R d	DQO inic. (g/L)
AF/AC	-	2.5	2.5	1.5	0.85	0.087	0.075	2.81	1.5	6.0
BF/AC	-	0.179	0.179	0.107	0.85	0.087	0.075	2.81	0.02	0.6
AF/BC	-	2.5	2.5	1.5	0.0607	0.006	0.005	0.2	0.40	6.0
Su/AC ^a	6.8	-	-	-	-	0.49	0.42	-	0.04	0.5
FM/AC ^b	0.22	0.046	-	-	0.52	1.38	0.69	0.83	0.31	1.2

Notas: AF-alta fuerza, BF- baja fuerza. AC-alta conductividad, BC-baja conductividad, A-acetato, Su-Sucrosa, FM-fuerza media Se agregó además, SMT-solución metales traza (mL/L) para todos los tipos de aguas.

^a Concentración del influente después de diluir con agua

^b También contiene (g/L): 0.26 de MgSO₄·7H₂O y 0.26 de MnSO₄·7H₂O.

*Composición de la solución de elementos traza

FeCl₂·4H₂O, 50 g/L; ZnCl₂, 1.25 g/L; MnCl₂·4H₂O, 12.5 g/L; (NH₄)₆Mo₇O₂₄·4H₂O, 1.25 g/L; CoCl₂·6H₂O, 3.75 g/L; NiCl₂·6H₂O, 2.5 g/L; CuCl₂·2H₂O, 0.75 g/L; H₃BO₃, 1.25 g/L. pH inicial=7 ajustado con 1 M HCl y NaOH (Rivera, 2017).

2.9. Antecedentes en la producción de biohidrógeno fermentativo, biohidrógeno producido en una MEC utilizando níquel y sus aleaciones como cátodos con aguas residuales reales y escalamiento de las MEC.

Varias investigaciones se han realizado para incrementar la eficiencia catódica en la producción de hidrógeno y la remoción de materia orgánica de diferentes aguas residuales, ya sean sintéticas o reales, mediante fermentación oscura o mediante electro-fermentación en una MEC, utilizando cátodos de Níquel y sus aleaciones. A continuación se cita una selección de varias investigaciones.

(a) Rivera, *et al.*, 2017. *Evaluation of various cheese whey treatment scenarios in single chamber microbial electrolysis cells for improved biohydrogen production.*

En este estudio, compararon los rendimientos de las celdas de electrólisis microbiana de una sola cámara (i) primero directamente alimentadas con lactosuero (LS) y luego (ii) con los efluentes de biorreactores de fermentación oscura metanogénicos que tratan este residuo

particular de la industria lechera. Utilizaron malla de inoxidable tipo 304 para el cátodo y fieltro de grafito para el ánodo. Los rendimientos fueron inferiores a los 120 mL en un proceso de 50 horas. La temperatura de la MEC se mantuvo a 32 °C mediante un baño maría. La producción de gas se cuantificó utilizando el método de desplazamiento de agua mediante cilindros de medición, colocados en forma invertida.

(b) Feng, *et al.*, 2018 “An effective method for hydrogen production in a single-chamber microbial electrolysis by negative pressure control”.

Construyeron una MEC tubular escalable de una sola cámara, que usaba una presión negativa (40.52 kPa) con el objetivo de mejorar la producción de hidrógeno. Reportaron que la presión negativa podría mejorar de manera efectiva la producción de hidrógeno, así como inhibir el crecimiento de microorganismos metanógenos. Obtuvieron una tasa diaria de producción de hidrógeno de 7.72 m³ de H₂/m³RD cuyo valor se ubica dentro de los primeros diez máximos históricos a nivel mundial. El valor fue comparado con el obtenido en un reactor que trabajó bajo una presión normal (1.51 m³ de H₂/m³RD).

(c) Fujian, *et al.*, 2017 “Enhancing hydrogen production with Ni-P coated nickel foam as cathode catalyst in single chamber microbial electrolysis cells”.

Utilizaron cátodos de espuma de Níquel, espuma de Níquel recubierta con aleación de Ni-P y malla #70 de acero inoxidable para reemplazar a los catalizadores de los metales nobles tales como el platino (Pt). El rendimiento en la producción de hidrógeno del cátodo Ni-P fue significativamente superior al de los otros dos cátodos (espuma de Ni y malla de acero inoxidable) en un volumen de MEC menor a 100 mL (escala laboratorio). La máxima producción de hidrógeno alcanzó los 2.29 m³/m³RD a un potencial aplicado de 0.9 V usando agua sintética como sustrato.

(d) Gupta, *et al.*, 2015 “Design of a single chambered microbial electrolytic cell reactor for production of biohydrogen from rice straw hydrolysate”.

El derivado de deshecho agroindustrial (hidrolizado de cáscara de arroz) fue usado como sustrato. Los electrodos consistieron en grafito plano como ánodo y malla de acero inoxidable como cátodo con un rendimiento en la producción de hidrógeno de 0.8 m³/m³RD, con un potencial aplicado de 0.7 V. Como inóculo se usó *Shewanella putrefaciens*, una bacteria exoelectrogénica productora de hidrógeno.

(e) Wu, *et al.*, 2013 “Hydrogen production with effluent from an anaerobic baffled reactor (ABR) using a single-chamber microbial electrolysis cell (MEC)”.

Utilizaron un reactor anaerobio con deflectores acoplado a una MEC para la producción de hidrógeno. Los electrodos usados fueron tela de carbón como ánodo y malla de acero inoxidable dopada con nanopartículas de Níquel como cátodo. La producción de hidrógeno alcanzada fue de 1.31 m³/m³RD.

(f) Zhang, *et al.*, 2010 “The use and optimization of stainless steel mesh cathodes in microbial electrolysis cells”.

En su trabajo de investigación reportaron el uso de malla #60 de acero inoxidable como cátodo mayor productor de hidrógeno, alcanzando una producción máxima de 2.1 m³ de H₂/m³RD a un pH de 7.0 y un potencial aplicado de 0.9 V.

(g) Jeremiase, *et al.*, 2011 “Performance of metal alloys as hydrogen evolution reaction catalysts in a microbial electrolysis cell”.

En su estudio, demostraron que una hoja de cobre recubierta con una aleación de Ni-Mo, tenía una mayor actividad catalítica en la reacción de evolución del hidrógeno, al obtener $50 \text{ m}^3 \text{ H}_2/\text{m}^3 \text{ R d}$, utilizando una MEC de dos cámaras dividida por una membrana de intercambio aniónico.

CAPÍTULO 3. Hipótesis, objetivos, Justificación y metodología

Este trabajo se realizó bajo la propuesta de incrementar la producción de hidrógeno más allá de 50 m^3 con relación a 1 m^3 de volumen de reactor durante el lapso de 1 día ($\text{m}^3/\text{m}^3_{\text{RD}}$) usando agua residual de alta concentración. Lo anterior se asentó bajo la siguiente hipótesis:

3.0. Hipótesis

Si se utiliza un cátodo con una mayor conductividad con respecto al cátodo de carbón u otro material derivado del mismo y además, se incrementa la relación de las áreas anódica entre el área catódica ($A_{\text{an}}/A_{\text{cat}}$) se aumentará la producción de hidrógeno en una MEC más allá de 50 m^3 de $\text{H}_2/\text{m}^3_{\text{RD}}$, usando un agua residual de alta concentración.

3.1. Objetivo General

El objetivo de esta investigación tiene como propósito: aumentar la producción de hidrógeno más allá de $50 \text{ m}^3/\text{m}^3_{\text{RD}}$ y remover la materia orgánica de un agua residual de alta concentración, así como evaluar el desempeño electroquímico de tres diferentes cátodos metálicos, dos diferentes ánodos y dos diferentes áreas de un mismo tipo de ánodo en una MEC.

3.2. Objetivos específicos

- 1.-Evaluar tres matrices ambientales (rumen de vaca, estiércol de vaca y lodo granular anaerobio) para desarrollar un inóculo como generador de biohidrógeno en una MEC.
- 2.-Determinar el desempeño bioelectroquímico de cobre recubierto con níquel, Fe sólido, malla#60 de acero inoxidable 304 al ser usados como cátodos en una MEC para la producción de H_2 .
- 3.-Determinar el desempeño bioelectroquímico de una Malla plana de acero inoxidable #60 (área geométrica sencilla), Malla plisada de acero inoxidable #60 (doble área geométrica) y Filtro de grafito al ser usados como ánodos en una MEC para la producción de H_2 .
- 4.-Evaluar el desempeño bioelectroquímico de una MEC en la producción de hidrógeno, al usar dos distancias de separación (2 y 4 cm) entre los electrodos.
- 5.-Analizar y determinar cuál o cuáles de las siguientes tres aguas residuales Vinaza, Melaza y Lactosuero, genera la mayor producción de hidrógeno en una MEC.
- 6.-Analizar la morfología superficial de los electrodos de la MEC después del tratamiento del agua residual utilizando microscopía de barrido electrónico.

3.3. Justificación

La generación de subproductos o residuos agroindustriales en las diferentes etapas de los procesos productivos es actualmente una problemática a nivel mundial, debido a que en la

mayoría de los casos no son procesados o dispuestos adecuadamente, situación que contribuye al proceso de contaminación ambiental. Los residuos agroindustriales cuentan con un alto potencial para ser aprovechados en diferentes procesos que incluyen elaboración de nuevos productos, agregación de valor a productos originales y recuperación de condiciones ambientales alteradas. Se identificaron cinco categorías de empleo de los residuos agroindustriales: 1) obtención de bioenergéticos (bioetanol, biodiésel, biogás, biomasa energética), 2) proceso de compostaje, 3) aprovechamiento en la producción de alimentos para animales, 4) elaboración de otros productos de interés (ladrillos, compósitos, estibas, entre otros) y 5) recuperación de medios abióticos contaminados (remoción de colorantes, metales pesados e hidrocarburos). El aprovechamiento de estos residuos se ha convertido en un tema de gran interés por los diversos beneficios ambientales y económicos obtenidos, que promueven un desarrollo sostenible (Vargas, *et al.*, 2018). México es un gran productor de bebidas alcohólicas (Tequila, Brandy, Ron, etc) que generan gran cantidad de aguas residuales (9 L/L de bebida producida) con alta carga orgánica, con el estado de Jalisco como primer generador de estas aguas residuales, además de Oaxaca, Guerrero, Zacatecas que generan el mismo tipo de aguas residuales, pero generadas a través de la producción de los mezcales. Otra fuente generadora de aguas residuales con gran contenido de materia orgánica es el lactosuero, generado en el procesado de la leche para producir queso. México es uno de los productores de quesos más importantes de América Latina. Actualmente, el país ocupa el tercer lugar en la región como la nación con mayor producción de quesos de distintas variedades. La industria de quesos produjo 332 mil 251 toneladas, eso genera tres veces más en aguas residuales (Mariana González Hernández. Mexicampo Internacional. 8 marzo, 2016). Otro producto residual de gran importancia es la melaza, que se genera en el procesado del jugo de caña para producir azúcar para el consumo humano. Se produjeron 1976000 en la zafra 2015-2016 (CONADESUCA. Informe estadístico del sector agroindustrial de la caña de azúcar en México, Zafras 2016-2007/2015-2015). Estos subproductos de alta carga orgánica, pueden usarse como sustrato en las MECs para producir hidrógeno, ello contribuiría a disminuir la carga orgánica que contienen y al mismo tiempo, producir hidrógeno que se usaría como vector energético.

3.4 Metodología

3.4.1. Plan de investigación

El siguiente esquema muestra el plan que se siguió para realizar la investigación desde el estudio para escoger el inóculo hasta finalizar con la investigación de la producción de hidrógeno en el RABE.

Inóculo	Água sintética (MEC)	Aguas reales (MEC)	Aguas reales (RABE)
(escogencia de un inóculo)	Nivel laboratorio (¼ L)	Nivel laboratorio (¼ L)	Nivel piloto (15 L)
Estudio de 3 matrices ambientales	Análisis de 11 pares de electrodos * 2 mejores pares	*El mejor inóculo 2 pares de electrodos 3 aguas reales	2 pares de electrodos 3 aguas reales

Figura 3.1. Esquema del diseño del plan de investigación para la producción de H₂ utilizando agua sintética y agua residual real (Melaza, vinaza y lactosuero).

La investigación se dividió en cuatro etapas (Figura 3.1): la primera etapa se concretó a la escogencia de un inóculo óptimo de entre las tres siguientes matrices ambientales: rumen de vaca, estiércol de vaca y lodo granular anaerobio. En la segunda etapa, se evaluaron 11 pares de electrodos tanto en condiciones abióticas (sin bacterias) así como en condiciones bióticas (inclusión de bacterias), para determinar el desempeño electroquímico de los mismos, usando como sustrato agua residual sintética de alta carga orgánica según la formulación de Carrera, *et al.*, 2013, se usó un baño térmico para mantener la temperatura controlada en 25 ± 1 °C. Se midieron las producciones de hidrógeno y se establecieron los dos pares de electrodos que produjeron las dos mayores producciones de hidrógeno. Para la tercera etapa se utilizaron aguas residuales reales (melaza, vinaza y lactosuero) y los dos mejores pares de electrodos de la etapa dos, la temperatura se mantuvo igual que en la etapa anterior. Para la última y cuarta etapa, se determinó la producción de hidrógeno en una MEC grande (RABE de 15 litros) usando los dos mejores pares de electrodos de la segunda etapa, pero con un área superficial mayor (60 veces la del área de la 2da. etapa), a temperatura ambiente (21-30 °C).

3.4.2. Primera etapa, obtención del Inóculo

El objetivo del estudio fue obtener un inóculo de cada una de las tres matrices seleccionadas y, mediante cultivos de bacterias y técnicas de identificación microbiológica, determinar la fuente que generó un mayor poder de esporulación, es decir, la matriz que poseía una mayor cantidad de bacterias productoras de hidrógeno. El tratamiento elegido fue el choque o tratamiento térmico, que se realizó a 95°C durante 30 minutos, colocando para ello el recipiente que contenía la fuente ambiental, en un recipiente con agua. El tamaño de la muestra fue de 4 litros aproximadamente. Una vez esterilizado, se tomó la cantidad necesaria para la inoculación y el restante se guardó en condiciones anaerobias a una $T=5$ °C para futuras inoculaciones. Posteriormente se realizó el sembrado en cajas Petri, usando como medio de cultivo agar base sangre bajo condiciones anaerobias. Luego de un tiempo de incubación de 48 horas a 37 °C, se aislaron las cepas presentes, y se caracterizaron a través de la respuesta a la técnica de Wirtz-Conklin y tinción de Gram. La técnica de Gram indica si las bacterias son Gram+ o Gram-, es decir, determina si las bacterias son del tipo vegetativas (Gram-) o del tipo Gram+, las cuales tienen el poder de esporular, cuando las condiciones ambientales son adversas, lo que les da el poder de seguirse reproduciendo, cuando las condiciones ambientales son favorables; a este último tipo pertenecen la bacterias productoras de hidrógeno. La técnica de Wirtz-Conklin sirve para confirmar la presencia de bacterias con capacidad de esporular, al realizar la técnica sobre un frotis de un sembrado posterior al tratamiento térmico, las bacterias esporulantes, se teñirán de verde. Una vez desarrollados los cultivos, se realizaron 4 aislamientos para obtener un cultivo lo más puro posible, y así identificar el tipo de bacteria que dió un mayor crecimiento, para su análisis mediante técnica de PCR.

3.4.3. Diseño del experimento y Matriz de experimentación

Para diseñar el experimento con agua sintética (las otras experimentaciones referentes a las aguas reales en una MEC y en un RABE fueron consecuencia del primero) se utilizó el programa estadístico Minitab, alimentado con 6 variables categóricas (3 cátodos y 3 ánodos) y 2 variables numéricas (2 distancias) usando 2 réplicas (2 repeticiones), lo que arrojó un total de 36 experimentos. Como 36 experimentos requerirían mucho tiempo para su

realización, el experiment se fraccionó a ¼, lo que dió un total de 9 experimentos. El detallado completo de la matriz de experimentación se puede ver en la Tabla 3.1.

Tabla 3.1. Diseño del experimento y fraccionamiento a ¼ del total de experimentos

Resumen del diseño (programa Minitab)

Factores: 3 Réplicas: 1
 Corridas base: 18 Total de corridas: 36
 (por duplicado)

Número de niveles: 3, 3, 2 (3 cátodos, 3 ánodos y 2 distancias)

Número de columna					Diseño factorial seleccionado según D-optimalidad: 36 (con una réplica). Términos del modelo fraccionado aleatorio: 9.
1	2	3	4	5	
orden	No.				El diseño inicial se generó utilizando el método secuencial. Se mejoró el diseño inicial utilizando el método de intercambio. El número de puntos de diseño intercambiados es 1.
aleatorio	consecutivo	ánodo	cátodo	d	
16	1	Malla2	Malla1	4	
14	2	Malla2	Fe	4	
34	3	Malla2	Malla1	4	
23	4	FG	Cu/Ni	2	
4	5	FG	Malla1	4	
27	6	Malla1	Malla1	2	
22	7	FG	Malla1	4	
9	8	Malla1	Malla1	2	
20	9	FG	Fe	4	
11	10	Malla1	Cu/Ni	2	
3	11	FG	Malla1	2	
24	12	FG	Cu/Ni	4	
32	13	Malla2	Fe	4	
35	14	Malla2	Cu/Ni	2	
19	15	FG	Fe	2	
31	16	Malla2	Fe	2	
13	17	Malla2	Fe	2	
30	18	Malla1	Cu/Ni	4	
21	19	FG	Malla1	2	
10	20	Malla1	Malla1	4	
28	21	Malla1	Malla1	4	
5	22	FG	Cu/Ni	2	
8	23	Malla1	Fe	4	
36	24	Malla2	Cu/Ni	4	
15	25	Malla2	Malla1	2	
1	26	FG	Fe	2	
7	27	Malla1	Fe	2	
25	28	Malla1	Fe	2	
29	29	Malla1	Cu/Ni	2	
2	30	FG	Fe	4	
26	31	Malla1	Fe	4	
18	32	Malla2	Cu/Ni	4	
33	33	Malla2	Malla1	2	
6	34	FG	Cu/Ni	4	
12	35	Malla1	Cu/Ni	4	
17	36	Malla2	Cu/N	2	

O. E. ¹	Orden Corrida*	Ánodo	Cátodo	d**
35	9 (MEC2)	Malla2	Cu/Ni	2
34	1 (MEC1)	Malla2	Malla1	4
12	6 (MEC6)	Malla1	Cu/Ni	4
27	3 (MEC10)	Malla1	Malla1	2
20	13 (MEC8)	Grafito	Fe	4
25	2 (MEC5)	Malla1	Fe	2
23	14 (MEC3)	Grafito	Cu/Ni	2
3	20 (MEC4)	Grafito	Malla1	2
31	31 (MEC9)	Malla2	Fe	2

*El cambio de nomenclatura a MEC fue hecho de acuerdo a la tasa de producción de hidrógeno (HPR), así la MEC1 corresponde a la mayor producción de hidrógeno.

d**.-Es la distancia de separación entre los electrodos.

O.E.¹.-Se refiere al orden consecutivo estadístico calculado por el programa Minitab

Orden de corrida.-Se refiere al orden aleatorio de los experimentos escogido del orden consecutivo por el programa Minitab.

Como se puede observar en la Tabla 3.2, el programa Minitab seleccionó en forma aleatoria los 9 experimentos del total de los 36 que se realizaron con los pares de electrodos y su distancia de separación seleccionados (remarcados en gris).

3.4.4. Materiales de los electrodos

Los materiales de los electrodos que se utilizaron en esta investigación fueron: Acero inoxidable 304 (SS) malla plana# 60 (M1) (17,5-19,5 % Cr, 8-10,5 % Ni, 2 % Mn, 1 % Si, 0,1 % N, 0,07 % C y 0,045 % P), Malla plisada #60 acero inoxidable304 (M2) y fieltro de grafito (GF) (> 97% C) utilizados como ánodos. Barra de Cu dopada con Ni (Cu/Ni), M1 (arriba mencionado) y barra de Fe como cátodos. Estos materiales fueron previamente tratados antes de ser utilizados en las MECs según Zhang *et al.*, 2010.

3.4.5. Tratamiento de los electrodos

La malla de doble longitud del ánodo M2 se plisó a lo ancho de la malla, de manera que los dobleces quedaron de manera horizontal. Los ánodos M1 y M2 fueron previamente lavados con agua desionizada y sumergidos en una solución de H₂SO₄ 1 M por 24 h. Posteriormente, los electrodos se lavaron con agua desionizada. El GF se sumergió en H₂SO₄ 1 M durante 12 h, luego se enjuagó con agua desionizada. Posteriormente, se sumergió en hidróxido de amonio al 10% durante 12 h a pH 7 (Yu, *et al.*, 2021). Los ánodos M1, M2 y GF se secaron en un horno a 105 °C durante 2 h. Los ánodos de SS fueron adquiridos en Anhesheng Mesh Co., Ltd., China. El electrodo GF fue adquirido en Brunssen de Occidente, S.A. de C.V, Guadalajara, México.

Las barras-cátodos de Fe y Cu (pureza 99.5%) fueron adquiridas en Proincomm S. A. de C. V. Xochimilco, México. Los cátodos de M1, barra de Fe y Cu/Ni se lavaron con solución 1.0 M HCL por 15 min, se enjuagaron con agua desionizada hasta alcanzar un pH de 7 y finalmente los electrodos se secaron en estufa a 105°C por 1 h. La barra de Cu se revistió con Ni mediante un proceso electroquímico. La solución de recubrimiento electroquímico contenía 180 g/L de NiSO₄, 25 g/L de NH₄Cl y 30 g/L de H₃BO₃ a un pH=4. La temperatura se controló a 65 °C. El tiempo de metalizado fue de 4 min aplicando un voltaje de 5 V y una corriente eléctrica de 1.3 A. Durante la técnica de metalizado electroquímico se utilizó solera de Cu y arandelas de Ni como cátodo y ánodo. La diferencia en la masa del cátodo entre antes y después de la deposición del catalizador sobre la superficie expuesta del cátodo se consideró como carga de catalizador en g/cm² (0,018 g/cm²).

3.4.6. Segunda etapa: producción de hidrógeno usando agua sintética

Se utilizó como reactor bioelectroquímico una MEC de cámara única de V=0.250 L con tapa de plástico (Figura 3.2). Como inóculo se utilizó lodo granular anaerobio obtenido de un reactor UASB que trataba aguas residuales de la industria papelera. El agua residual sintética se preparó según Gil-Carrera *et al.*, 2013 usando pepticasa (4.17 g/L), extracto de carne (4.17 g/L), extracto de levadura (2.5 g/L), NaHCO₃ (1.84 g/L), K₂HPO₄ (0.145 g/L), KH₂PO₄ (0.125 g/L), NaCl (4.68 g/L) agregando 1 mL/L de solución de oligoelementos (Wang, *et al.*, 2011): (NH₄)Cl 0.31 g/L, KCl 0.13 g/L, H₃BO₃ 0.125 g/L, MgSO₄.7H₂O 1.0 g/L, ZnCl₂ 0.125 g/L, CuCl₂ 0.075 g/L, MnSO₄.H₂O 1.0 g/L, (NH₄)₆Mo₇O₂₄.4H₂O 0.125 g/L, Al₂(SO₄)₃.18H₂O 1.25 g/L,

$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.125 g/L, NiCl_2 0.125 g/L, EDTA 1.25 g/L, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0.10 g/L) y CaCl_2 (0.10 g/L). El agua residual sintética tuvo una DQO de 18.0 g/L y conductividad eléctrica de 16.20 mS/cm. A las MECs se les agregaron 145 ml de agua residual sintética a pH=5.2 se utilizó HCl 1 N y NaOH 1 N para ajustar el pH. Se utilizaron electrodos M1, M2 y FG como ánodos con un área de superficie proyectada de 4.25 cm² (1.7 x 1.25 cm² x 2 caras). El ánodo M2 tuvo una superficie de proyección de 8.5 cm² (3.4 x 1.25 cm² x 2 caras). Se utilizaron electrodos de Cu/Ni, M1 y Fe como cátodos con la misma área superficial proyectada de los ánodos (4.25 cm²). Se probó una distancia entre los electrodos de 2 y 4 cm en la MEC. Se aplicó a este trabajo un diseño de experimentos con fraccionamiento a un cuarto (Tabla 3.1). Las MECs se operaron con la siguiente configuración de electrodos (ánodo-cátodo): M2-M1 (MEC1), M2-Cu/Ni (MEC2), GF-Cu/Ni (MEC3), GF-M1 (MEC4), M1-Fe (MEC5), M1-Cu/Ni (MEC6), GF-GF (MEC7 d=4 cm), GF-Fe (MEC8), M2-Fe (MEC9), M1-M1 (MEC10) y GF-GF (MEC11 d=4 cm). Los electrodos no estuvieron separados por ningún tipo de membrana o cualquier otro tipo de separador. Se aplicó un voltaje de 0.8 V a las MECs utilizando una fuente de alimentación UNIT-T UTP3313TFL DC. Todas las MECs se operaron en modo por lotes. Los ensayos se realizaron por triplicado. El análisis de varianza se aplicó para comparar la producción de biohidrógeno con una configuración de electrodos de matriz diferente. Los valores de p inferiores a 0.05 se consideraron estadísticamente significativos. Con el objetivo de comparar las producciones de biohidrógeno generadas por las MECs durante el tratamiento de aguas residuales de alta fuerza, un reactor sin electrodos llamado "reactor de fermentación oscura" (reactor FO) fue probado simultáneamente.

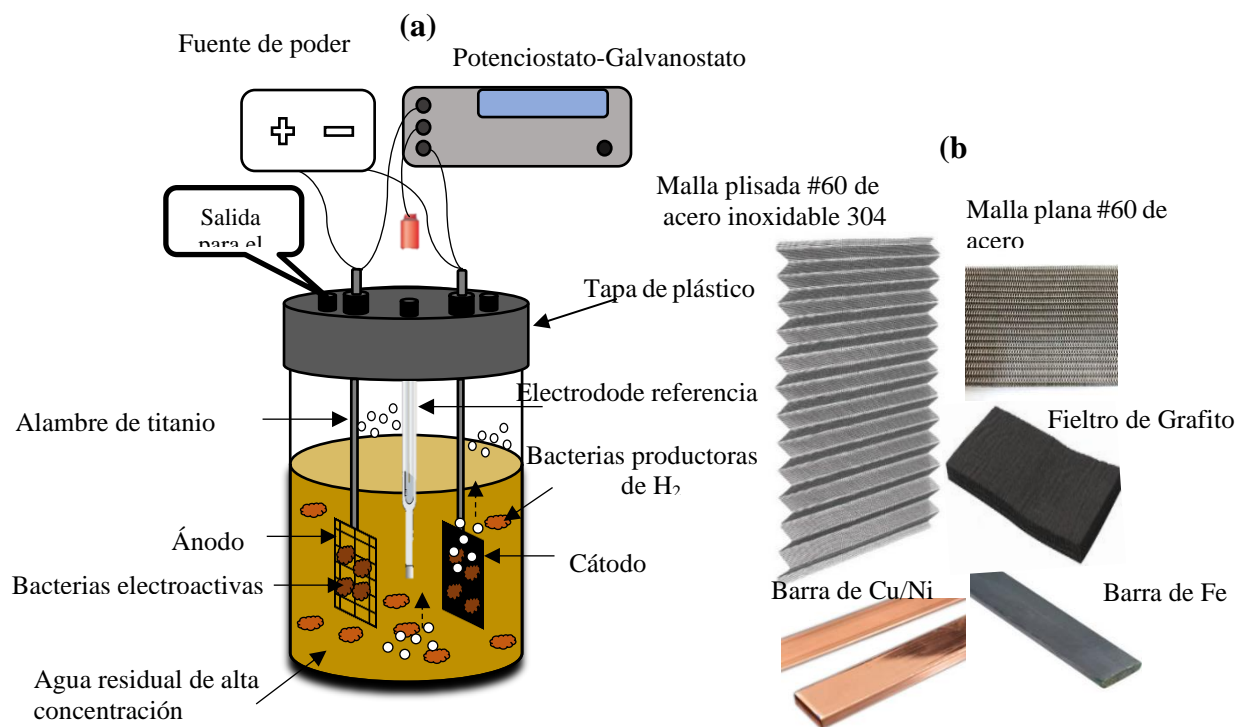


Figura 3.2. Arreglo del experimento en una MEC sin membrana y de una sola cámara (a) y materiales de los electrodos (b). Usada tanto para la experimentación con agua sintética como con aguas reales (Melaza, vinaza y lactosuero).

Todas las conexiones eléctricas se realizaron con alambre de titanio. Los experimentos (bióticos y abióticos) se realizaron a 25 ± 1 °C y se agitaron a 25 rpm con un agitador orbital. Las MECs se esterilizaron en una estufa a 105 °C durante 60 min, antes de agregarles el inóculo y el agua residual sintética. Luego se les burbujeó gas nitrógeno a un flujo de 30 ml/min durante 1 min para lograr condiciones anaeróbicas. El lodo fue tratado previamente a 95 °C durante 30 min para inhibir el crecimiento de metanógenos y reducir la formación de CO₂ (Wang, *et al.*, 2011). Posteriormente, los lodos pretratados se aclimataron en condiciones anaeróbicas con agua residual sintética a un valor de DQO de 9 g/L durante siete días y luego se introdujeron en las MECs, para arrancar la producción de biohidrógeno. Las MECs abióticas (sin inóculo) se montaron simultáneamente durante la producción de biohidrógeno trabajando en las mismas condiciones que las MECs inoculadas con lodo pretratado (MEC bióticas).

3.4.7. Análisis físico-químico, cromatográfico y cálculos

El análisis de DQO se midió utilizando la prueba HACH (HACH Odyssey DR/2500). El biogás producido por las MEC se determinó mediante el método de desplazamiento de agua y se tomó una muestra de la cabeza de la MEC para su posterior análisis. La composición del biogás (H₂, CH₄ y CO₂) del espacio de cabeza de las MEC fue analizado en un cromatógrafo de gases SRI 8610C equipado con un detector de conductividad térmica. La columna utilizada fue una Micropacked Colum 2 m 1 mm/16" OD SILCO (RESTEK). Se utilizó helio como gas portador a una presión de 60-80 psi. La temperatura de la columna y del horno se mantuvieron a 50 °C durante 2 min, luego se aumentó a 120 °C con una rampa de 20 °C/min. Los ácidos grasos volátiles (VFAs) se analizaron con un cromatógrafo de gases SRI 8610C equipado con un detector de ionización de llama [34]. La columna de GC utilizada fue una Stabilwax®-DA de polietilenglicol Crossbond®Carbonwax®, 30 mx 0,25 mm de D.I., con un espesor de película de 0.25 µm. La temperatura del horno fue de 145 °C y se mantuvo durante 6 min, se utilizó helio como gas portador.

3.4.8. Cálculos energéticos

La eficiencia coulombica (CE), la recuperación de energía general (η_{E+S}) y otros parámetros se calcularon para ilustrar el rendimiento de las MEC de acuerdo con Kadier *et al.* 2022. La recuperación de biohidrógeno catódico (r_{cat}) en % se calculó mediante la ecuación $r_{cat} = \eta_{H_2}/\eta_{CE}$, donde η_{H_2} es el número de moles de biohidrógeno producido $\eta_{H_2}(\text{mol de } H_2) = V_{H_2}P/RT$, donde V_{H_2} es el volumen de biohidrógeno generado por la MEC (L), P es la presión (1 atm), R es la constante de los gases (0,08 L·atm/mol·°K) y T es la temperatura termodinámica (298,15 °K). Los moles teóricos de biohidrógeno debido al voltaje aplicado son $\eta_{CE}(\text{mol } H_2) = \int_0^t I dt / 2F$, donde I es la corriente eléctrica (A), t es el tiempo de operación (s) y F es la constante de Faraday (96 485 C/mol e⁻); se generan 2 mol de electrones por mol de biohidrógeno. La recuperación de energía total (%) se calculó con la siguiente ecuación $\eta_{E+S} = W_H/W_{E+S}$, donde W_H está dada en kWh y corresponde a la recuperación de energía a partir del H₂ ($W_H = \frac{\Delta H_{H_2} \eta_{H_2}^2}{3600}$), W_E en kWh es la energía eléctrica aplicada ($W_E = I * E * \Delta t$), y W_S en kWh es el contenido energético de la DQO consumida ($W_S = \Delta DQO * \Delta H_{DQO} / 3600$). El kilojulio (kJ) se convirtió a kilovatio-hora (KWh) usando la

unidad de conversión de 3600 kJ/kWh. E es el voltaje aplicado (V) en la MEC, Δt es el tiempo de operación (h), ΔH_{DQO} es el calor de combustión de DQO (17.6 kJ/mol) y ΔH_{H_2} es el calor de combustión de hidrógeno (876.34 kJ/mol). ΔDQO (DQOi- DQOf) es la fracción eliminada de DQO (g/L) donde DQOi es la DQO inicial (18 g/L) y DQOf es la DQO final después del tratamiento. La eficiencia coulombica (CE) se calculó mediante la ecuación $CE = \left(\frac{\eta_{CE}}{\eta_{th}}\right) * 100$, donde η_{th} (mol H₂) = $Vr\Delta DQO/MO_2$, donde MO₂ = 32 g/mol es el peso molecular del O₂, y Vr es el volumen del reactor en litros. La recuperación total de biohidrógeno (r_{H_2}) se calculó mediante $r_{H_2} = CE * r_{cat}$.

El comportamiento cinético de la producción de biohidrógeno se analizó con el modelo de Gompertz modificado (Ecuación 27):

$$H = 0.0 + H_{max} * (\exp)) \quad (\text{Ecuación 27})$$

donde, H es la producción total de hidrógeno acumulado (m³), H_{max} es el potencial de producción máxima de hidrógeno (m³), R_{max} es la tasa de producción máxima de hidrógeno (m³/d), λ es la duración de la fase lag o fase latente (d), t es el tiempo de operación (h).

la tasa de producción de hidrógeno (HPR) en términos de m³ H₂/m³_R.d fue calculada usando la Ecuación 28:

$$HPR = VH_2/tV_R \quad (\text{Ecuación 28})$$

donde, V_{H_2} es el volumen de biohidrógeno producido en la MEC (m³), t es el tiempo de operación (d), y V_R es el volumen de la MEC (m³).

DQO remoción (%) fué calculada con la Ecuación 29:

$$DQO_{rem} = (DQO_i - DQO_f) * 100/DQO_i \quad (\text{Ecuación 29})$$

3.4.9. Caracterización electroquímica

Se utilizó voltamperometría de barrido lineal (LSV), potencial de circuito abierto (OCP) y espectroscopia de impedancia electroquímica (EIS) para evaluar el rendimiento de las reacciones de evolución de hidrógeno (HER) en diferentes materiales de electrodos utilizados en este estudio. Las pruebas de LSV, EIS y OCP se realizaron con el potencióstato/galvanostato/ZRA de Interface 1000™, modelo 09097. Las mediciones de LSV se realizaron utilizando un rango de potencial de -0,8 V a 1,0 V, con una velocidad de exploración de 10 mV/s y un tamaño de paso de 5 mV. Para EIS, el rango de frecuencia fue de 10 kHz a 1,0 Hz, con una señal de CA de amplitud de 5 mV usando un sistema de dos electrodos, donde los cátodos MEC y los ánodos MEC eran los electrodos de trabajo y contraelectrodo, respectivamente. El sistema de tres electrodos se utilizó para la determinación del potencial de inicio de HER y OCP, donde los cátodos fueron los electrodos

de trabajo, los ánodos fueron los contraelectrodos y el electrodo Ag/AgCl fue el electrodo de referencia que se colocó a un costado del electrodo de trabajo. El potencial de inicio de HER se determinó utilizando el gráfico LSV según Zhang *et al.*, 2010 y Jafary *et al.*, 2017. Una vez estabilizada la producción de biohidrógeno en todas las MEC (fase estacionaria), se midieron LSV y OCP tras desconectar la tensión de entrada. La corriente se registró una vez al día, utilizando un multímetro digital (herramientas de calidad Børk, multímetro digital, México). La caracterización electroquímica fue realizada en las mismas condiciones y de la misma manera tanto para los experimentos a nivel laboratorio (segunda y tercera etapa), como la experimentación a un volumen mayor (RABE de 15 litros).

3.4.10. Microscopía de barrido electrónico (SEM)

El análisis superficial de los electrodos se realizó mediante un microscopio electrónico de barrido ambiental (ESEM) FEI - ESEM-QUANTA 200. Mediante un cañón termoiónico, que genera el haz de electrones a partir de un filamento de tungsteno (W), ofrece una resolución nominal de 10 nm. El análisis SEM se realizó en la malla plisada de acero inoxidable SS304 y el electrodo de Cu/Ni ya que, según los resultados obtenidos, estos dos materiales presentaron alta actividad electrocatalítica y bajo sobrepotencial.

3.4.11. Tercera etapa, arranque y operación de la MEC con aguas reales (Melaza, Vinaza y Lactosuero)

Como celda de electrólisis microbiana (MEC) se utilizó un frasco de vidrio con cámara única sin membrana con un volumen de 0.250 L, cubierto con una tapa plástica (el mismo que para el agua sintética Figura 3.2). Como inóculo se utilizó lodo granular anaerobio (AGS) obtenido del reactor UASB que trata aguas residuales de una industria papelera. Las MEC fueron alimentadas con aguas residuales reales (melaza, vinaza y suero), los pH fueron ajustados a 5.0 para las 3 aguas, con una conductividad medida de 4.97, 4.12 y 8.86 mS/cm, respectivamente. Las MEC se llenaron con 145 mL de agua residual real y 25 mL de AGS, las DQO y los pH iniciales se reportan en la tabla 6.5. El electrodo M2 utilizado como ánodo, tuvo una superficie proyectada de 8.50 cm² (2 x 3.4 cm x 1.25 cm) y los electrodos Cu/Ni y M1 como cátodos, tuvieron una superficie proyectada de 4.25 cm² (2 x 1.7 cm x 1.25 cm) utilizando ambas caras de los electrodos (ánodo y cátodo). Las MEC se operaron con la configuración de matriz de electrodos que se muestra en la Tabla 3.1. No se utilizó ninguna membrana de separación entre los electrodos. Se aplicó un voltaje de 0.8 V a las MECs utilizando la fuente de alimentación UNIT-T UTP3313TFL DC. Todos las MEC se operaron en modo por lotes. Los ensayos se realizaron por triplicado. Se aplicó el análisis de varianza para comparar la producción de biohidrógeno del estudio y los valores de p inferiores a 0.05 se consideraron estadísticamente significativos. Todas las conexiones internas de las MECs se realizaron con alambre de titanio y todos los experimentos se realizaron a una temperatura de 25 ± 1 °C, utilizando un baño térmico con agitación recíprocante. Se fijó una tapa de goma a la parte superior de las MECs para fijar el electrodo de referencia y un puerto de muestreo de la MEC para la toma de biogás. Todas las MECs se esterilizaron en una estufa a 105 °C

durante 60 min antes de agregar el AGS y el agua residual real, posteriormente se burbujearon con 30 ml/min de gas nitrógeno durante 1 min para lograr las condiciones anaerobias. Previo al inicio de la operación de MEC alimentada con agua residual real, el AGS fue tratado a 95 °C durante 30 min para inhibir el crecimiento de metanógenos y reducir la formación de CO₂ y luego fue aclimatado en condiciones anaerobias con agua residual real al 50% de dilución durante siete días.

3.4.12. Cuarta etapa. Producción de hidrógeno en un RABE

Como reactor bioelectroquímico se utilizó un RABE monocámara sin membrana con un volumen de 15 L (Figura 3.4). El RABE estaba hecho de acrílico (18x20x42 cm) con puertos en la parte superior, cubiertos con una tapa de plástico utilizada para obtener muestras de líquido y gas. Se utilizó como inóculo (1.5 L) lodo granular anaerobio (AGS) obtenido de un reactor UASB que trataba aguas residuales de la industria papelerera. Los RABEs se alimentaron con agua residual real (melaza, vinaza y suero) con un volumen de 8.5 L, el pH inicial fue de 3.6 para la melaza, 3.5 para la vinaza y 4.1 para el suero. Para el ajuste del pH se utilizó ácido clorhídrico 1 M e hidróxido de sodio 1 M. Los RABEs se operaron con la siguiente configuración de electrodos de matriz que se muestra en la Tabla 7.1. Cada electrodo se separó del otro 2 cm de distancia para el par M2-Cu/Ni, y 4 cm para los electrodos M2-M1. Los electrodos no estaban separados por una membrana o cualquier otro tipo de separador. Se aplicó un voltaje de 0.8 V a los RABE utilizando la fuente de alimentación UNIT-T UTP3313TFL DC. Todos los RABEs se operaron por lotes.

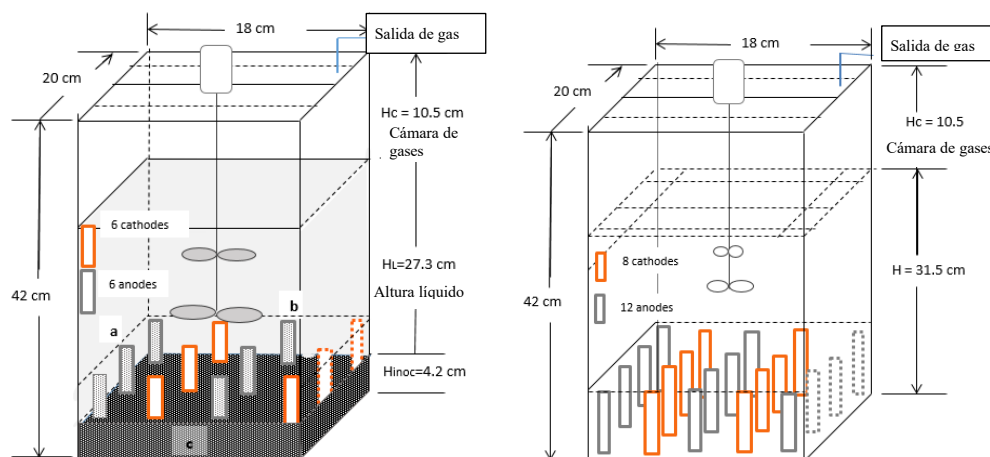


Figura 3. 3. Esquema de los RABEs y el arreglo de los electrodos con los pares de electrodos usados M2-M1 (izquierda) y M2-Cu/Ni (derecha) (Tomados de Posadas, *et al.*, 2023).

Capítulo 4. Resultados. Investigación del inóculo

4.1. Inóculo, plan de trabajo

El estudio del inóculo se realizó en base al siguiente diagrama:

Esquema general de trabajo

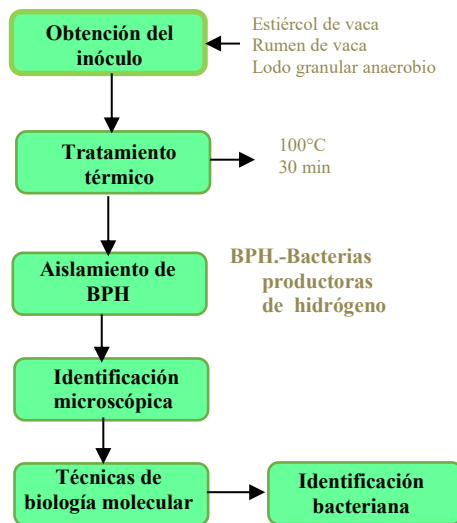


Figura 4.1. Diagrama de flujo para el tratamiento del inóculo

4.2. Obtención de las fuentes ambientales del inóculo

Las muestras de rumen de vaca (RV) y estiércol de vaca (EV), fueron obtenidas en el Rastro Municipal de Temixco, Morelos (Figuras 4.2 y 4.3), mientras que la muestra de lodo granular anaerobio (LGA) se obtuvo de una planta de tratamiento de aguas residuales de la empresa Unipak S.A. de C.V.

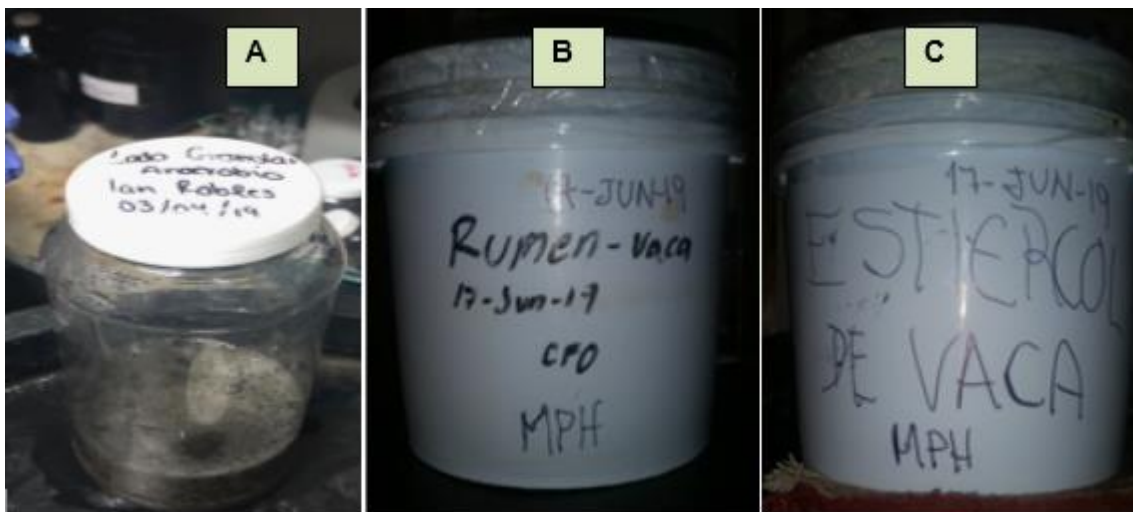


Figura 4.2. A) Muestra de LGA, B) Muestra de rumen, C) Muestra estiércol de vaca.

4.3. Pretratamientos para el inóculo

Una vez obtenidas las muestras del inóculo, se guardaron en un cuarto frío a temperatura controlada de 5 °C. Posteriormente, se les agregó 1 L de agua desionizada, tanto al rumen como al estiércol, para tener un mayor volumen de líquido, pues el contenido era casi sólido en su totalidad, mientras que para los lodos que estaban en estado sólido, se les agregó un 50% en volumen de agua desionizada, con respecto al volumen aparente del lodo. Se colocaron en una olla con agua, para calentarlos en baño maría a temperatura de ebullición durante 20 minutos, esto se logró a una temperatura de 95 °C. El tiempo de 20 minutos, se empezó a contar hasta que se alcanzó la temperatura de ebullición.



Figura 4.3. Aspecto físico de las tres fuentes ambientales para usarse como inóculos.

Posteriormente se tomaron muestras de menor tamaño (Figura 4.4), para de ellas realizar las diluciones necesarias y hacer los cultivos en los agares preparados previamente. Las muestras se transportaron en tubos de 50 mL de capacidad al laboratorio de microbiología para continuar con el proceso.



Figura 4.4. Muestras del extracto de estiércol de vaca, rumen de vaca y lodo granular anaerobio.

4.4. Identificación de bacterias esporulantes productoras de hidrógeno

El objetivo del estudio fué obtener un inóculo de cada una de las matrices seleccionadas y, mediante cultivos de bacterias y técnicas de identificación microbiológica, determinar la fuente que posee mayor poder de esporulación, es decir, la matriz que posee una mayor cantidad de bacterias productoras de hidrógeno. El tratamiento elegido fué el choque o tratamiento térmico, que se realizó a 95°C durante 30 minutos, colocando para ello el recipiente que contenía la fuente ambiental, en un recipiente con agua (baño maría). El tamaño de la muestra fué de 4 litros aproximadamente, una vez esterilizado, de allí se tomó la cantidad necesaria para la inoculación y el restante se guardó en condiciones anaerobias a una T=5 °C para futuras inoculaciones. Una vez realizado el tratamiento térmico, se procedió a realizar el sembrado en cajas Petri, usando como medio de cultivo agar base sangre bajo condiciones anaerobias. Luego de un tiempo de incubación de 48 a 72 horas a 37 °C, se aislaron las cepas presentes, y se caracterizaron a través de la respuesta a la tinción de Gram (Figura 4.5) y técnica de Wirtz-Conklin (Figura 4.6).

4.4.1. Pasos para el sembrado de bacterias

- 1.- Verter el medio de cultivo en cajas Petri en condiciones asépticas.
 - 2.- Sembrar bacterias en las cajas con medio agar base sangre, a partir de las muestras pre-tratadas.
 - 3.- Colocar las cajas Petri en una cámara de anaerobiosis (agotar el oxígeno con el uso de un mechero de alcohol) sellar herméticamente, incubar a 37 °C por 48 horas.
- Crecidas las bacterias, se procederá a realizar cultivos de las diferentes colonias presentes, para aislar las que esporularon en mayor cantidad

4.4.2. Identificación microbiológica

Utilizando las técnicas de tinción de Gram y tinción de Wirtz-Conklin, se realizó la identificación microbiológica de las bacterias sembradas, que consiste en determinar, mediante la técnica de Gram si las bacterias son Gram+ o Gram-, es decir, determinar si las bacterias son del tipo vegetativas (Gram-) o del tipo Gram+, las cuales tienen el poder de esporular, cuando las condiciones ambientales son adversas, lo que les da el poder de seguirse reproduciendo, cuando las condiciones ambientales son favorables; a este último tipo, pertenecen las bacterias productoras de hidrógeno. La técnica de Wirtz-Conklin sirve para confirmar la presencia de bacterias con capacidad de esporular, esta técnica se realiza, después de que el inóculo ha sido sometido a un tratamiento previo para eliminar las bacterias que no tienen capacidad de esporular, por lo cual al realizar la técnica sobre un frotis de un sembrado posterior al tratamiento, las bacterias esporulantes, se teñirán de verde. En caso de que las bacterias que no esporulan, aún estén presentes después del pre-tratamiento, éstas se teñirán de color rosa-rojo. Se preparan tinciones Gram y verde de malaquita, para determinar el tipo de bacterias que se generaron en los cultivos (Gram+ o Gram-), así como saber si fueron del tipo que producen esporas. Y de esa manera, saber si pertenecían a las bacterias productoras de hidrógeno, que son de tipo Gram+ y producen esporas. Para determinar si pertenecen a las Gram+, se utilizó la técnica de tinción con safranina. Por lo que respecta a la existencia de esporas, se utilizó la técnica del verde de malaquita. A continuación se describen ambas técnicas:

4.5. Pasos para la Técnica de Gram

- 1.-Preparación del frotis
- 2.-teñido con cristal violeta durante un minuto
- 3.-lavado con agua destilada para eliminar el exceso de colorante
- 4.-cubrir la preparación con lugol (mordente) por 30 segundos
- 5.-lavar con agua destilada para eliminar el exceso de lugol
- 6.-lavar con solución de alcohol-acetona (15-20 segundos) para eliminar el exceso de colorante
- 7.-lavar con agua destilada para eliminar los restos de alcohol-acetona
- 8.-teñir con safranina por 2 minutos
- 9.-lavar con agua destilada para eliminar el exceso de colorante
- 10.- secar al aire
- 11.- cubrir el portaobjetos con el cubre-objetos
- 12.-agregar una gota de aceite de inmersión y observar al microscopio con objetivo 100x

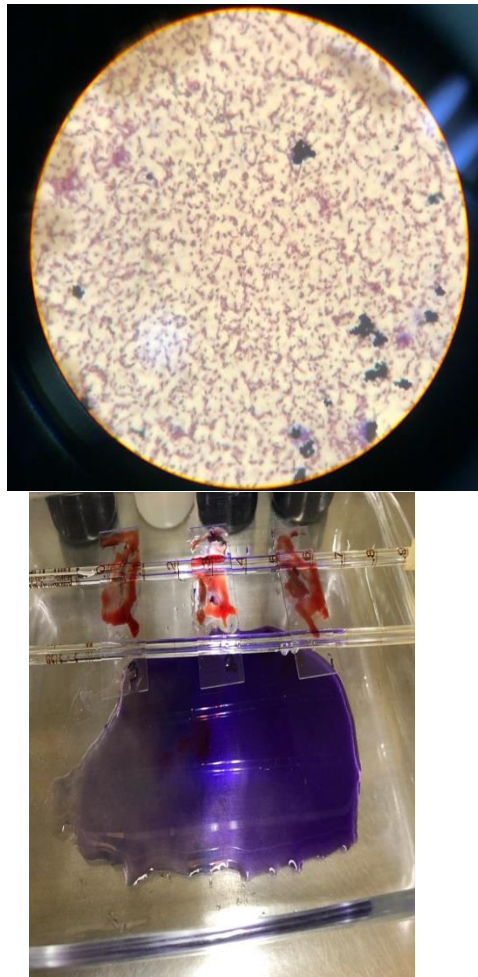


Figura 4.5. Técnica de Gram (izq.) y vista al microscopio (der.)

4.6. Pasos para la Técnica de Wirtz-Conklin (tinción con verde malaquita)

1. Material necesario.

- Cultivo de una bacteria en fase de esporulación
 - Portaobjetos limpios y desengrasados.
 - Solución acuosa de Verde de Malaquita (5 % en agua)
 - Solución de Safranina al 0.25% en agua
2. Técnica (Método de Wirtz, modificación del método de Couklin).
- Preparar una extensión seca y fijada por calor
 - Cubrir las extensiones con la solución de Verde de Malaquita, y calentar hasta emisión de vapores durante 10 minutos (cuidar que la preparación no se deseque y que no hierva, evitar crepitaciones).
 - Lavar con agua abundante
 - Contrastar con safranina durante 15 segundos
 - Lavar y secar
3. Observación
- Examinar al microscopio con objetivo de inmersión (100x) depositando una pequeña gota de aceite de inmersión sobre la preparación teñida.

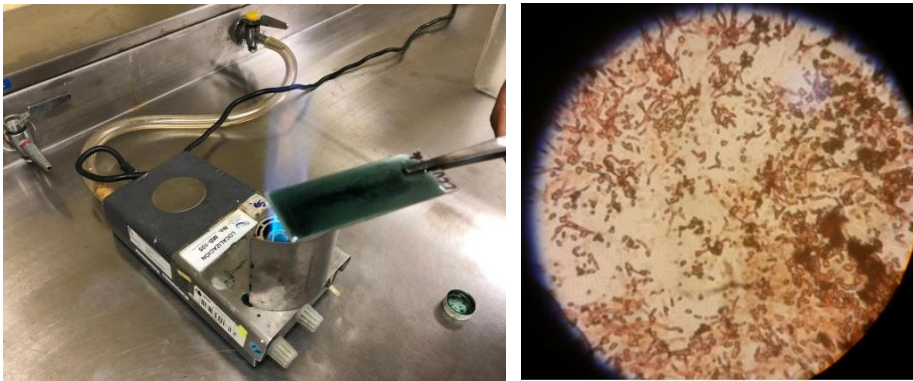


Figura 4.6. Tinción de Wirtz-Conklin (izq.) y vista al microscopio (der.) (100x)

4.7. Agares para el cultivo de bacterias provenientes del inóculo

Para el cultivo de de bacterias del inóculo, se usaron dos tipos de agares: Agar base sangre y agar base sangre + sangre humana (Figura 4.7)

El agar base sangre se preparó de la siguiente manera:

En un matraz Erlen Meyer se agregó 1 L de agua destilada, posteriormente se agregó el polvo de agar base sangre, agitando continuamente para disolver el contenido agregado. El otro agar se preparó con agar base sangre y se le agregó sangre humana: se utilizó para cultivar las bacterias de la fuente pre-tratada que generó un mayor poder de esporulación (en este caso el LGA).

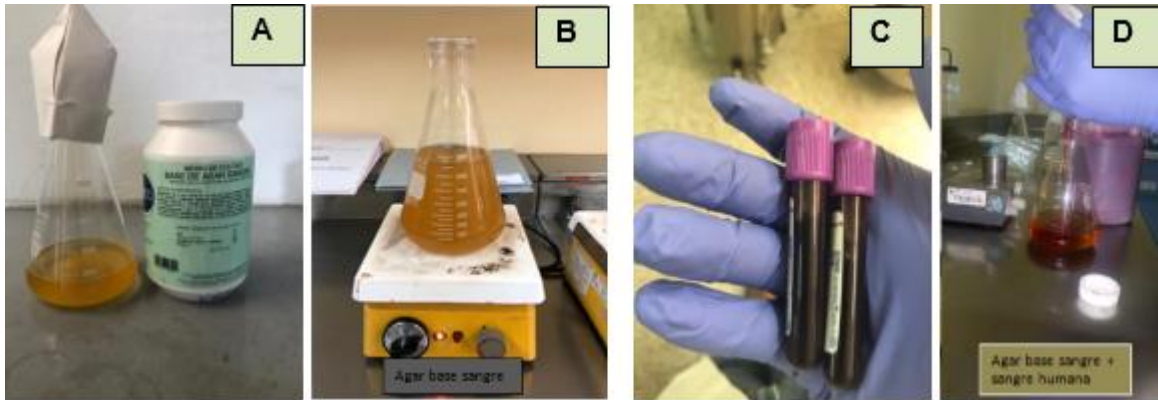


Figura 4.7. Preparación de los agares. A) Polvo de agar, B) agar base sangre, C) muestras de sangre humana, D) agar base sangre +sangre humana

4.7.1. Esterilización de los agares

Una vez disuelto el polvo de agar en el agua destilada se procedió a su esterilización en un autoclave a una temperatura de 121 °C y una presión de 21 psi (Figura 4.8) durante 15 minutos, al término de los cuales, se introdujo en un baño maría a 47 °C, para que se enfriara paulatinamente.



Figura 4.8. Autoclave para esterilización a alta presión.

4.8. Diluciones para el cultivo bacteriano utilizadas

Se utilizaron 5 diferentes diluciones preparadas según la siguiente Tabla 4.1, Figuras 4.9 y 4.10:

Tabla 4.1. Diluciones usadas para el cultivo bacteriano en agar.

No. de dilución	Preparación	Concentración
1	1 mL de muestra original + 9mL agua de dilución	1×10^{-1}
2	1 mL de muestra dilución 1 + 9mL agua de dilución	1×10^{-2}

3	1 mL de muestra dilución 2 + 9 mL agua de dilución	1×10^{-3}
4	1 mL de muestra dilución 3 + 9 mL agua de dilución	1×10^{-4}
5	1 mL de muestra dilución 4 + 9 mL agua de dilución	1×10^{-5}

Fórmula de Agua de dilución: Peptona 1 g, cloruro de sodio 8.5 g, Agua destilada 1L.



Figura 4.9. Preparación del agua de dilución.



Figura 4.10. Preparación de las diluciones.

4.9. Sembrado de los agares (sembrado por dilución)

Los sembrados se realizaron agregando primero 1 mL de muestra en el centro de la caja Petri y a continuación se agregó la solución de agar aún caliente (aproximadamente 37 °C), de tal manera que se cubriera con una capa homogénea todo el fondo de la caja Petri (Figura 4.11):

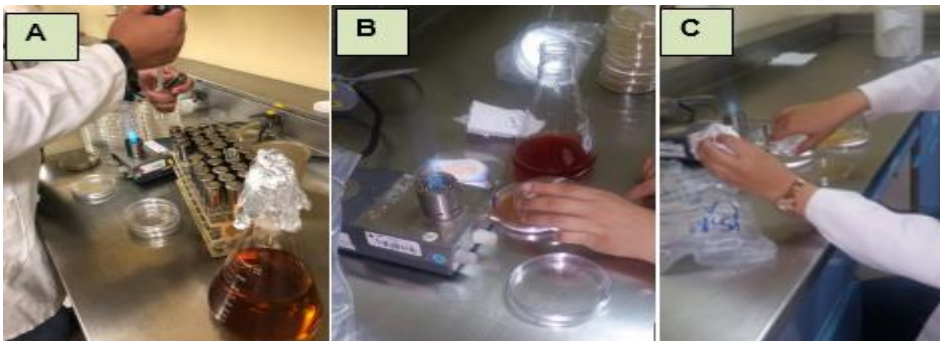


Figura 4.11. Sembrado de agares: A) agregado del inóculo, B) agregado del agar base sangre + sangre humana, C) agregado del agar base sangre.

4.10. Incubación de los agares inoculados con las fuentes ambientales pretratadas

Una vez que los agares solidificaron (Figura 4.12), se colocaron en la incubadora a 37 °C para obtener el crecimiento bacteriano a 72 horas, en condiciones anaerobias, para ello se usó una cámara sin oxígeno (anaerobiosis) (Figura 4.13):



Figura 4.12. Agares solidificados listos para su incubación.



Figura 4.13. Cámara de anaerobiosis (Agares en incubación a 37 °C)

4.11. Poder de esporulación de los tres diferentes inóculos estudiados.

El inóculo que generó el mayor poder de esporulación fue el lodo granular anaerobio (LGA), ya que de las 10 cajas Petri sembradas, la esporulación se desarrolló incluso en la 3^a dilución, es decir, que aún con una dilución de 1×10^{-3} , el LGA genera una gran esporulación. Total de cajas Petri esporuladas=50%. Por lo que respecta al rumen de vaca, generó la esporulación incluso hasta la segunda dilución de 1×10^{-2} , con 4 cajas Petri esporuladas, es decir, un 40%. Por último, el estiércol de vaca, es el inóculo con menor poder de esporulación, ya que solo generó esporulación en la primera dilución, con solamente dos cajas Petri, es decir un 20% del total de cajas sembradas. Tales comportamientos, se pueden apreciar en las siguientes Figuras 4.14, 4.15, 4.16, y 4.17:

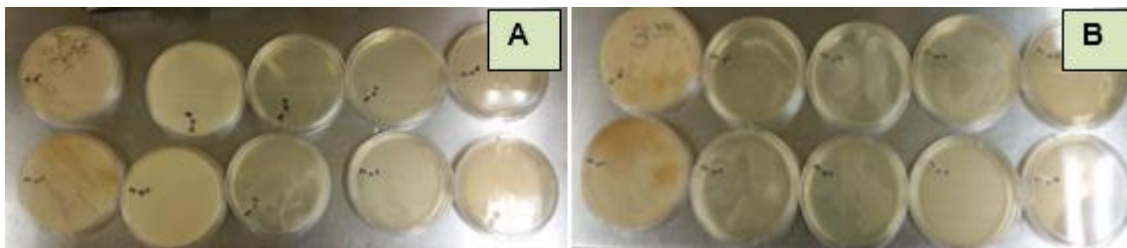


Figura 4.14. Crecimiento bacteriano de a) Estiércol de vaca, b) Rumen de vaca.

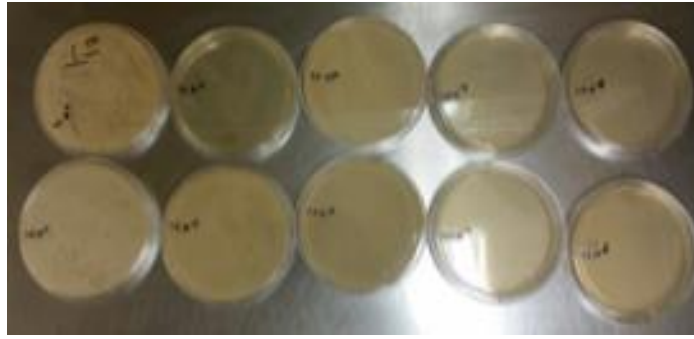


Figura 4.15. Crecimiento bacteriano de LGA

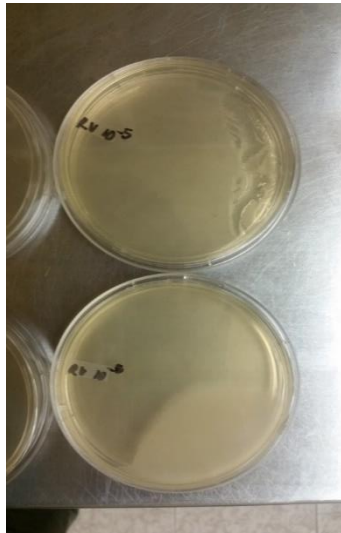


Figura 4.16. Cajas Petri sin crecimiento bacteriano.



Figura 4.17. Cajas Petri con gran crecimiento bacteriano.

4.12. Tinción Gram vista al microscopio

Las observaciones en el microscopio de las muestras teñidas con el colorante safranina, dieron positivas para bacterias Gram+ en su gran mayoría, solo una minoría resultaron Gram-, como se puede observar en la siguiente Figura 4.18 y Figura 4.19:

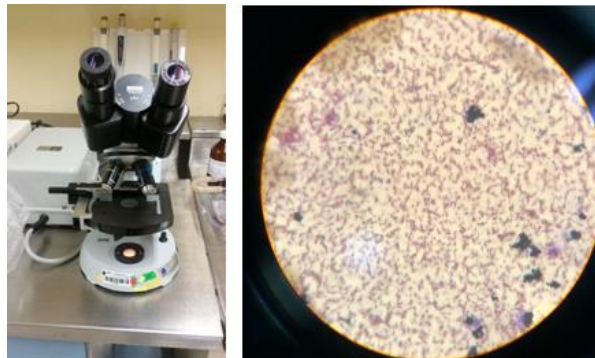


Figura 4.18. Observación al microscopio de bacterias del LGA (mayoría Gram+) (40x).

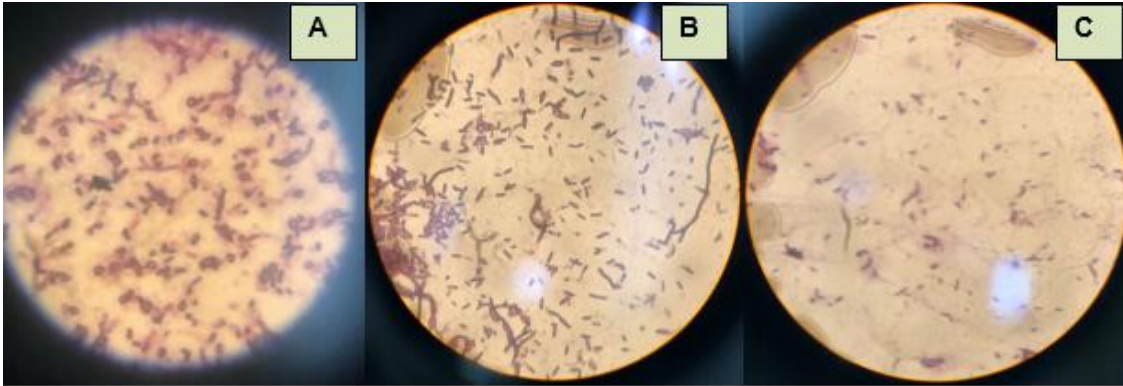


Figura 4.19. Bacterias con Tinción Gram, A) LGA, B) estiércol de vaca, C) rumen de vaca. 100x.

4.13. Técnica Wirtz-Conklin vista al microscopio

La identificación de las bacterias esporulantes se realizó mediante la técnica de Wirtz-Conklin y su posterior vista en el microscopio como se puede observar en Figura 4.20 y Figura 4.21.

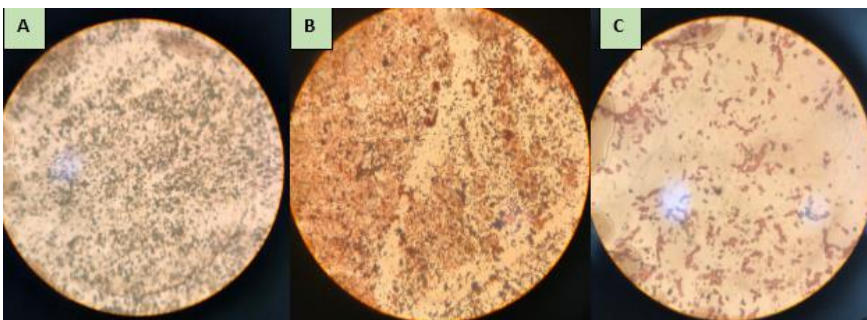


Figura 4.20. Bacterias Tinción de esporas: A) LGA, B) rumen de vaca C) estiércol de vaca. 40x.

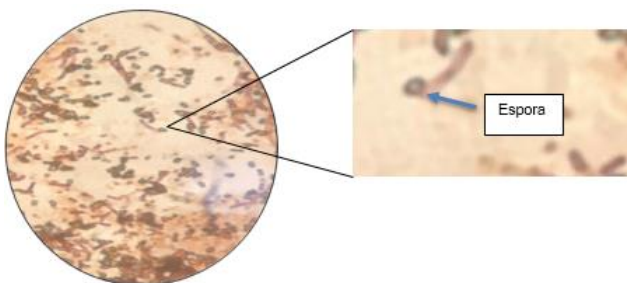
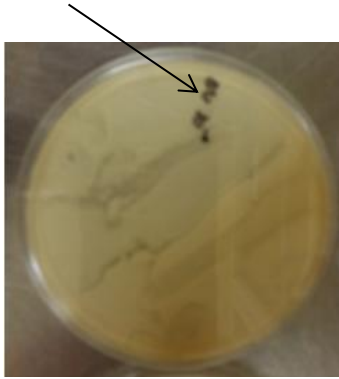


Figura 4.21. Lodo granular anaerobio, tinción de esporas con verde de malaquita. 100x.

4.14. Aislamiento e identificación bacteriana

4.14.1. Aislamiento bacteriano para purificar la colonia



Para el 1er. aislamiento bacteriano, se tomó un frotis de la zona con mayor crecimiento bacteriano, que fue la de color perla (Figura 4.22). El objetivo de este aislamiento se realizó para obtener un cultivo lo más puro posible, y así identificar el tipo de bacteria que dio un mayor crecimiento, para su análisis mediante PCR (Figura 4.23, Figura 4.24, Figura 4.25 y Figura 4.26).

Figura 4.22. Primer aislamiento bacteriano a partir de la muestra de LGA con mayor crecimiento



Figura 4.23. Crecimiento bacteriano del primer aislamiento (obsérvese que aún no se obtiene una colonia aislada)



Figura 4.24. Crecimiento bacteriano del Aislamiento (Frotis tomado del 1er.



Figura 4.25. Crecimiento bacteriano del 3er. aislamiento. (frotis tomado del 2º. Aislamiento)

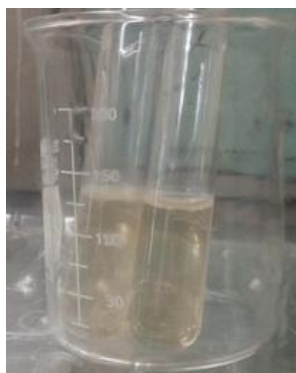


Figura 4.26. Crecimiento bacteriano en el 4° aislamiento para su identificación mediante técnica de PCR

4.14.2. Identificación del género bacteriano de las bacterias predominantes.

A partir de cultivos bacterianos puros, se amplificaron los aislamientos de interés en caldo nutritivo, incubando a 30°C por 24 horas. Posteriormente, se extrajo del DNA genómico de cada uno de ellos utilizando el kit **Wizard Genomic DNA Purification kit (Promega, Cat. A1125)**, de acuerdo con las indicaciones del fabricante. Posteriormente, se amplificó el gen 16S utilizando los oligonucleótidos fD1 (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') y rP2 (5'-ACGGCTACCTTGTTACGACTT-3') (Weisburg et al., 1991). Se utilizó el reactivo **PCR Master Mix 2X (K0171, ThermoFisher Scientific)** empleando un volumen de reacción de 50 µl. El programa de PCR consistió en una etapa inicial de desnaturalización a 94°C por 2 min, una etapa de desnaturalización consistente en 35 ciclos, cada uno consistiendo en 15 s a 94°C, 15 s a 59°C, y 1 min 30 s a 72°C, con una etapa de elongación final a 72°C por 5 min. Para evaluar la obtención del amplicón deseado, el producto de la reacción de PCR se sometió a una electroforesis en un gel de agarosa al 1% (90V/60 min) teñido con bromuro de etidio, usando un marcador de peso molecular como referencia (**ThermoFisher Scientific SM1373, ladder 2**). Finalmente, se utilizó el kit **DNA Clean and Concentrator-5 (Zymo Research, United States)**, para purificar el producto de PCR, el cual se cuantificó y se envió al Instituto de Biotecnología de la UNAM (Cuernavaca, México) para secuenciarse por el método de Sanger. Las secuencias obtenidas se analizaron con el software Chromas (<http://technelysium.com.au/wp/chromas/>). Las secuencias en formato fasta se sometieron a una análisis de similitud utilizando la herramienta BLAST (Altschul et al., 1990) para determinar el género de los microorganismos.

4.15. Análisis del ADN en la muestra de cultivo bacteriano aislado

El análisis realizado a las muestras para verificar la diversidad microbiana con el uso de los genes de ARNr 16s indicaron la presencia de especies procariotas pertenecientes a los género *Bacillus* y *Anoxybacillus* para ambas muestras. Los resultados de la identificación bacteriana se reportan en la siguiente Tabla 4.2, el estudio se realizó a dos muestras, identificadas como Muestra 1 y Muestra 2:

Tabla 4.2. Identificación de los géneros y especies bacterianas encontrados en el Lodo granular anaerobio, después de recibir un pretratamiento térmico y cultivado en agar sangre.

Electroferograma	Calidad	Género(s) Bacterianos	Especie(s) con la(s) que presenta mayor similitud
20052.R1 Muestra 1	Adecuada, se resuelven 794 bases	<i>Bacillus</i> <i>Anoxybacillus</i>	<i>Bacillus paralicheniformis</i> <i>Bacillus licheniformis</i> <i>Bacillus sonorensis</i> <i>Bacillus haynesii</i> <i>Bacillus glycinifermentans</i> <i>Anoxybacillus</i> sp.
20053.R2 Muestra 2	Adecuada, se resuelven 884 bases	<i>Bacillus</i>	<i>Bacillus licheniformis</i> <i>Bacillus paralicheniformis</i> <i>Bacillus sonorensis</i> <i>Bacillus haynesii</i> <i>Bacillus glycinifermentans</i> <i>Bacillus aerius</i>

4.16. Conclusiones del inóculo

El pre-tratamiento térmico que se le realizó a las tres fuentes ambientales (LGA, RV y EV), eliminó casi en su totalidad a las bacterias metanogénicas, permaneciendo las bacterias productoras de hidrógeno, que son las que liberan esporas, después de morir, cuando son sometidas a factores de estrés ambientales.

De las tres fuentes ambientales estudiadas, se concluye que el lodo granular anaerobio (LGA), es el que posee el mayor poder de esporulación, debido a que aún a diluciones del orden de 1×10^{-3} continúa en esporulación, lo que indica que contiene gran cantidad de bacterias productoras de hidrógeno.

La tinción Gram realizada al lodo granular anaerobio (LGA) ayudó a determinar que la mayoría de las bacterias presentes en el lodo son Gram positivas en forma de bacilos. El rumen de vaca posee una cantidad mediana de bacterias productoras de hidrógeno, con respecto al LGA. De igual forma, el estiércol de vaca tiene poca capacidad de esporulación; en el caso de que sea usado como inóculo, deberá de agregarse directamente de la fuente original, es decir, sin realizársele ninguna dilución.

Capítulo 5. Producción de hidrógeno en una MEC con un agua residual sintética

5.1 Resultados y discusión

5.2. Producción de biohidrógeno y remoción de la DQO en la MEC usando diferentes materiales y configuraciones de los electrodos

Las producciones acumuladas de biohidrógeno y HPR obtenidas de las MEC mostraron que la MEC1, MEC2, MEC3 y MEC4 generaron las producciones de biohidrógeno más altas en comparación con las otras MEC (Figura 5.1). Se utilizó el modelo de Gompertz modificado para determinar el comportamiento cinético de la producción de biohidrógeno en la MEC y los datos se analizaron con el software Statistica 7.0. Los valores de lambda (λ) indicaron que las producciones de biohidrógeno fueron lentas en los primeros días debido al alto contenido de materia orgánica generando un período de adaptación de los microorganismos a las aguas residuales de alta concentración. Los valores del modelo de Gompertz modificado se pueden encontrar en la Tabla 1A. La producción máxima de biohidrógeno se produjo el día 22 de funcionamiento, aunque los experimentos se realizaron durante 27 días. El HPR máximo fue de $314 \text{ m}^3 \text{ H}_2/\text{m}^3_{\text{R.d}}$ para la MEC1 (M2-M1), mientras que el HPR mínimo generado fue de $1.0 \text{ m}^3 \text{ H}_2/\text{m}^3_{\text{R.d}}$, que corresponde a la MEC11 (GF-GF) (Fig. 5.1b). El SS plano y el SS304 plisado utilizados como cátodo y ánodo fueron los mejores electrodos durante la producción de biohidrógeno. Sin embargo, el electrodo de Cu/Ni utilizado como cátodo (MEC 2 y MEC 3) mostró altas actividades electrocatalíticas en HPR, obteniendo valores altos en comparación con los otros MEC. La combinación de diferentes materiales de electrodos y la distancia entre los mismos, influyó en la producción de biohidrógeno en las MEC. El área del electrodo también fue un factor importante en la producción de biohidrógeno. Las mayores producciones de biohidrógeno se observaron cuando el área del ánodo era mayor que el área del cátodo (8.5 cm^2 frente a 4.25 cm^2). La forma “plisada” del electrodo M2 fue un factor muy importante durante la producción de biohidrógeno ya que ayudó a aumentar el área superficial del ánodo y los espacios disponibles para la fijación de bacterias electroactivas (EAB) conteniendo las mismas dimensiones geométricas que los otros materiales de electrodos, mejorando el transporte de electrones y reduciendo el sobrepotencial en la MEC. Los HPR máximos obtenidos en este trabajo superaron de 6 a 300 veces las producciones de biohidrógeno obtenidas en diferentes MEC alimentados con diferentes aguas residuales de alta concentración (hidrosilato, suero de queso, aguas residuales sintéticas, efluentes de molino de aceite de palma, aguas residuales de azúcar, aguas residuales de cervecería, aguas residuales de yuca, aguas residuales de licuefacción hidrotermal, aguas residuales de efluentes de fermentación y aguas residuales de molinos de arroz) que contenían DQOs por encima de 1000 mg/L y probaron diferentes materiales de electrodos (Ni, Ni-Co y Ni-Co-P electrodepositados en la superficie de SS316, Cu rod, Cu barra, Cu-Ni-Mo, Cu-Ni-Fe-Mo, aleación de Co-Mo, grafito, papel carbón-Ni, carbón-Ni-Co, carbón-Co, SS316 barra, SS-Ni, Ni-Co-P como recubrimiento en SS316 y Cu, (Keruthiga, *et al.*, 2021; Chaurasia, *et al.*, 2022; Jeremiase, *et al.*, 2011; Feng, *et al.*, 2018; Qyyum, *et al.*, 2022; Fudge, *et al.*, 2021; Muddasar, *et al.*, 2022; Gupta, *et al.*, 2015; Jayabalan, *et al.*, 2021). El HPR obtenido en el reactor FO fue de 0.25 m^3 de $\text{H}_2/\text{m}^3_{\text{R.d}}$, lo que demuestra que las producciones de biohidrógeno en las MEC fueron mayores que en el reactor FO durante el tratamiento de aguas residuales de alta concentración. Esta gran diferencia entre la MEC y FO se debe a la combinación de los metabolismos microbianos de

las bacterias productoras de hidrógeno y la reacción bioelectroquímica de los electrodos que superan las barreras termodinámicas para la producción de hidrógeno en el proceso de fermentación anaerobia (Chandrasekhar, *et al.*, 2021). Las eficiencias de eliminación de DQO en los experimentos variaron entre 5 y 79 % (Figura 5.1c). La máxima remoción de DQO la generó la MEC1 (M2-M1) con una DQO consumida (Δ DQO) de 14.1 g/L. Los valores mínimos de eliminación de DQO (inferiores al 6 %) fueron generados por la MEC 10, MEC 11 y el reactor de FO. Estas bajas remociones estaban relacionadas con el bajo HPR obtenido en estos reactores. Se encontró una relación significativa entre la remoción de DQO y HPR. Como se puede observar en la Figura 5.1b y c, las altas remociones de DQO obtenidas en la MEC1, MEC2, MEC3 y MEC4 están relacionadas con un alto HPR. Se observó que un alto consumo de materia orgánica en las MECs alimentadas con aguas residuales de alta concentración mostraron una alta producción de biohidrógeno. Se observó una mayor actividad bacteriana en las MEC debido a la gran cantidad de materia orgánica consumida, lo que contribuyó a la producción de biohidrógeno. De acuerdo a esto, se observó que el biofilm se adhirió a los electrodos (bioánodo y biocátodo), influyendo también en la remoción de la DQO. Existen diferentes estudios que demuestran la capacidad de la MEC para eliminar materia orgánica. Se han obtenido remociones de DQO en un rango de 25 a 97% en las MECs alimentadas con aguas residuales con alto contenido de materia orgánica (Keruthiga, *et al.*, 2021; Chaurasia, *et al.*, 2022; Jeremiasse, *et al.*, 2011). La eficiencia de eliminación de DQO en las MECs es variable y es difícil hacer una comparación, ya que dependen de varios factores, como la carga orgánica, el tipo de celda (de una o dos cámaras), el modo por lotes o continuo, el tipo de agua residual, el tipo de materiales de los electrodos, el pH y el tipo de inóculo. La alta conductividad eléctrica de las aguas residuales de alta concentración no afectó las actividades de los microorganismos durante la degradación de la materia orgánica ya que los VFAs generados en los reactores son los principales metabolitos de la degradación anaeróbica de la materia orgánica (Figura 5.2). La alta conductividad eléctrica en las aguas residuales favorece la electrosíntesis microbiana y mejora la migración de electrones y protones al cátodo para la producción de biohidrógeno y electricidad y, por lo tanto, también reduce el sobrepotencial del cátodo en los BES (Satar, *et al.*, 2020; Gul, *et al.*, 2021). Este comportamiento se observó principalmente en la MEC1 a la MEC7. En el caso de la MEC8 a la MEC11, la conductividad eléctrica no fue un factor limitante, ya que se determinó que la disposición de los electrodos, el tipo de material de los electrodos y las distancias de los electrodos afectaban la HER y el sobrepotencial, más para cuando las MECs trabajaban con ánodos y cátodos del mismo material, por ejemplo, M1-M1 (MEC10) y GF-GF (MEC11). La resistividad eléctrica de los materiales jugó un papel muy importante en la producción de biohidrógeno ya que el valor más bajo de HPR se obtuvo con los electrodos GF-GF cuya resistividad eléctrica es mucho mayor, en comparación con los otros materiales ($2.7 \times 10^{-3} \Omega \cdot m$ GF > $0.072 \times 10^{-6} \Omega \cdot m$ SS > $1.72 \times 10^{-8} \Omega \cdot m$ Cu > $6.99 \times 10^{-8} \Omega \cdot m$ Ni > $9.71 \times 10^{-8} \Omega \cdot m$ Fe).

De acuerdo con los resultados obtenidos en este trabajo, se demostró claramente que el proceso de electrofermentación (EF) realizado en las diferentes MEC alimentadas con aguas residuales de alta concentración, mostró una mayor producción de biohidrógeno y remoción de DQO, en comparación con el reactor de FO convencional. El concepto de electrofermentación se refiere a la interacción de electrodos y microorganismos donde se integran el metabolismo microbiano con reacciones electroquímicas para llevar a cabo todas las reacciones redox electroquímicas para superar las barreras termodinámicas durante la producción de biohidrógeno en el proceso de fermentación anaeróbica (Chandrasekhar, *et*

al., 2021). La alta producción de biohidrógeno obtenida en este trabajo se debió a las altas concentraciones de DQO disponible para las bacterias. También se debió a la alta conductividad del electrolito y la producción de protones, electrones y VFAs generados por las EAB adheridas al ánodo (bioánodo), la producción de biohidrógeno generada por bacterias productoras de hidrógeno suspendidas en el electrolito y el hidrógeno generado a través de la HER en el cátodo. Las MECs en este estudio se operaron en una sola cámara sin ninguna membrana utilizada como separador entre el ánodo y el cátodo (MEC de una sola cámara sin membrana). Por lo tanto, los cátodos funcionaban como biocátodos ya que estaban sumergidos en el inóculo para que las bacterias adheridas a la superficie del electrodo catódico sirvieran como biocatalizadores y maximizaran la producción de biohidrógeno. Rozendal *et al.*, 2008, Jeremiasse *et al.*, 2010 y Yuan y He, 2017, reportaron que la HER puede ser catalizada por microorganismos (cultivo puro o cultivo mixto) adheridos al cátodo (biocátodo) para la producción de hidrógeno en la MEC y que puede ser una alternativa viable para aumentar la HPR y reducir los sobrepotenciales. Se ha propuesto que la HER es catalizada por hidrogenasa principalmente por la actividad catalítica de NiFe-hidrogenasas y proteínas involucradas en la transferencia extracelular de electrones (Jeremiasse, *et al.*, 2010)

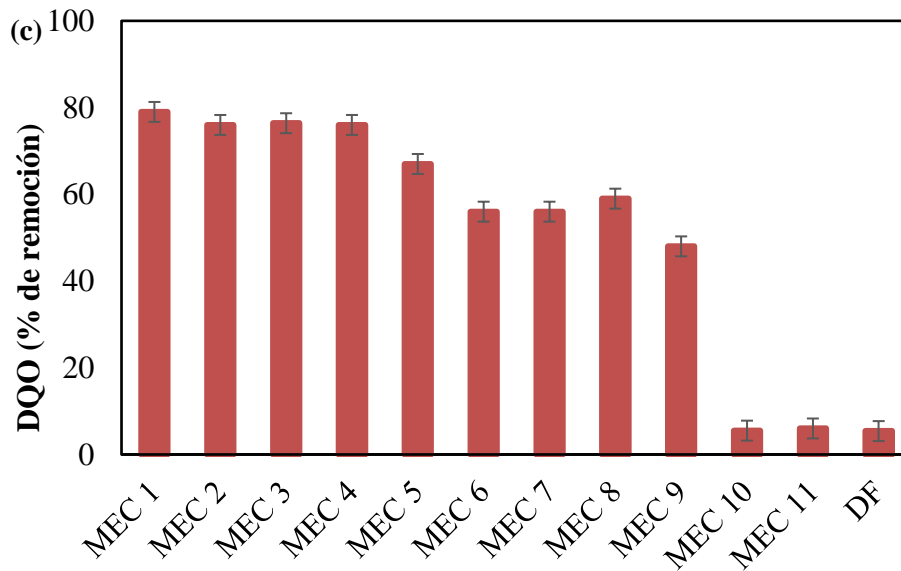
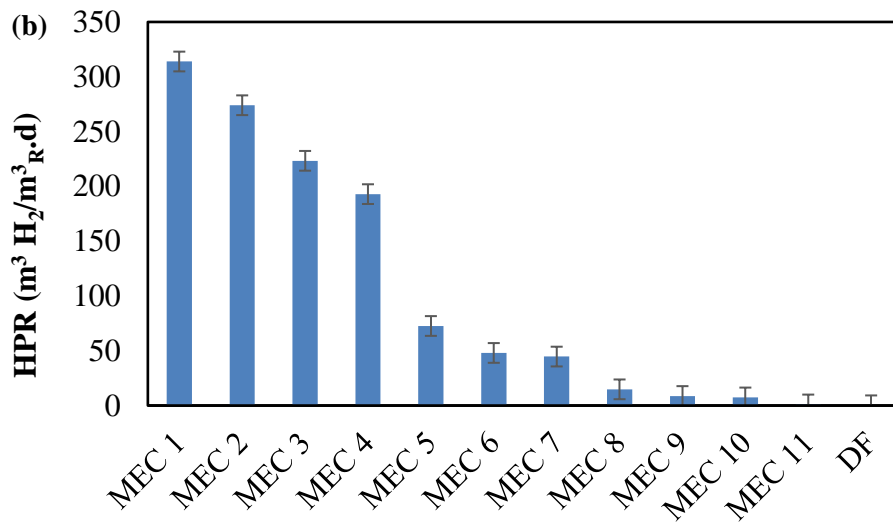
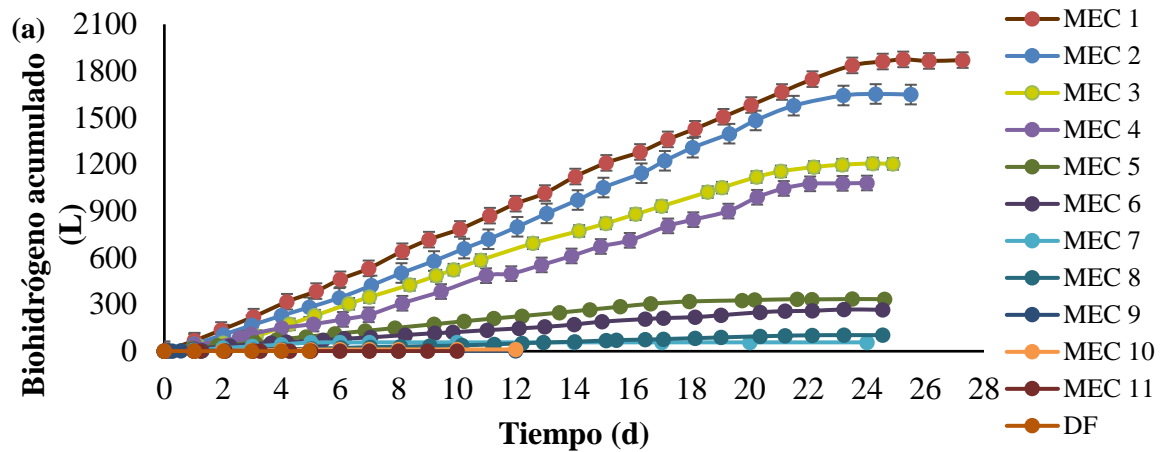


Figura 5.1. Producción de biohidrógeno en una MEC usando diferentes configuraciones de electrodos. a) producción de H_2 acum, b) HPR y c) remoción de DQO

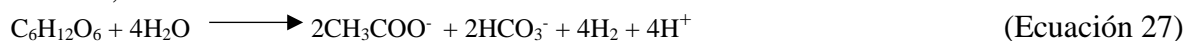
Las bacterias electroactivas unidas al cátodo en una MEC son responsables de catalizar la reducción de protones a biohidrógeno. Jafary *et al.*, 2017, mostraron que la resistencia a la transferencia de carga catódica en un biocátodo MEC se redujo 300 veces y que la producción de biohidrógeno aumentó 6 veces, en comparación con una MEC de cátodo sin biopelícula.

5.3. Producción de VFAs y contenido de biogás.

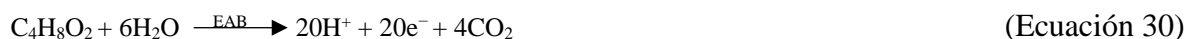
Los VFAs generados en la fermentación anaeróbica o por el proceso EF pueden servir como sustrato ideal para las bacterias electroactivas. El proceso EF genera una mayor cantidad de biohidrógeno con respecto a la fermentación oscura. También permite la metabolización de VFAs entre otros metabolitos generados en la fermentación oscura por la producción de biohidrógeno (Gupta, *et al.*, 2015; Zhi, *et al.*, 2019). Por lo tanto, la presencia o ausencia de VFAs en el efluente de una MEC, luego de la EF, mostrará el grado de conversión de la materia orgánica en biohidrógeno. La Figura 5.2a) muestra la generación de VFAs en una MEC. Como puede verse, la MEC7 y MEC11, que tenían ánodos y cátodos de fieltro de grafito, fueron los únicos MEC donde se encontraron altas concentraciones de VFAs. El principal VFA que se detectó en ambas MEC, fue el ácido acético con concentraciones de 2294-2378 mg/L. Para la MEC7 se encontró ácido butírico con una baja concentración de 47 mg/L. Para las MECs que trabajaron con electrodos metálicos o con un arreglo de electrodo metálico y electrodo de carbón, no se detectaron VFAs, lo que indica que los subproductos generados por el proceso EF posiblemente se transformaron en biohidrógeno. Las aguas residuales sintéticas compuestas de pepticasa, extracto de carne y extracto de levadura, que eran los principales sustratos orgánicos, fueron transformadas en VFAs, biohidrógeno, dióxido de carbono, electrones y protones por *Paralicheniformis*, *Licheniformis*, *Sonorensis*, *Haynesii*, *Glycinifermentans* y *Anoxybacillus*. El biohidrógeno generado en las MECs se generó por cuatro vías: 1) por la acción de bacterias productoras de hidrógeno (Ecuaciones 27, 29 y 31); 2) por la acción de las EABs adheridas al ánodo (bioánodo) (Ecuaciones 28, 30 y 32); 3) por las HER en los materiales del cátodo que recibieron protones y electrones liberados de reacciones electroquímicas (Ecuación 33) y por la FO (Ecuación 27); 4) por la reducción de protones realizada por las EABs unidas al cátodo (biocátodo) (Ecuación 34 y Ecuación 35).

Reacción anódica:

Acetato;



Butirato;



Propionato;



Reacción catódica;

Reacción de evolución de hidrógeno (HER)



Reacción de evolución de hidrógeno (HER)



Estos resultados demuestran una mejor actividad electrocatalítica de los electrodos metálicos en comparación con los electrodos carbonosos y una mejor actividad metabólica de EAB. Asimismo, los resultados muestran que en todas las MECs, el ácido acético fue el principal subproducto de la degradación de la materia orgánica. La producción de biohidrógeno siguió la ruta del ácido acético, que fue fácilmente oxidado por las bacterias de respiración anódica (Yang, *et al.*, 2015). La presencia de VFAs en la MEC7 y MEC11, indica que cuando se utilizan electrodos de grafito simultáneamente en el ánodo y el cátodo, independientemente de la distancia entre los electrodos, se reduce la actividad de los exoelectrónos para oxidarlos, de modo que la transferencia de electrones y las actividades electrocatalíticas del ánodo y el cátodo (reducción de protones) se ven afectados negativamente, lo que influye en las condiciones termodinámicas de la MEC, reduciendo la HER en el cátodo y generando menores acumulaciones de HPR y mayor de VFAs en las MECs. La acumulación de VFAs indica una transformación parcial en biohidrógeno de estos subproductos. Los HPRs obtenidos para estas dos MECs fueron menores a 45 m^3 de $\text{H}_2/\text{m}^3_{\text{R.d}}$, en comparación con los obtenidos por las MECs que utilizaron electrodos metálicos o electrodo metálico-electrodo carbónico, que fueron de 73 a $314 \text{ m}^3 \text{ H}_2/\text{m}^3_{\text{R.d}}$. En el reactor de FO se encontraron ácido acético y ácido propiónico con una concentración de 1.845 y 490 mg/L, respectivamente. La presencia de ácido propiónico en la fermentación oscura puede afectar la tasa de utilización del sustrato en la conversión de biohidrógeno, por lo que la HPR se ve afectada negativamente (Yang, *et al.*, 2015). Este comportamiento se observó en el reactor de FO. El contenido de hidrógeno y dióxido de carbono (CO_2) en el biogás estuvo en el rango de 93-99% y 1-7%, respectivamente (Figura 5.2b). No se detectó metano en el biogás. Esto se debió a que en el inóculo pretratado no se encontraron metanógenos, lo que ayudó a aumentar el contenido de hidrógeno en el biogás. Podría suponerse que los homoacetógenos utilizaron materia orgánica para producir principalmente ácido acético. Se determinó un bajo contenido de CO_2 en el biogás en todas las MEC, lo que demuestra que el CO_2 se redujo casi por completo en compuestos multicarbonados (principalmente ácido acético) con electrones donados desde el ánodo que sirvió como donante de electrones para la reducción de CO_2 en el cátodo (Christodoulou, *et al.*, 2017). Esta reacción es muy importante ya que ayudó a obtener una alta producción de biohidrógeno en las MEC, principalmente cuando se utilizaron electrodos metálicos. La producción de acetato desde la reducción de CO_2 en un BES, puede realizarse mediante dos mecanismos: a) bioelectroquímico (Ecuaciones 35, 36 y 37), y b) reducción electrocatalítica del hidrógeno a través de un mecanismo mediado por el hidrógeno (Ecuación 38) (Batle-Vilanova, *et al.*, 2016). En este estudio, los dos mecanismos que posiblemente se llevaron a cabo en el CO_2 .

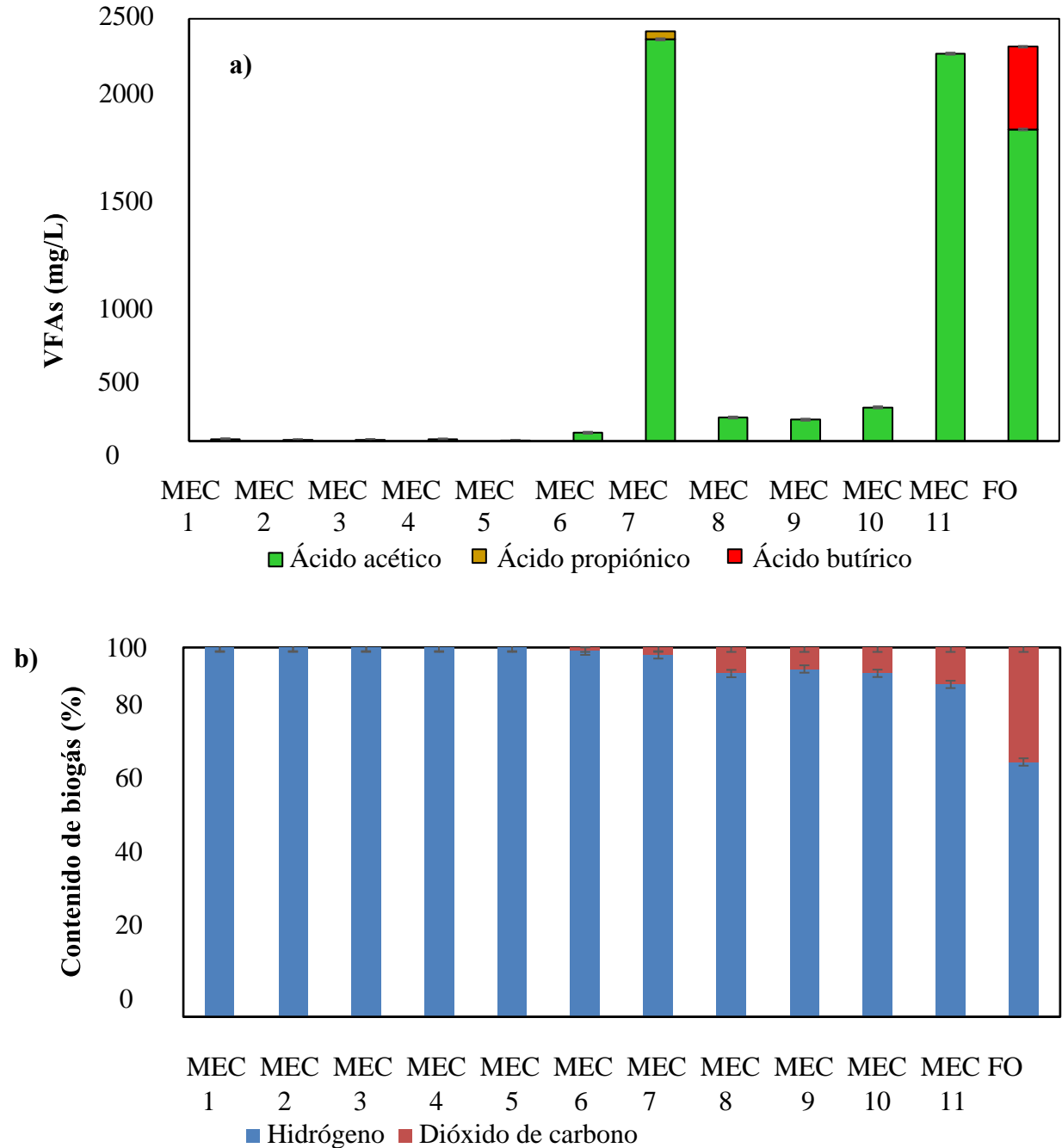
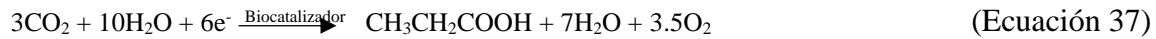
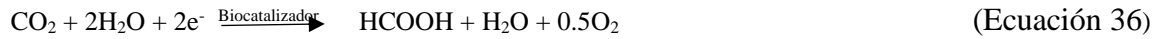
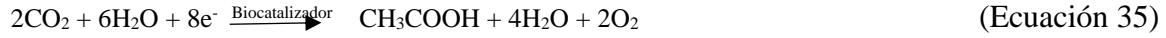


Figura 5. 2. Generación de VFAs (a) y contenido de biogás (b) durante el tratamiento de un agua residual de alta concentración en una MEC usando diferentes electrodos y diferentes configuraciones.

5.4. Recuperación de energía

Las recuperaciones de energía en una MEC de una sola cámara y sin membrana, durante el tratamiento de aguas residuales de alta concentración usando diferentes electrodos, se evaluaron mediante varios parámetros, como CE, η_{E+S} , r_{cat} y r_{H_2} (Tabla 5.2). Las eficiencias coulombicas en las MECs 1 a 10 estuvieron entre 9 y 36%. Para la MEC11, que utilizó fieltro de grafito como ánodo y cátodo a una distancia de electrodo de 2 cm, se determinó una alta eficiencia coulombica (44 %) en comparación con las otras MEC. Esta alta eficiencia coulombica observada en la MEC11 resultó en una baja recuperación de biohidrógeno catódico (4%), baja recuperación de energía general (1%) y una baja recuperación global de biohidrógeno (2%), por lo que se obtuvo un HPR bajo ($1.0 \text{ m}^3 \text{ H}_2/\text{m}^3 \text{ R.d}$). Esto significa que los electrones liberados durante la degradación de la materia orgánica no fueron totalmente transportados al biocátodo debido al bajo HER, el alto sobrepotencial y la resistividad eléctrica de los electrodos de fieltro de grafito. Para la MEC9, que usó electrodos metálicos, las recuperaciones de energía y biohidrógeno y la eficiencia coulombica fueron menores. Esto significa que, aunque la remoción de DQO fue considerablemente alta (48%), la generación de electrones liberados por la EAB posiblemente fue baja, por lo que una menor cantidad de electrones migró al ánodo. Para MEC1, MEC2, MEC3 y MEC4, las recuperaciones catódicas de biohidrógeno fueron superiores al 891 % con eficiencias coulombicas de entre 18 y 23 %. Estos valores relativamente bajos de eficiencias coulombicas indicaron que la producción de biohidrógeno a través de vías bioelectrocatalíticas fue parcial. Los valores máximos de η_{E+S} , r_{cat} y r_{H_2} se observaron en la MEC1. Las recuperaciones de hidrógeno catódico más altas observadas en estas MECs dieron como resultado recuperaciones de hidrógeno total más altas (>205 %), recuperaciones de energía total más altas (>159 %) y HPR más altas (>193 $\text{m}^3 \text{ H}_2/\text{m}^3 \text{ R.d}$). Las altas eficiencias energéticas obtenidas en este estudio hacen que la energía del biohidrógeno recuperada sea superior a la tensión de entrada (0.8 V). Según Tang *et al.*, 2022, la alta eficiencia energética en una MEC se debe a una entrada de bajo voltaje que aumenta la HER con una baja pérdida de sobrepotencial utilizando cátodos basados en Ni. Las altas eficiencias energéticas obtenidas en el presente estudio se asociaron con las reacciones bioelectroquímicas generadas en el biocátodo de las MECs. Un estudio realizado por Dai *et al.*, 2019 sobre la producción de biohidrógeno utilizando biocátodos en una MEC de una sola cámara, informaron que la eficiencia energética, la densidad de corriente, la recuperación de hidrógeno, la recuperación catódica de hidrógeno y la HPR utilizando biocátodos de papel carbón operados a un voltaje de 0.7 V de entrada, fueron ligeramente más altos que en la MEC de cámara única con un cátodo de C/Pt. Se determinó que existe una relación directa entre la producción de biohidrógeno y la recuperación de energía en todas las MEC. No existe una relación directa entre las eficiencias coulombicas y las recuperaciones de energía durante la producción de biohidrógeno. Esto significa que las actividades metabólicas de las EAB y las bacterias productoras de hidrógeno fueron diferentes en las MEC durante el tratamiento de aguas residuales con gran contenido de materia orgánica. La producción de biohidrógeno a lo largo del tiempo (Δt) varió como se puede ver en el gráfico de biohidrógeno acumulado (Figura 5.1a), generando diferentes η_{CE} y corrientes eléctricas debido a las variaciones de HER, sobrepotenciales de los materiales de los electrodos, disposición de los electrodos y distancia de los electrodos. Asimismo, los altos valores de η_{E+S} y r_{H_2} se relacionaron con el alto consumo de materia orgánica. Por otro lado, valores de r_{H_2} superiores al 100% indican que la producción de biohidrógeno estuvo relacionada con el mayor número de moles de

biohidrógeno producidos en las MEC1, MEC2, MEC3 y MEC4 por las diferentes vías de producción de biohidrógeno (bacterias productoras de hidrógeno, EAB en el bioánodo, HER en el cátodo y EAB en el biocátodo). La Tabla 5.3 muestra una comparación de los resultados obtenidos en este estudio con los reportados en la literatura. Se puede observar que HPR, r_{cat} y r_{H_2} fueron significativamente más altos que los reportados en la literatura. Shen *et al.*, 2016 trataron aguas residuales de alta concentración provenientes de un líquido hidrotermal con una DQO inicial de 44.94 g/L para la producción de biohidrógeno mediante una MEC de doble cámara de lecho fijo y de flujo ascendente utilizando nanotubos de carbono como ánodo y fieltro de carbono como cátodo. Estos autores obtuvieron una remoción de DQO del 80% con HPR de $0.003 \text{ m}^3 \text{ H}_2/\text{m}^3 \text{ R.d}$ y una CE de 7% los cuales fueron menores debido a la mala reacción catódica generada por los electrodos de carbón y por la complejidad de las aguas residuales. La MEC de doble cámara se ha utilizado para tratar aguas residuales de azúcar utilizando electrodos de carbono como ánodos y materiales o aleaciones a base de metales no preciosos (NiO.rGO, CO_3O_4 .rGO, Nifoam/NiMoO₄, Ni-Co, SS316 dopado con Ni-Co-P usados como cátodos. Se obtuvieron recuperaciones de energía del 21 al 84 % y eficiencias culómbicas del 45 al 65 % con una eliminación máxima de DQO y HPR del 57 % y $0.24 \text{ m}^3 \text{ H}_2/\text{m}^3 \text{ R.d}$ respectivamente (Chaurasia, *et a.*, 2022; Jayabalan, *et a.*, 2020; Jayabalan, *et al.*, 2021). Se han utilizado diferentes tipos de aguas residuales de alta concentración como sustrato en una MEC para la producción de biohidrógeno, obteniendo recuperaciones energéticas entre el 23 y el 471%, densidades de corriente entre 1.3 y 500 A/m² y eficiencias culómbicas que van del 7 al 98% (Jeremiasse, *et al.*, 2011; Feng, *et al.*, 2018; Qyyum, *et al.*, 2022; Fudge, *et al.*, 2021; Muddasar, *et al.*, 2022; Gupta, *et al.*, 2015; Jayabalan, *et al.*, 2021; Shen, *et al.*, 2016). Como se mencionó anteriormente, los valores de recuperación de energía, eficiencia culómbica y densidad de corriente, dependen del voltaje de entrada aplicado a la MEC, el tipo de MEC, el tipo de aguas residuales, los materiales de los electrodos, el pH y la comunidad microbiana, por lo que es difícil hacer una comparación con otras investigaciones. Se ha observado que los estudios realizados en MECs que tratan aguas residuales de alta concentración para la producción de biohidrógeno, utilizan principalmente celdas de doble cámara, electrodos de carbón como ánodos y electrodos metálicos como cátodos generando baja reacción HPR y HER. En este estudio se obtuvieron altas recuperaciones de energía, HPRs y HERs en MECs monocámara utilizando acero inoxidable 304 malla plana 60 y barra de Cu/Ni como electrodos.

5.5. Potenciales de inicio de la HER y tasa de producción de amperaje

Según Zhang *et al.*, 2010 y Jafary *et al.*, 2017, el V_h fue determinado por la pendiente en la curva LSV. El mejor desempeño de una MEC en términos de HER se logró cuando se observó un potencial de inicio de HER bajo y un V_h alto. El rendimiento de las MECs más efectivo fue en la MEC1 y MEC2, que lograron altas actividades electrocatalíticas como se muestra en la Figura 5.3a. Para la MEC10 y MEC11, se observó un alto sobrepotencial. Estos resultados confirman claramente los altos HPR obtenidos en las MEC1 y MEC2, debido a un bajo sobrepotencial y menores HPR observados para MEC10 y MEC11, debido a una generación de corriente significativamente menor (alto sobrepotencial). Para MEC1 y MEC2, los valores de potencial de inicio de la HER fueron -0.6 y 0.63 V, respectivamente, los cuales fueron bajos en comparación con los demás MEC obteniendo un valor de V_h de 12.97 mA/V para MEC 1 y un valor de V_h de 29.01 mA/V para MEC 2. Para las MEC que generaron las producciones de biohidrógeno más bajas en comparación con los otros MEC, se obtuvieron

valores altos de potencial de inicio de HER (-0.79 v) y valores bajos de Vh (menor que 0.95 mA/V).

5.6. Valores de la Ecuación de Gompertz obtenidos en las diferentes MECs

Tabla 5. 1. La ecuación de Gompertz se usó para calcular los valores de máxima velocidad de producción de H₂ (R_{max}), máxima producción de H₂ (H_{máx}) y duración de la fase lag (λ) para todas las MECs.

# de MEC	Electrodos anode-cath	H _{máx} (L)	R _{max} (L/min)	λ (h)	R ²
MEC1	M2-M1	2367.74	0.10	11.17	99.70
MEC2	M2-Cu/Ni	2121.82	0.11	11.62	99.74
MEC3	FG-Cu/Ni	1413.76	0.13	9.95	99.74
MEC4	FG-M1	1556.85	0.10	13.02	99.69
MEC5	M1-Fe	378.45	0.15	7.45	99.66
MEC6	M1-Cu/Ni	336.18	0.11	9.95	99.74
MEC7	FG-FG*	263.43	0.52	2.73	99.20
MEC8	FG-Fe	140.99	0.11	12.27	99.80
MEC10	FG-FG**	17.64	0.51	2.78	99.60
MEC9	M2-Fe	3.71	6.82	0.19	99.23
MEC11	M1-M1	0.74	2.22	0.61	99.50

*separación entre electrodos de 4 cm

**separación entre electrodos de 2 cm

Tabla 5.2. Resumen de las eficiencias energéticas de las MECs para diferentes materiales y configuraciones de los electrodos durante el tratamiento de aguas residuales de alta concentración

MEC	Electrodos (ánodo-cátodo)	Distancia electrodos (cm)	DQO Remoción (%)	η_{E+S} (%) (OER)	r_{cat} (%)	r_{H_2} (%)	CE (%)	Densidad de corriente (A/m ²)	HPR (m ³ H ₂ /m ³ R.d)
MEC 1	M2-M1	4	79 ±4	319 ±13	1785 ±57	340 ±8	19 ±3	91 ±5	314 ±17
MEC 2	M2-Cu/Ni	2	76 ±3	298 ±14	1676 ±60	302 ±5	18 ±2	183 ±3	274 ±15
MEC 3	GF-Cu/Ni	2	76 ±3	178 ±10	991 ±45	225 ±5	23 ±2	226 ±4	223 ±18
MEC 4	GF-M1	2	76 ±2	159 ±8	891 ±38	205 ±7	23 ±2	25 ±2	193 ±14
MEC 5	M1-Fe	2	67 ±1	159 ±8	204 ±24	70 ±5	34 ±3	56 ±2	73 ±10
MEC 6	M1-Cu/Ni	4	56 ±2	40 ±4	223 ±27	67 ±4	30 ±2	323 ±6	48 ±8
MEC 7	GF-GF	4	56 ±3	31 ±4	170 ±20	15 ±2	9 ±2	17 ±1	45 ±8
MEC 8	GF-Fe	4	59 ±3	13 ±2	71 ±14	25 ±3	36 ±2	280 ±5	15 ±4
MEC 9	M2-Fe	2	48 ±2	2 ±0.5	11 ±3	1.0 ±0.2	10 ±1	20 ±2	9 ±3
MEC 10	M1-M1	2	6 ±1	52 ±6	30 ±10	3 ±0.4	10 ±1	13 ±1	7.4 ±1
MEC 11	GF-GF	2	6 ±1	1 ±0.02	4 ±1	2 ±0.2	44 ±3	0.1 ±0.03	1 ±0.3
DF reactor	-	-	5 ±2	-	-	-	-	-	0.25 ±0.1

Tabla 5.3. Comportamiento de las MECs durante el tratamiento de un agua residual de alta concentración

# de cámaras	Ánodo-Cátodo	Sustrato	Voltaje (V)	Distancia entre electrodos (cm)	DQO Inicial (g/L)	DQO remoción (%)	pH	T (°C)	HPR (m ³ H ₂ /m ³ r.d)	Densidad de corriente (A/m ²)	η_{E+S} (%)	r_{cat} (%)	CE (%)	Referencia
2	Grafito fieltro-Cu/Ni, Ni-Mo	Agua sintética	0.5	-	1	-	6	30	50	25	-	-	-	Jeremiasse, 2011
1	Grafito-SS malla	AR Hydrosilate	0.7	2.5	8.2	29	5	Room	0.4	-	74	58	88	Gupta, 2015
2	Carbon fieltro-Carbon paper/Ni	Agua sintética	0.9	-	6	71	7	30	2.6	3	-	-	50	Carrera, 2013
2	Cnanotubos-C fieltro	aguas hidrotermales licuadas	0.6-1.4	-	44,940	60-80	7	25	0.003	-	106 (η_E)	-	7	Shen, 2016
1	Grafito fieltro-SS304 malla 60	Lactosuero	-	4	1.6-19.9	24-26	7	32	0.06-0.16	1.3-1.5	9.5-20.8	263.7	31.8-92.7	Rivera, 2017
1	SS316L-Pt/Ti malla	Agua sintética	1	3.5	1.56	49-91	-	30	7.72	10.9	69	95.8	64-116	Feng, 2018
1	Grafito fieltro-C tela	AR/Aceite de palma	0.2-0.9	-	66	(9-49)	6.5	55	4.43	-	89-471	-	-	Khongkhiang, 2019
2	Grafito- NiO.rGO and Co ₃ O ₄ .rGO	AR azúcar	1	-	4.4	57	7	Room	0.1	1.2	-	21	65.6	Jayabalan, 2020
1	Grafito-C tela/Pt	Agua sintética	0.8	3	0.7-1.4	-	11	30	0.32	9.2	48	-	-	Cui, 2021
2	Grafito-Ni/NiMoO ₄	AR azúcar	1	-	4.2	54	4.5	Room	0.12	81	11.96	-	58.2	Jayabalan, 2021
2	Grafito- SS316/Ni-Co	AR azúcar	0.6	-	4.85	45-50	7	30	0.24	3-4.4	-	64-84	45-62	Chaurasia, 2022
1	Grafito plano-Ni espuma	AR/Aceite de palma	1.1	2.5	20.2	-	6.6	30.2	0.77-1.17	-	-	-	-	Kadier, 2022
2	C tela -C tela	AR/molienda arroz	-	-	17.9	76.8	4-7	-	0.086	-	-	-	-	Keruthiga, 2021
1	SS304 malla 60 plisada-SS304 malla 60 plana	Agua sintética	0.8	4	18	79	5.1	25	314	91	319	1785	19	Este trabajo
1	SS304 malla 60 plisada-Cu/Ni barra	Agua sintética	0.8	2	18	76	5.1	25	274	183	298	1676	18	Este trabajo
1	Grafito fieltro-Cu/Ni barra	Agua sintética	0.8	2	18	76	5.1	25	223	226	178	991	23	Este trabajo
1	Grafito fieltro-SS304 malla 60 plana	Agua sintética	0.8	2	18	76	5.1	25	193	25	159	891	23	Este trabajo

AR.-agua residual

Para determinar las actividades electrocatalíticas de los materiales de los electrodos en las MEC durante la producción de biohidrógeno, se realizaron pruebas de LSV en condiciones abióticas (Figura 5.3b). Se observó una mejora de los valores de V_h superiores al 100% en las MEC con actividad microbiana (bióticas), en comparación con las MEC abióticas, lo que demuestra que el EAB adherido a electrodos de ánodo y cátodo (bioánodos y biocátodos) mejora la HER al obtener una alta producción de biohidrógeno y un buen rendimiento de la MEC. Se determinó un potencial de inicio de HER de -1.26 V en un cátodo de fieltro de grafito no inoculado de MEC de doble cámara durante la producción de biohidrógeno, luego, cuando se inoculó el cátodo de fieltro de grafito con bacterias reductoras de sulfato (biocátodo), el potencial de inicio de HER disminuyó a solo -1.16 V. Se observó una disminución significativa en el potencial de inicio de HER en la MEC del biocátodo cuando el pH de la solución electrolítica de la cámara catódica se redujo hasta 4, obteniendo un potencial de inicio de HER de -0.83 V (Jafary, *et al.*, 2017). Los resultados de esta investigación fueron similares a los trabajos presentados cuando la MEC trabajaba con electrodos de grafito. Sin embargo, cuando se utilizaron biocátodos de SS o Cu/Ni, nuestros resultados mostraron un aumento en HER en comparación con el cátodo de fieltro de grafito con biofilm adherido (Jafary, *et al.*, 2017). Esta diferencia se debió a la alta resistencia del fieltro de grafito en comparación con los electrodos de SS y Cu/Ni, el tipo de MEC, el pH y la comunidad microbiana utilizada. La HER resultante de usar diferentes cátodos de malla SS304 fue examinado por Zhang *et al.*, 2010 en una MEC para la producción de biohidrógeno, el potencial mínimo necesario para iniciar la corriente de producción fue similar para los diferentes cátodos de malla, con valores de potencial de inicio de HER en torno a -0.67 V, que fueron ligeramente superiores a los obtenidos en nuestro trabajo. El cátodo de malla tejida de SS #44 con un diámetro de alambre de 0.015 cm y un área de apertura de poro de 0.0025 cm², fue el cátodo más efectivo basado en valores de V_h más altos ($V_h = 81.48$ mA/V), mientras que para SS de malla expandida y SS plana los valores de V_h fueron 47.64 y 32.54 mA/V, respectivamente. En el presente trabajo, los valores de V_h estuvieron por debajo de 29 mA/V que fueron inferiores a los valores informados por Zhang *et al.*, 2010. Estos valores bajos se deben principalmente al alto contenido de materia orgánica de las aguas residuales sintéticas, lo que limita la HER en las MECs. Las tasas de producción mostraron que el electrodo de malla plana de acero inoxidable y el electrodo de Cu/Ni utilizados en este trabajo fueron los cátodos más efectivos para la producción de biohidrógeno en comparación con los electrodos de hierro y grafito durante el tratamiento de aguas residuales con alto contenido de materia orgánica. Las aleaciones como SS tienen un alto contenido de Ni que puede catalizar la HER de manera más eficiente. El níquel es un metal no precioso y económico con una actividad catalítica HER alta, como lo muestra el gráfico de energía libre de adsorción de hidrógeno. La energía libre de enlace de hidrógeno (ΔGH^*) del Ni es de alrededor de -0.26 eV, que es ligeramente negativa (Yuan, *et al.*, 2017). Este ΔGH^* indica un catalizador HER eficaz para la producción de biohidrógeno en una MEC, por lo que se absorbe un protón en el sitio activo de Ni. La malla plana de SS304 y la barra de Cu/Ni utilizadas en este trabajo tienen un contenido de Ni de 8-10.5% y 0.0108 g/m² respectivamente. Se ha demostrado que los electrodos de SS que tienen un área de superficie específica alta, aumentan la reacción HER, generando altas eficiencias catódicas y HPR en una MEC (Zhang, *et al.*, 2010). Por estas razones, en este estudio se lograron HPR y

recuperaciones de energía más altas cuando se utilizaron como ánodo malla plisada plana de SS304 y como cátodo SS304 malla plana y barra de Cu/Ni. Las bajas densidades de corriente obtenidas para los experimentos bióticos MEC9, MEC10 y MEC11 se asociaron con el bajo HPR (Figura 5.1 y Figura 5.4). Para las MEC que utilizan los mismos materiales de electrodos tanto en el ánodo como en el cátodo (M1-M1 y GF-GF), se obtuvieron densidades de corriente entre 0.13 y 13 A/m² demostrando así la importancia de hacer arreglos con diferentes materiales de electrodos en una MEC sin membrana y de una sola cámara, con el objetivo de mejorar la HER para aumentar la producción de biohidrógeno. En cambio, para altas producciones de biohidrógeno obtenidas en los experimentos bióticos MEC1, MEC2, MEC3 y MEC4, las densidades de corriente fueron relativamente altas con valores de 91, 183, 226 y 25 A/m², respectivamente. Las densidades de corriente en las MEC abióticas estuvieron en el rango de 0.01 a 652 A/m², mostrando diferencias en el transporte de electrones. Este comportamiento confirma la importancia de las propiedades químicas y físicas de los materiales de los electrodos utilizados como ánodo y cátodo, y las distancias de los electrodos para producir biohidrógeno en una MEC. La HER catalizada por el biocátodo de la MEC varía según la comunidad microbiana. *Geobacter sulfurreducens*, *Desulfovibrio spp.*, *Desulfovibrio paquesii*, *Desulfovibrio caledoniensis*, bacterias sulfatoredutoras, cultivo enriquecido con *Desulfitobacterium* sin mediador, *Acetobacterium*, *Clostridium* y *Shewanella oneidensis* podrían aceptar electrones del biocátodo de la MEC para catalizar la HER (Jafary, *et al.*, 2017; Yuan, *et al.*, 2017). En el presente estudio se observó que el consorcio inoculado en las MEC (*Paralicheniformis*, *Licheniformis*, *Sonorensis*, *Haynesii*, *Glycinifermentans* y *Anoxybacillus*) jugó un papel importante en la catálisis de HER durante la producción de biohidrógeno.

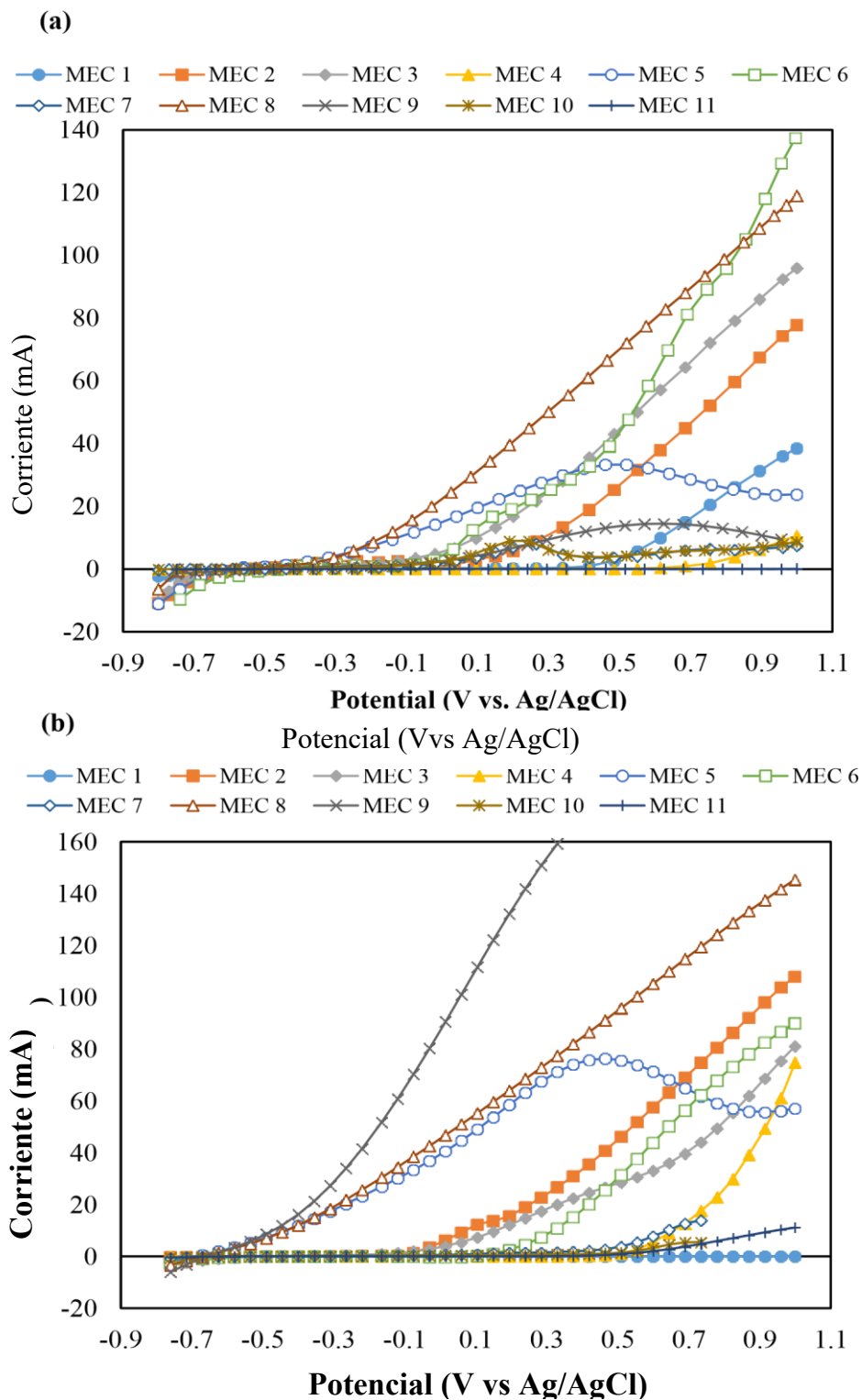


Figura 5. 3. Voltametrías de barrido lineal para MECs bióticas (a) y MECs abióticas (b).

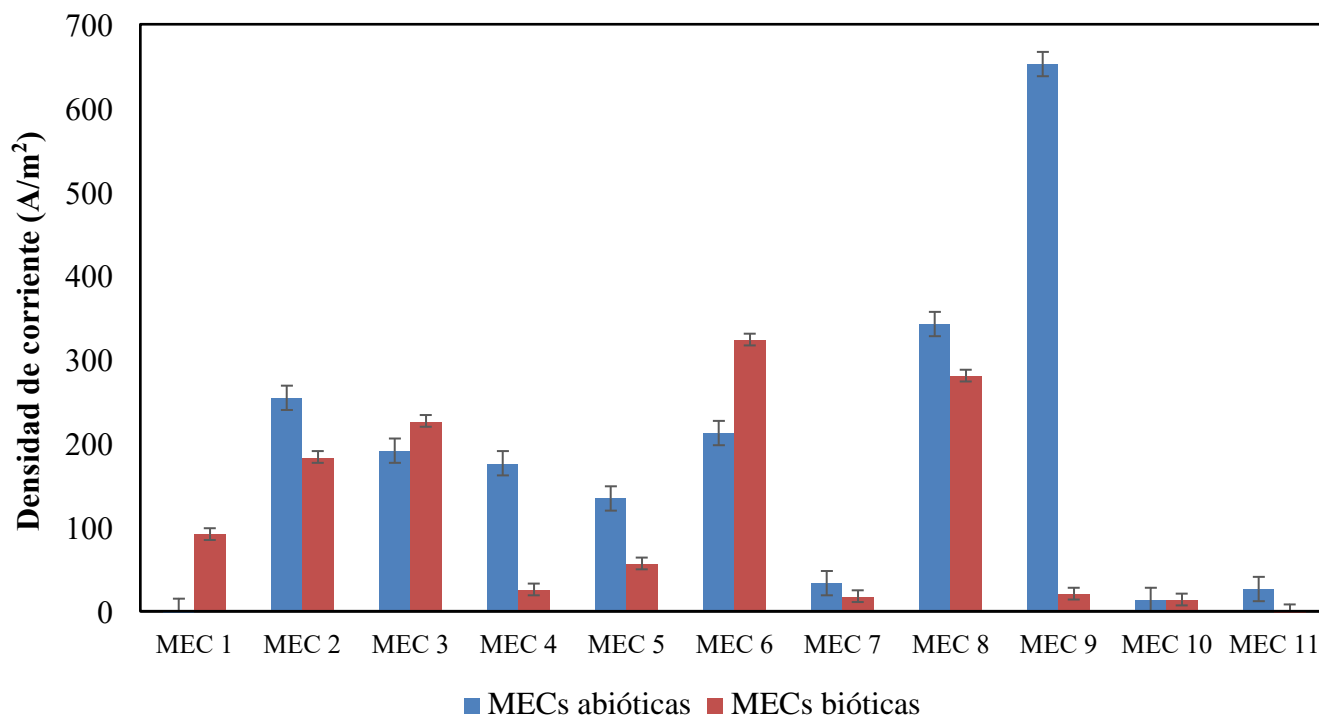


Figura 5. 4. Producción de densidad de corriente en las MECs durante el tratamiento de un agua residual de alta concentración

5.7. Espectroscopia de impedancia electroquímica.

La Figura 5.5 muestra el análisis EIS en las MEC abióticas y bióticas. Los valores de resistencia óhmica se extrajeron de las gráficas de Nyquist obtenidas de las pruebas EIS. Las mayores resistencias observadas durante el tratamiento de aguas residuales se dieron en las MEC abióticas, indicando un mayor sobrepotencial en los electrodos de material sin biopelícula. Los valores máximos de resistencia obtenidos en las MEC abióticos fueron 4107, 3332, 2766 y 3240 Ω correspondientes a la MEC5, MEC9, MEC11 y MEC6, respectivamente (Figura 5.5a). Para la MEC7, MEC8 y MEC10 los valores fueron entre 39 y 99 Ω mostrando una cinética de HER más rápida, en comparación con las otras MECs abióticas. Sin embargo, a pesar de que las resistencias obtenidas en estas MECs abióticas fueron bajas, estas resistencias fueron hasta cuatro veces mayores que las observadas en las MEC bióticas. La migración iónica entre la interfaz y los sitios activos internos de los cátodos (resistencia a la transferencia de carga catódica) se retrasó, como lo muestra la baja pendiente que presentaron las curvas antes de la transferencia de carga, especialmente en los abióticos MEC10 y MEC7, lo que reduce la HER (Jayabalan, *et al.*, 2020). Las MEC bióticas presentaron resistencias menores a 847 Ω , las cuales fueron significativamente menores, en comparación con las MEC abióticas (Figura 5.5b). Estos resultados concuerdan con los resultados obtenidos en el potencial de inicio y tasa de producción de HER, en los que se demostró que las MEC bióticas

generaron una mejor HER para la producción de biohidrógeno en comparación con las MEC abióticas. El fenómeno de migración iónica y transferencia de carga a los cátodos de MEC1, MEC2 y MEC3 fue significativamente rápido, como se observa en la Figura 5.5b, donde las pendientes son muy pronunciadas, especialmente en MEC1 y MEC2 con una pendiente menor en la MEC3. Las resistencias obtenidas de estas tres MEC fueron entre 14 y 33 Ω . Las tres MEC bióticas anteriores generaron las mayores producciones de biohidrógeno, lo que demuestra la alta actividad electrocatalítica de los cátodos SS304 malla 60 y Cu/Ni frente a los cátodos de fieltro de grafito y barra de Fe. El EAB adherido a los electrodos del ánodo y el cátodo disminuyó significativamente las resistencias óhmicas de las MECs. Los resultados de EIS mostraron que la menor resistencia a la transferencia de carga catódica obtenida en las MEC bióticas se asoció con la actividad biocatódica, la conductividad del electrolito y la condición de pH ácido (Jafary, *et al.*, 2017).

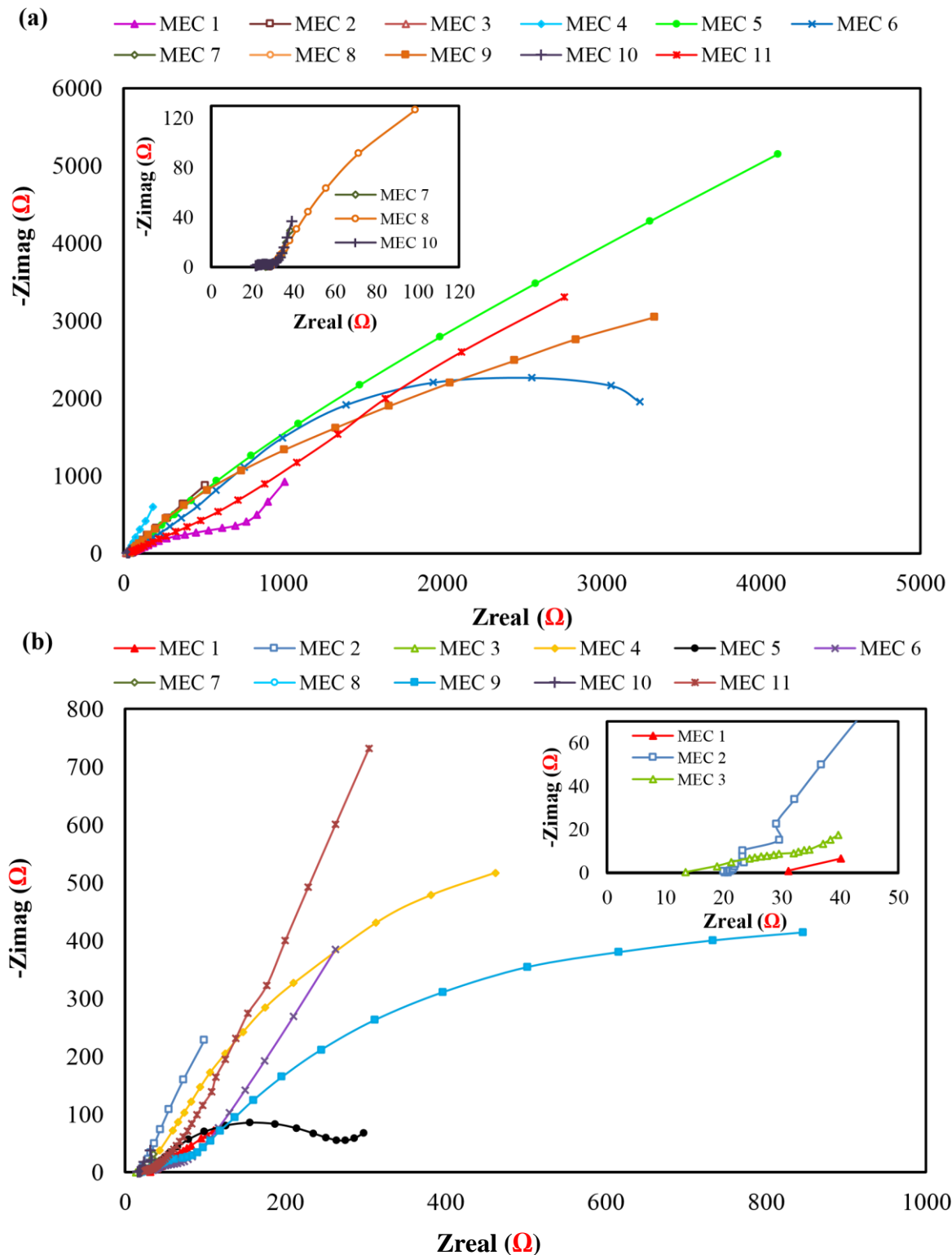


Figura 5. 5. Gráficos de Nyquist para la determinación de la resistencia de transferencia de carga catódica para: (a) MEC abióticos, y (b) MEC bióticos

5.8. Circuito de potencial abierto (OCP)

El análisis del OCP determina el voltaje producido en un BES o el potencial generado por una reacción redox durante la corrosión de materiales de electrodos sumergidos en una solución. La Figura 5.6 muestra los valores de OCP obtenidos durante el tratamiento de aguas residuales de alta concentración en condiciones bióticas y abióticas. Para el análisis de OCP, no se suministró voltaje externo en ninguna de las condiciones. Como se puede observar en la Figura 5.6a, en las pruebas bióticas se generaron valores de OCP que van de -0.031 a -0.385 V, lo que indica que se generó una diferencia de potencial en el reactor debido a la presencia de las EAB adheridas a ánodos y cátodos. Esto generó una cosecha de electrones y producción de protones en los ánodos, que migraron para su reducción a los cátodos de las MECs durante la degradación de la materia orgánica de las aguas residuales de alta concentración. Se observaron valores de OCP por debajo de -0.043 V en la MEC10 (SS304 plana-SS304 plana) y MEC11 (GF-GF 2 cm), lo que indica una menor actividad de EAB que corresponde a las bajas producciones de biohidrógeno obtenidas en este estudio. Para valores altos de OCP en pruebas bióticas (-0.3 a -0.38 V), se logró un HPR más alto. En estudios previos, los OCP para la mayoría de los bioánodos y biocátodos en las MECs alimentadas con aguas residuales sintéticas y reales se obtuvieron entre -0.33 y -0.76 V (Bajrachayra, *et al.*, 2016; Lim, *et al.*, 2020). Los valores de OCP para la combinación de materiales de electrodos GF-SS304 plano, barra de GF-Fe y barra de SS304 plano-Fe en las pruebas abióticas fueron más propensos a la corrosión y mostraron valores de OCP que oscilaron entre -0.53 V y -0.88 V (Figura 5.6b). Los valores de OCP más negativos mostraron una mayor tendencia a la corrosión del metal y los valores de OCP menos negativos indicaron una baja tendencia a la corrosión (Elsener, *et al.*, 2018). Para los electrodos GF-GF se obtuvo un OCP menor (-0.019 V). Los valores relativamente altos de OCP en las pruebas abióticas mostraron una producción potencial, debido a la corrosión de los materiales de los electrodos observada principalmente en los electrodos metálicos. Los componentes de aguas residuales de alta concentración utilizados en este estudio y el ambiente ácido del sistema generaron una tendencia a causar corrosión en los materiales de los electrodos. La combinación de metal con metal utilizado como ánodo y cátodo generó protección catódica de los electrodos, disminuyendo los fenómenos de corrosión de los materiales. Se observó que las biopelículas adheridas a los materiales de los electrodos sirven como protección para reducir los fenómenos de corrosión de los materiales y así alargar la vida útil de los electrodos. Por lo tanto, la producción de biohidrógeno obtenida en este estudio tendía a hacer que las reacciones bioelectroquímicas se derivaran principalmente de la acción de las AEB y las bacterias productoras de hidrógeno. De acuerdo con los resultados del análisis de OCP en las MEC, es importante seleccionar electrodos que generen valores de OCP relativamente altos, cuidando la tendencia a la corrosión. Los cátodos de malla SS utilizados en una MEC a un voltaje aplicado de 0.9 V no mostraron evidencia de corrosión después de 15 ciclos de operación (Zhang, *et al.*, 2010). En el presente estudio se observaron resultados similares.

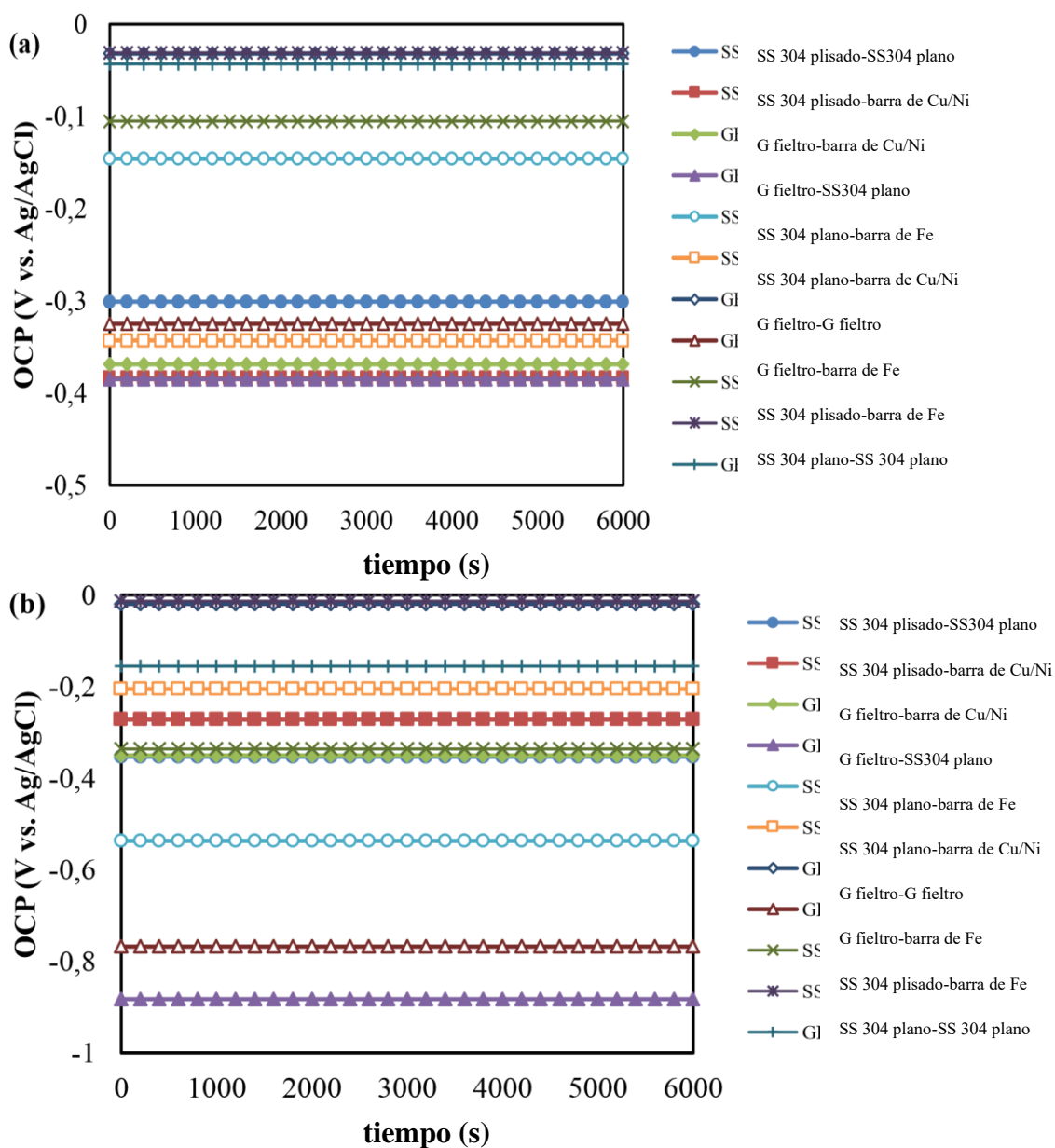


Figura 5. 6. Gráficos de OCP vs tiempo para análisis biótico (a), y abiótico (b) durante el tratamiento de un agua residual de alta concentración

5.9. Análisis de barrido electrónico (SEM)

La apariencia de la superficie del ánodo y el cátodo se determinó mediante SEM al final de la experimentación (Figura 5.7). El ánodo y el cátodo que mostraron el mejor desempeño durante la producción de biohidrógeno fueron la malla plisada #60 de SS304 y la barra de Cu/Ni, respectivamente. La Figura 5.7 (a) y (b) muestra la presencia de biopelícula desarrollada sobre la barra de Cu/Ni y las partículas esféricas de Ni, así como las grietas

generadas por el desgaste del electrodo durante la electrólisis. Las Figuras 5.7 (c), (d) y (e) muestran las bacterias electroactivas adheridas al ánodo de malla plisada #60 de SS304. Estas imágenes realizadas por SEM confirman que estos electrodos metálicos fueron colonizados por bacterias generando un aumento en la producción de biohidrógeno (principalmente en la MEC1 y MEC2), generando bajo sobrepotencial debido al bajo potencial de inicio de la HER y por lo tanto mejorando las reacciones de la HER en la MEC. La razón principal por la cual los sobrepotenciales fueron bajos en las MECs es que la biopelícula adherida a los electrodos aumenta las reacciones de transferencia de electrones y acelera la reducción de protones a biohidrógeno en el cátodo generando así altas actividades electrocatalíticas en las MEC.

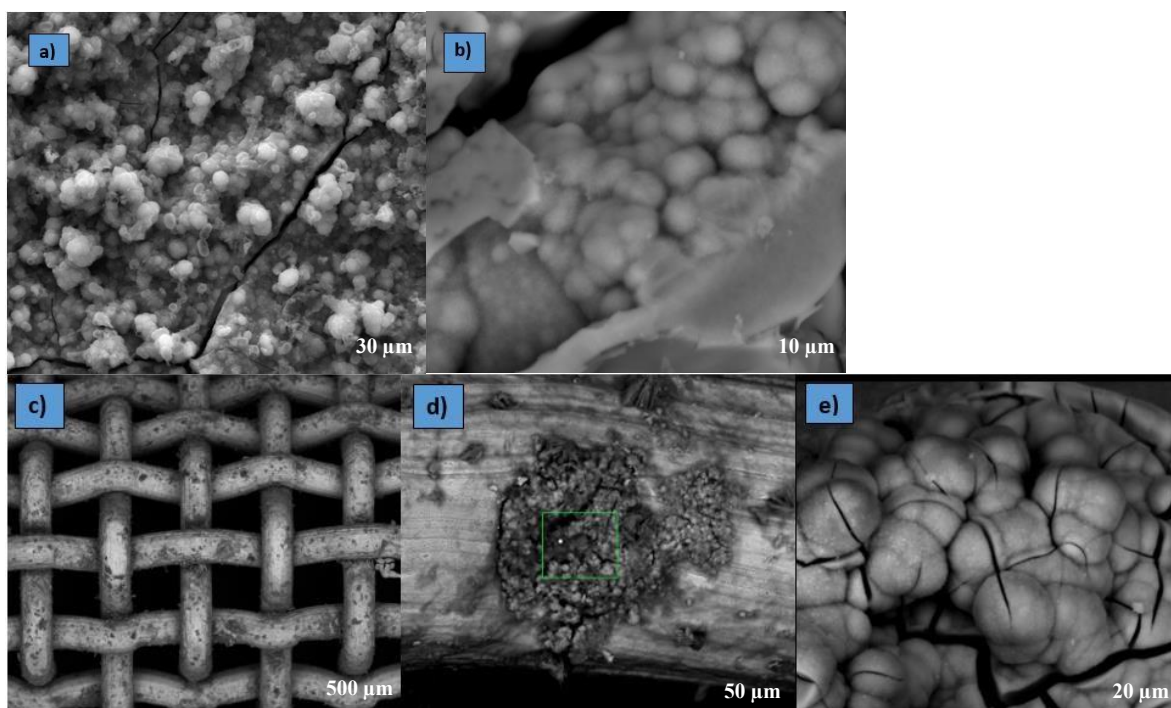


Figura 5. 7. Imágenes del SEM para el cátodo Cu/Ni (a, b) y el ánodo SS304 malla plisada #60 (c, d y e).

5.10. Conclusiones de la investigación con agua sintética a nivel laboratorio

Este estudio investigó la producción de biohidrógeno a partir de once combinaciones diferentes de materiales de electrodos en una MEC de una sola cámara y sin membrana, usando un agua residual de alta concentración y alta conductividad. Los mejores desempeños de las MEC fueron la MEC1 y MEC2, que contenían los electrodos metálicos de malla plisada SS304 #60 y barra de Cu/Ni. La forma “plisada” de SS304 malla #60 muestra una excelente superficie para el transporte de electrones durante la degradación de la materia

orgánica, disminuyendo las resistencias internas y los sobrepotenciales en la MEC. Estos materiales presentaron mejores actividades electrocatalíticas (bajo potencial de inicio de la HER y alta tasa de producción de corriente), en comparación con otros electrodos metálicos y de carbono. Se determinó que el área del electrodo, el tipo de material, la forma del electrodo (por ejemplo, plisado, barra, plano), las comunidades bacterianas, la distancia entre los electrodos y las configuraciones (combinaciones de electrodos), jugaron un papel importante en la mejora de la HER durante la producción de biohidrógeno en una MEC alimentada con aguas residuales de alta concentración. También se observó que las biopelículas adheridas tanto al ánodo como al cátodo (bioelectrodos) influyen en el rendimiento de MEC. En este estudio se obtuvo una producción de biohidrógeno de hasta 314 m³ de H₂/m³RD con altas recuperaciones de energía total (>319%) y una alta remoción de DQO. Finalmente, se demostró que el proceso de electrofermentación genera significativamente una mayor producción de biohidrógeno, en comparación con el proceso de fermentación oscura durante el tratamiento de aguas residuales de alta concentración.

5.11 Referencias

Bajracharya S, ElMekawy A, Srikanth S, Pant D. Cathodes for microbial fuel cells. K.Y. Scott, Hao Eileen (Eds.), *Microbial electrochemical and fuel cells*, Woodhead Publishing, Boston **2016** pp. 179-213.

Batlle-Vilanova P, Puig S, Gonzalez-Olmos R, Balaguer MD, Colprim J. Continuous acetate production through microbial electrosynthesis from CO₂ with microbial mixed culture. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **2016**, 91, 921-927. <https://doi.org/10.1002/jctb.4657>.

Chandrasekhar K, Kumar AN, Kumar G, Kim D-H, Song Y-C, Kim S-H. Electro-fermentation for biofuels and biochemicals production: Current status and future directions. *Bioresour. Technol.* **2021**, 323, 124598. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.124598>.

Chaurasia AK, Mondal P. Enhancing biohydrogen production from sugar industry wastewater using Ni, Ni-Co and Ni-Co-P electrodeposits as cathodes in microbial electrolysis cells. *Chemosphere* **2022**, 286 (3), 131728. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.131728>.

Dai HY, Yang HM, Liu X, Song XL, Liang ZH. Hydrogen production using “Direct-Starting” biocathode microbial electrolysis cell and the analysis of microbial communities. *Acta Metall. Sin. (Engl. Lett.)* **2019**, 32 (3), 297-304. <https://doi.org/10.1007/s40195-018-0785-6>.

Elsener B, Rossi A. Passivation of steel and stainless steel in alkaline media simulating concrete. Klaus Wandelt (Eds.), *Encyclopedia of Interfacial Chemistry*, Elsevier **2018** pp. 365-375. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-409547-2.13772-2>.

Feng H, Huang L, Wang M, Xu Y, Shen D, Li N, Chen T, Guo K. An effective method for hydrogen production in a single-chamber microbial electrolysis by negative pressure control. *Int. J. Hydrog. Energy* **2018**, 43 (37), 17556-17561. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2018.07.197>.

- Fudge T, Bulmer I, Bowman K, Pathmakanthan S, Gambier W, Dehouche Z, Al-Salem S M, Constantinou A. Microbial electrolysis cells for decentralized wastewater treatment: the next steps. *Water* **2021**, 13, 445. <https://doi.org/10.3390/w13040445>
- 18.-Jeremiasse AW, Hamelers HVM, Buisman CJN. Microbial electrolysis cell with a microbial biocathode. *Bioelectrochemistry* **2010**, 78 (1), 39-43. <https://doi.org/10.1016/j.bioelechem.2009.05.005>
- Gupta, P, Parkhey P. Design of a single chambered microbial electrolytic cell. *Biotechnol. Lett.* **2015**, 37, 1213-1219. doi:10.1007/s10529-015-1780-x
- Jafary T, Wan Daud WR, Ghasemi M, Kim BH, Carmona-Martínez AA, Abu Bakar MH, Jahim JM, Ismail MA. Comprehensive study on development of a biocathode for cleaner production of hydrogen in a microbial electrolysis cell. *J. Clean. Prod.* **2017**, 164, 1135-1144. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2017.07.033>.
- Jayabalan T, Matheswaran M, Preethi V, Mohamed SN. Enhancing biohydrogen production from sugar industry wastewater using metal oxide/graphene nanocomposite catalysts in microbial electrolysis cell. *Int. J. Hydrog. Energy* **2020**, 45 (13), 7647-7655. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2019.09.068>.
- Jayabalan T, Matheswaran M, Radhakrishnan TK, Mohamed SN. Influence of Nickel molybdate nanocatalyst for enhancing biohydrogen production in microbial electrolysis cell utilizing sugar industrial effluent. *Bioresour. Technol.* **2021**, 320 Part A, 124284. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.124284>
- Jeremiasse AW, Bergsma J, Kleijn JM, Saakes M, Buisman JN, Cohen-Stuart M, Hamelers VM. Performance of metal alloys as hydrogen evolution reaction. *Int. J. Hydrog. Energy* **2011**, 36, 10482-10489. doi: 10.1016/j.ijhydene.2011.06.013
- Keruthiga K, Mohamed SN, Gandhi NN, Muthukumar K. Sugar industry waste-derived anode for enhanced biohydrogen production from rice mill wastewater using artificial photo-assisted microbial electrolysis cell. *Int. J. Hydrog. Energy* **2021**, 46 (39) 20425-20434. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2021.03.181>.
- Lim SS, Fontmorin JM, Izadi P, Daud WRW, Scott K, Yu EH. Impact of applied cell voltage on the performance of a microbial electrolysis cell fully catalysed by microorganisms. *Int. J. Hydrog. Energy* **2020**, 45 (4), 2557-2568. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2019.11.142>.
- Muddasar M, Liaquat R, Aslam A, Rahman MZU, Abdullah A, Khoja AH, Latif K, Bahadar A. Performance efficiency comparison of microbial electrolysis cells for sustainable production of biohydrogen—A comprehensive review. *Int. J. Energy Res.* **2022**, 46(5), 5625- 5645. doi:10.1002/er.7606.
- Qyyum MA, Ihsanullah I, Ahmad R, Ismail S, Khan A, Nizami A-S, Tawfik Ahmed. Biohydrogen production from real industrial wastewater: Potential bioreactors, challenges in commercialization and future directions. *Int. J. Hydrog. Energy* **2022**, <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2022.01.195>

Rozendal RA, Jeremiase AW, Hamelers HVM, Buisman CJN. Hydrogen production with a microbial biocathode. *Environ. Sci. Technol.* **2008**, 42, 629-34. <https://doi.org/10.1021/es071720+>.

Rozendal RA, Hamelers VMH, Rabaey K, Keller J, Buisman CJN. Towards practical implementation of bioelectrochemical wastewater treatment. *Trends Biotechnol.* **2008**, 26(8), 450-459. doi: 10.1016/j.tibtech.2008.04.008

Satar I, Abu Bakar MH, Wan Daud WR, Mohd Yasin NH, Somalu MR, Kim BH. Feasibility of Ni/Ti and Ni/GF cathodes in microbial electrolysis cells for hydrogen production from fermentation effluent: A step toward real application. *Int. J. Energy Res.* **2020**, 44, 7464-7476. <https://doi.org/10.1002/er.5466>

Shen R, Liu Z, He Y, Zhang Y, Lu J, Zhu Z, Si B, Zhang C, Xing X-H. Microbial electrolysis cell to treat hydrothermal liquefied wastewater from cornstalk and recover hydrogen: Degradation of organic compounds and characterization of microbial community. *Int. J. Hydrog. Energy* **2016**, 41(7), 4132-4142. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2016.01.032>.

Tang J, Bian, Y, Jin S, Sun D, Zhiyong Jason Ren, ZJ. Cathode material development in the past decade for H₂ production from microbial electrolysis cells. *ACS Environ. Au* **2022**, 2, 20-29. <https://doi.org/10.1021/acsenvironau.1c00021>

Yang N, Hafez H, Nakhla G. Impact of volatile fatty acids on microbial electrolysis cell performance. *Bioresour. Technol.* **2015**, 193, 449-455. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.06.124>

Yuan H, He Z. Platinum group metal-free catalysts for hydrogen evolution reaction in microbial electrolysis cells. *The Chemical Record* **2017**, 17(7), 641-652. <https://doi.org/10.1002/tcr.201700007>.

Zhang Y, Merrill MD, Logan BE. The use and optimization of stainless steel mesh cathodes in microbial electrolysis cells. *Int. J. Hydrog. Energy* **2010**, 35 (21), 12020-12028. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2010.08.064>.

Zhi Z, Pan Y, Lu X, Zhen G, Zhao Y, Zhu X, Xiong J, Zhao T. Electrically regulating co-fermentation of sewage sludge and food waste towards promoting biomethane production and mass reduction. *Bioresour. Technol.* **2019**, 279, 218-227. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.01.142>.

Capítulo 6 Producción de hidrógeno en una MEC con agua residual real

6.1. Resultados y discusión para la experimentación en una MEC utilizando aguas reales

6.1.1. Configuración de los electrodos y valores paramétricos de la Ecuación de Gompertz en una MEC con aguas residuales reales

Las producciones acumuladas de biohidrógeno y HPR obtenidas de las MEC muestran que la MEC1 generó la mayor producción de biohidrógeno en comparación con las otras MECs (Tabla 6.1 y Figura 6.2). Se utilizó el software Statistica 7.0 para analizar los datos obtenidos durante la experimentación en la MEC y la Ecuación modificada de Gompertz para analizar la cinética de la reacción (Tabla 6.2). La máxima producción de biohidrógeno ocurrió a los 39 d de operación, aunque los experimentos se realizaron durante 45 d. El HPR máximo fue de $392 \text{ m}^3 \text{ H}_2/\text{m}^3_{\text{RD}}$ para la MEC1 (M2-Cu/Ni), mientras que el mínimo HPR generado fue de $16.0 \text{ m}^3 \text{ H}_2/\text{m}^3_{\text{RD}}$ correspondiente a la MEC6 (M2-M1) (Figura 6.2). El Cu/Ni y el SS304 plisado utilizados como cátodo y ánodo fueron los mejores electrodos durante la producción de biohidrógeno. Sin embargo, el electrodo de Cu/Ni utilizado como cátodo (MEC1, MEC4 y MEC5) mostró actividades electrocatalíticas altas en HPR solo en la MEC1 donde se utilizó melaza, obteniendo el valor más alto en comparación con las demás MEC. La combinación de diferentes materiales de electrodos y la distancia de los electrodos influyó en la producción de biohidrógeno en las MECs.

Tabla 6.1. Configuración de los electrodos en las MECs con agua residual real

MECs	Agua residual	Electrodos	d (cm) entre electrodos	HPR ($\text{m}^3/\text{m}^3_{\text{RD}}$)	pHi	pHf
MEC1	Melaza	M2-Cu/Ni	2	392	4.41	8.14
MEC2	Lactosuero	M2-M1	4	79	4.08	6.90
MEC3	Melaza	M2-M1	4	71	4.54	7.80
MEC4	Vinaza	M2-Cu/Ni	2	65	4.38	7.92
MEC5	Lactosuero	M2-Cu/Ni	2	18	3.72	7.49
MEC6	Vinaza	M2-M1	4	16	4.30	7.60

Tabla 6.2. Valores paramétricos de la Ec. de Gompertz para las MECs con aguas residuales reales

	Hmax (L)	Vmax (mL/min)	fase lag (λ) (h)
Melaza Ni (MEC1)	7749	0.28	20
Lactosuero Ni (MEC5)	1036	0.01	26
Vinaza Ni (MEC4)	918	0.05	17
Melaza M1 (MEC3)	407	0.05	9
Lactosuero M1 (MEC2)	324	0.06	8
Vinaza M1 (MEC6)	35	0.01	3

Las eficiencias de remoción de la DQO en los experimentos variaron entre 26 y 82% (Figura 6.2). La máxima remoción de DQO la generó la MEC4 (M2-Cu/Ni) con una DQO removida (ΔDQO) de 16.92 g/L. Los valores mínimos de remoción de DQO (menores al 26%) fueron generados por la MEC2. Estas bajas remociones generadas se relacionaron con los HPR bajos de las MECs analizadas. Como

se puede observar en la Figura 6.3, la mayor remoción de DQO en las MEC2 y MEC1, se relaciona con la mayor HPR. Sin embargo, el HPR de la MEC1 fue mucho mejor que que HPR de la MEC2 y las otros MEC. Se encontró una relación significativa entre la remoción de DQO y el HPR. La mayor producción de hidrógeno fue generada en la MEC1 ($392 \text{ m}^3/\text{m}^3_{\text{RD}}$), con una remoción de 73% mientras que la MEC4 terminó solo con $65 \text{ m}^3/\text{m}^3_{\text{RD}}$ con una remoción de 82% lo que indica que con el mismo par de electrodos (M2-Cu/Ni), la misma distancia (2 cm) y las mismas condiciones de reacción, la melaza generó una mayor cantidad de hidrógeno que la vinaza en las MEC alimentadas con aguas residuales de alta concentración. Se observó alta actividad bacteriana solo en la MEC1 debido a la gran cantidad de materia orgánica consumida que contribuyó a la producción de biohidrógeno. De acuerdo a esto, se demostró que los electrodos adheridos con biofilm (bioánodo y biocátodo) influyeron también sobre la remoción de DQO.

La alta conductividad eléctrica de las aguas residuales de alta concentración no afectó las actividades de los microorganismos durante la degradación de la materia orgánica ya que la presencia de VFAs (principales metabolitos de la reacción) en los reactores, mostró la actividad microbiana en la degradación anaerobia de la materia orgánica. Una alta conductividad eléctrica en el agua residual favorece la electrosíntesis microbiana y aumenta la velocidad en la migración de electrones y protones hacia el cátodo durante la producción de biohidrógeno y electricidad y por lo tanto, también reduce los sobrepotenciales del cátodo en los BES (Satar *et al.*, 2020; Gul *et al.*, 2021). Este comportamiento fue principalmente observado para la MEC1. Para el caso de las otras MEC, la conductividad eléctrica no fue un factor limitante, sin embargo, el arreglo de los electrodos, el material y las distancias entre los electrodos afectó las HER y el sobrepotencial, más para el caso cuando las MECs trabajaron con el cátodo M1 (MEC2, MEC3 y MEC6). La alta producción de biohidrógeno obtenida en este trabajo se debió a las altas concentraciones de DQO disponible para las bacterias, a la alta conductividad del electrolito y a las combinaciones de protones, electrones y producciones de VFAs generadas por las EABs adheridas al ánodo (bioánodo), a la producción de biohidrógeno generada por las bacterias productoras de hidrógeno suspendidas en el electrolito y el hidrógeno generado a través de la HER en el cátodo. Las MECs operadas en este estudio, se trabajaron en una sola cámara sin ninguna membrana utilizada como separador entre la cámara anódica y la catódica (MEC de cámara única sin membrana); por lo tanto, los cátodos funcionaban como biocátodos ya que estaban sumergidos en el inóculo, de modo que las bacterias adheridas a la superficie del electrodo catódico sirvieron como biocatalizadores y maximizaron la producción de biohidrógeno.

6.2. Producción de H_2 y remoción de DQO

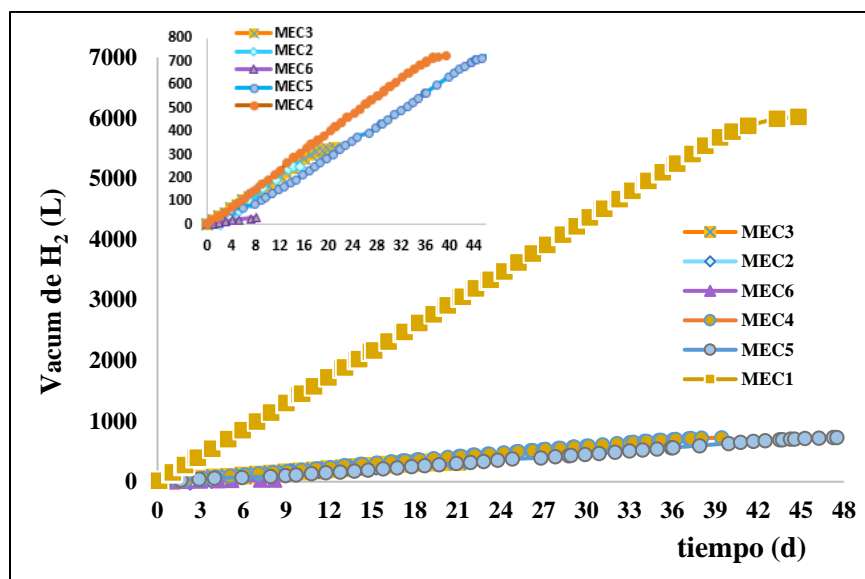


Figura 6.1. Producción de hidrógeno acumulado durante el tratamiento de un agua residual real de alta concentración.

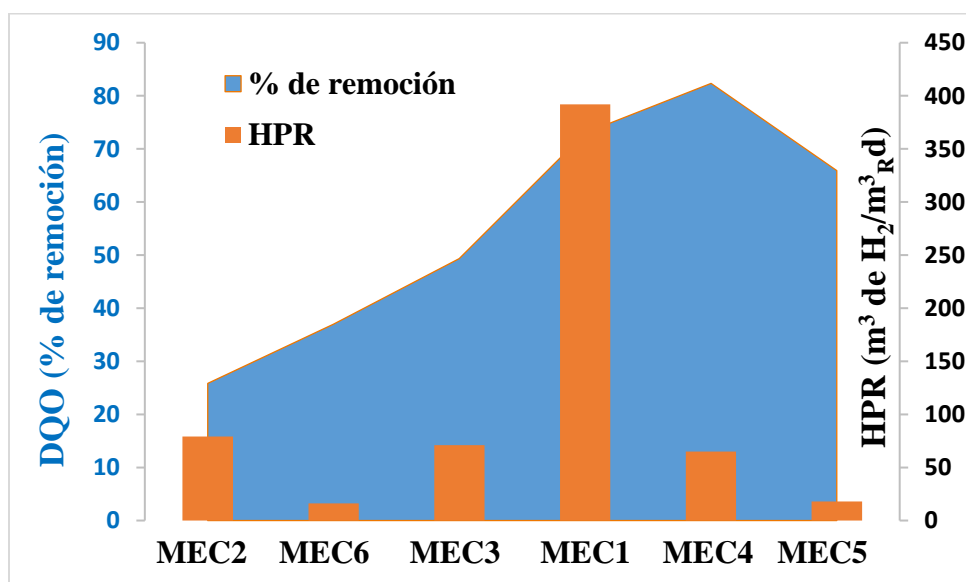


Figura 6.2. Remoción de DQO y volumen de hidrógeno producido por día (HPR) para las seis MECs.

6.3. Generación de VFAs y composición del biogás

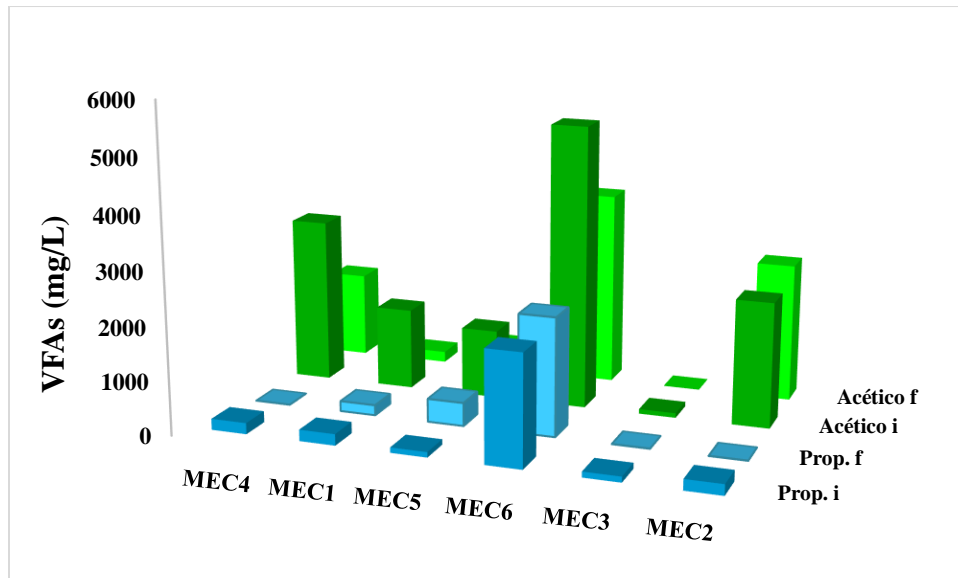
Los VFAs que se generan en la fermentación anaeróbica o mediante el proceso EF pueden servir como sustrato ideal para las bacterias electroactivas. El proceso EF genera una mayor cantidad de biohidrógeno con respecto a la fermentación oscura, también permite la metabolización de VFAs,

entre otros metabolitos generados en la fermentación oscura por la producción de biohidrógeno (Zhi, *et al.*, 2019). Por lo tanto, la presencia o ausencia de VFAs en el efluente de la MEC, luego de la EF, mostrará el grado de conversión de materia orgánica a biohidrógeno. La Figura 6.3, muestra la generación de VFAs en las MECs. Como se puede observar, para el par de electrodos M2-Cu/Ni, el análisis inicial mostró la presencia de ácido acético en las tres MECs, desde una concentración de 1283 mg/L (MEC5) hasta 3073 mg/L (MEC4) con una intermedia de 1518 mg/L para la MEC1. Las remociones de los VFAs obtenidas fueron 48%, 62% y 87% respectivamente. El etanol solo estuvo presente en la MEC4 con un 32% de remoción. Respecto del ácido propiónico, las cantidades iniciales fueron pequeñas desde 100 a 213 mg/L, incluso en el caso de la MEC5 se observó un incremento de 100 a 433 mg/L, lo cual se debió probablemente a la baja conversión del ácido propiónico en hidrógeno. En general, de los VFAs presentes, el ácido acético fue el que más aportó en la generación de H₂. Para el par de electrodos M2-M1, la MEC6 presentó la mayor concentración en los VFAs iniciales de ácido acético, ácido propiónico y etanol. El ácido acético inicial fue de 5251 mg/L, lográndose una remoción del 31%, el ácido propiónico inicial fue de 2201 mg/L manteniéndose sin remoción, mientras que en el caso del etanol la concentración inicial de 1790 mg/L fue removida en su totalidad. En la MEC3 las cantidades iniciales presentes de VFAs fueron mínimas, como se observa en la Figura 6.3, mientras que para la MEC2 la cantidad inicial de 2332 mg/L se incrementó en un 10% lo que indica que hubo una gran fermentación anaerobia.

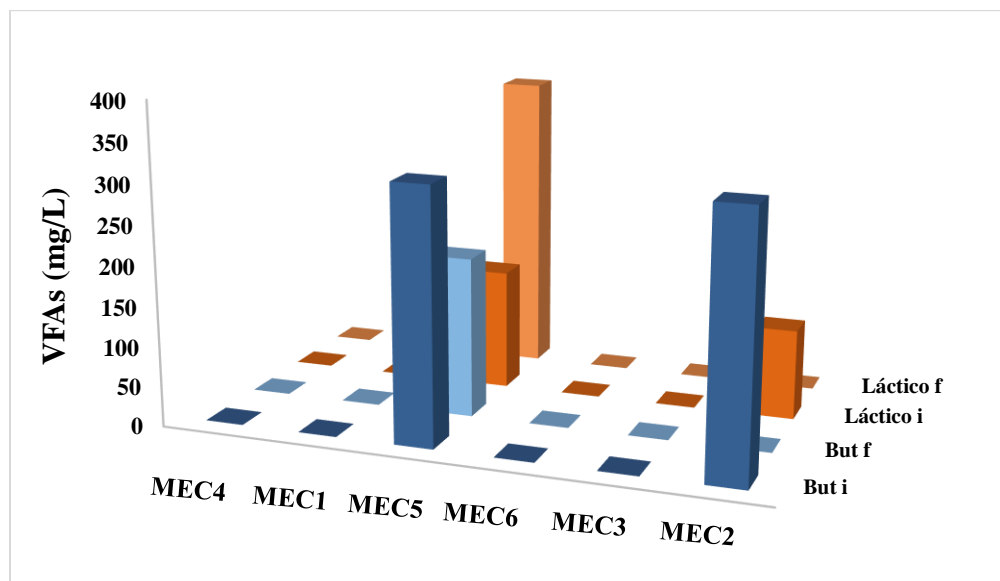
En la Figura 6.3b), se puede observar que las cantidades iniciales de ácido láctico y ácido butírico, solo estuvieron presentes en cantidades significativas en la MEC5 (151 mg/L y 317 mg/L) y MEC2 (112 mg/L y 323mg/L) respectivamente, lográndose una remoción del 100% de ambos ácidos en la MEC2, mientras que en la MEC5 el ácido butírico se removió en un 37% y el ácido láctico se incrementó en un 47% probablemente por la presencia de lactobacilos fermentadores anaerobios. Los resultados demuestran que en todas la MEC, el ácido acético fue el principal subproducto de la degradación de la materia orgánica y la producción de biohidrógeno siguió la ruta del ácido acético el cual fue fácilmente oxidado por las bacterias de respiración anódica (Yang *et al.*, 2015). La presencia de VFAs en las MECs al final de la reacción electroquímica, indica que hay una disminución en la actividad de los microorganismos exoelectrogénicos para oxidarlos, por lo que la transferencia de electrones y las actividades electrocatalíticas del ánodo y del cátodo (reducción de los protones) se ven afectadas negativamente, afectándose las condiciones termodinámicas de la celda y reduciéndose las reacciones de evolución de hidrógeno (HER) en el cátodo generándose bajas HPR y acumulaciones de VFAs en la MEC. La acumulación de VFAs indica una parcial transformación de estos subproductos a biohidrógeno, esto se observa comparando la HPR obtenida en la MEC1 (392 m³/m³Rd) con respecto a las otras MECs (menores a 79 m³/m³Rd). En la Figura 6.3c, se reporta el comportamiento de los valores de etanol, el cual solo estuvo presente inicialmente en la MEC6 y en la MEC4 (ambas pertenecientes a la vinaza), se observa que hubo una remoción efectiva del 34.57 y 42.61% respectivamente. El contenido de hidrógeno y dióxido de carbono (CO₂) en el biogás estuvo en el rango de 51-93% y 7-49% respectivamente (Figura 6.4). No se detectó metano en el biogás, esto debido a que en el inóculo pretratado no se encontraron metanógenos que ayudaran a incrementar el contenido de metano en el biogás y se podría suponer que los homoacetógenos utilizaron la materia orgánica para producir ácido acético principalmente. Se detectó la presencia de CO₂ en el biogás de todas las MECs mostrando que el CO₂ no se redujo a compuestos multicarbonosos (principalmente ácido acético) con electrones donados desde el ánodo para la reducción del CO₂ en

el cátodo (Christodoulou *et al.*, 2017), su producción fue bastante alta en la MEC5 y la MEC2 (24 y 49%, respectivamente).

a)



b)



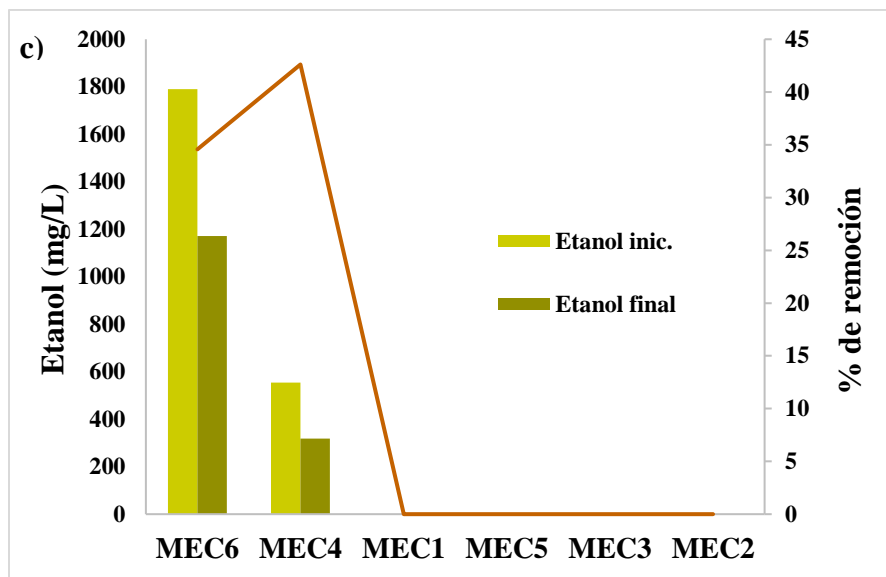


Figura 6.3. Remoción de VFAs en el tratamiento de un agua residual real de alta concentración en una MEC

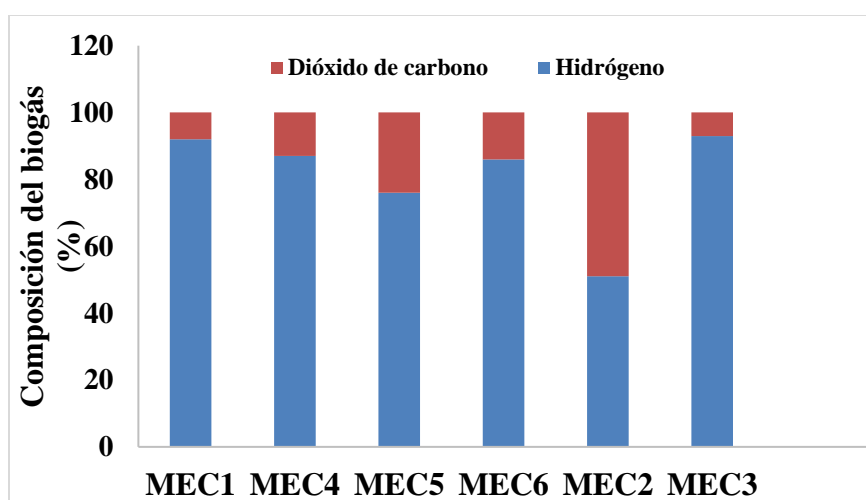


Figura 6.4. Composición del biogás durante el tratamiento de un agua residual de alta concentración en una MEC

6.4. Recuperación energética

Las eficiencias coulombicas de MEC1 a MEC6 estuvieron entre 6.15 y 48.71%. Las MEC2, MEC3 y MEC6 que usaron M2 como ánodo y M1 como cátodo a una distancia entre electrodos de 4 cm, fueron las eficiencias coulombicas más altas (28.05, 48.71 y 16.42%) seguidas por las MEC4 y MEC5 (6.15 y 17.5%) con M2 como ánodo y Cu/Ni como cátodo a una distancia entre electrodos de 2 cm. Las menores eficiencias catódicas (de 63 a 413%), observadas en las MECs, dieron como resultado baja recuperación en la energía total (de 12 a 68,2 %) y recuperación general de biohidrógeno (de 10 a 144%) y por lo tanto bajas HPR (de 16 a 79 m³ de H₂/m³RD. Para la MEC 1, la recuperación catódica

de biohidrógeno fué de 2800% con una eficiencia culómbica de 7.2%. Este valor relativamente bajo de eficiencia culómbica indicó que la producción de biohidrógeno a través de vías bioelectrocatalíticas fue parcial. La η_{E+S} máxima, r_{cat} , η_{H_2} y r_{H_2} se observaron en la MEC1. La mayor recuperación catódica de hidrógeno observada en este MEC resultó en una mayor recuperación general de hidrógeno (202 %), mayores recuperaciones de energía total (470 %) y mayor HPR (392 m^3 de H_2 / m^3 _{Rd}). Se determinó que existe una relación directa entre la producción de biohidrógeno y la recuperación de energía en todas las MEC. No se demostró una relación directa de las eficiencias culómbicas y las recuperaciones de energía durante la producción de biohidrógeno. Esto significa que las actividades metabólicas de las EAB y las bacterias productoras de hidrógeno fueron diferentes en las MEC durante el tratamiento de aguas residuales de alta concentración por lo que la producción de biohidrógeno a través del tiempo (Δt) varió, como puede observarse en la gráfica de biohidrógeno acumulado (Figura 6.1). Asimismo, los valores altos η_{E+S} y r_{H_2} fueron relacionados por el alto consumo de materia orgánica. Los valores de r_{H_2} mayores del 202% indican que la producción de biohidrógeno estuvo relacionada con el mayor número de moles de biohidrógeno producido en la MEC1 por las diferentes vías de producción de biohidrógeno (bacterias productoras de hidrógeno, EAB en el bioánodo, HER en el cátodo y EAB en el biocátodo). En la Tabla 6.5, se muestra un comparativo de los resultados obtenidos en este trabajo con los de la literatura. Se puede observar que las HPR, así como r_{cat} , OER y CD fueron significativamente más altas que las reportadas en la literatura.

Tabla 6.3. Principales parámetros energéticos evaluados en una MEC durante el tratamiento de una agua residual real de alta concentración

	I (mA)	ΔDQO (g)	η_{H_2} (mol)	η_{CE} (mol)	Δt (h)	OER η_{E+S} (%)	% removal	HPR (m^3/m^3_{Rd})
MEC1	3.2	12.68	40	0.014	239.0	470	73.05	392
MEC4	3.6	16.92	6.7	0.016	241.9	68.2	82.35	65
MEC5	4	10.6	2.9	0.028	380.6	18.2	65.94	18
MEC2	5.8	8.3	12.4	0.031	366.7	56.3	25.83	79
MEC3	4.6	7.18	12.4	0.042	408.0	63.8	49.35	71
MEC6	5.5	5.5	1.3	0.021	196.8	12	36.98	16

	r_{cat} (%)	W_{H_2} (kWh)	W_E (kWh)	W_S (kWh)	η_{TH} (mol) (COD)	Eficiencia culómbica (%)	E.C. (mS/cm)	r_{H_2} (%)
MEC1	2800	3.17	0.61	0.06	0.20	7.20	5	202
MEC4	413	0.53	0.70	0.08	0.26	6.15	4	25
MEC5	103	0.23	1.22	0.05	0.17	17.15	9	20
MEC2	392	0.98	1.70	0.04	0.11	28.05	5	110
MEC3	295	0.98	1.50	0.04	0.09	48.71	4	144
MEC6	63	0.11	0.87	0.03	0.13	16.42	9	10

6.5. Análisis electroquímico

6.5.1. Voltametría de barrido lineal (LSV)

Las bajas densidades de corriente obtenidas por las MEC2, MEC3, and MEC6 (Figura 6.5) que tenían el par de electrodos M2-M1 estuvieron asociadas con bajas HPR (Figura 6.2). Sin embargo, las MEC4 y MEC5 con el par M2-Cu/Ni y a pesar de generar densidades de corriente altas, también estuvieron asociadas con bajas HPR, lo que indica que parte de los electrones generados en el ánodo, no fueron usados en el cátodo para generar hidrógeno. Esto indica que la vinaza, melaza y lactosuero con los electrodos M2-M1 no produjeron una cantidad significativa de hidrógeno al ser tratadas en una MEC; de estas mismas aguas residuales reales, solo la melaza produjo una cantidad significativa de hidrógeno ($392 \text{ m}^3/\text{m}^3_{\text{RD}}$) con el par M2-Cu/Ni, la cual produjo la mayor densidad de corriente de las seis MECs ($107 \text{ A}/\text{m}^2$) (Figura 6.5). Demostrando de esta manera, la importancia de hacer combinaciones con diferentes materiales de electrodos en una MEC de una sola cámara y sin membrana de separación, con el objetivo de mejorar la HER e incrementar las producciones de biohidrógeno. Este comportamiento confirma la importancia que tienen las propiedades químicas y físicas del material de los electrodos, usados tanto en ánodo como en cátodo, y la distancia de separación de los electrodos para producir biohidrógeno en una MEC.

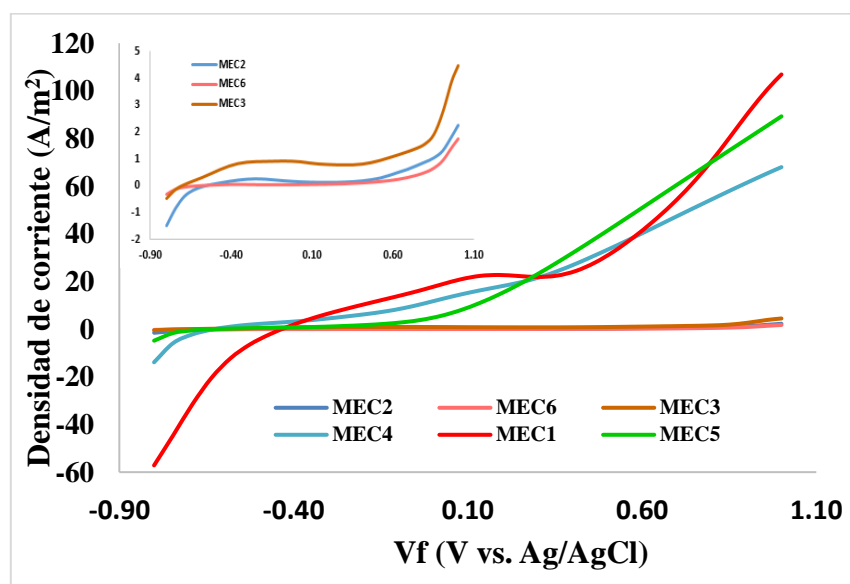


Figura 6. 5. Análisis de Voltametría de barrido lineal realizado a tres aguas residuales reales de alta concentración durante el tratamiento en una MEC.

6.5.2. Impedancia galvanostática electroquímica (Eisgalv)

El análisis de la impedancia galvanostática (EISGALV) realizada en las MECs se muestra en la Figura 6.6, donde los valores de resistencia óhmica se extrajeron de las gráficas de Nyquist obtenidas de las pruebas EIS. Las MEC que utilizaron el par de electrodos M2-Cu/Ni (MEC1, MEC4 y MEC5) presentaron resistencias de 42 a 62Ω , las cuales fueron significativamente más bajas comparados con las MEC del par M2-M1 (MEC2, MEC3 y MEC6) que fueron de 77 a 119Ω . Todas las MECs,

excepto la MEC1, presentaron una migración iónica y una transferencia de carga hacia el cátodo significativamente rápida, como se observa en la Figura 6.6, donde la pendiente es bastante pronunciada. La MEC1, generó la mayor producción de biohidrógeno, lo que demuestra la alta actividad electrocatalítica del cátodo de Cu/Ni frente al cátodo SS malla plana #60. El par de electrodos M2-Cu/Ni (MEC1, MEC4 y MEC5) presentó las menores resistencias óhmicas. Sin embargo, la MEC1 presentó la mayor resistencia óhmica de todas las MECs, lo que indica que no hubo una relación directa entre la producción de biohidrógeno y la resistencia óhmica. Los resultados de la impedancia mostraron que las más bajas resistencias de transferencia de carga catódica obtenidas en las MECs estuvieron asociadas a la actividad biocatódica, la conductividad del electrolito (agua residual) y al pH (Jafary *et al.*, 2017).

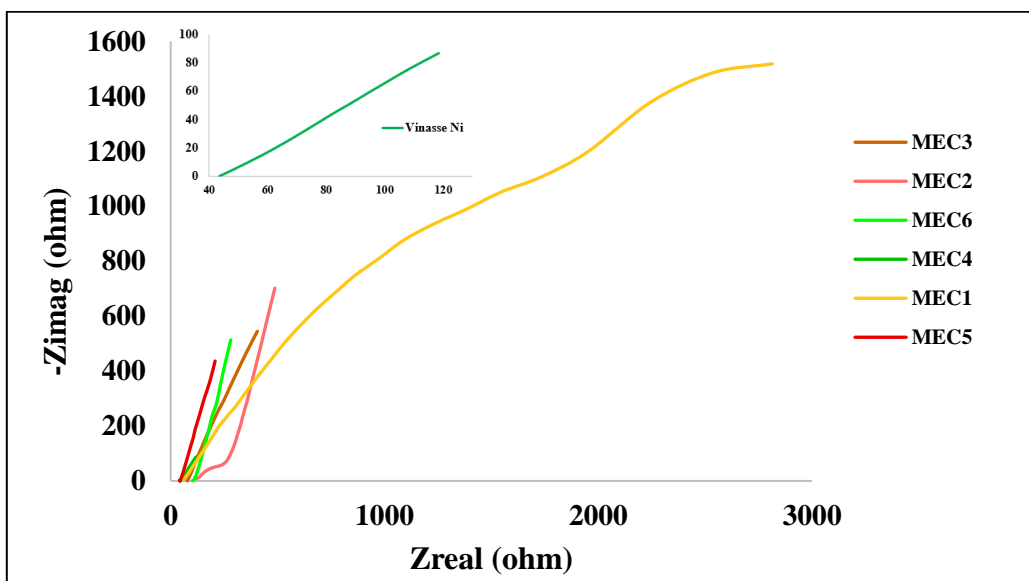


Figura 6.6. Valores de Impedancia galvanostática electroquímica (Eisgalv) obtenidas en el tratamiento de un agua residual en una MEC.

6.5.3. Potencial de circuito abierto (OCP)

La Figura 6.7, muestra los valores de OCP obtenidos durante el tratamiento de las aguas residuales reales en una MEC. Como puede observarse en la Figura 6.7, los valores de OCP entre -0.02 a -0.51 V indican una producción de electricidad *in situ* debido a la la diferencia de potencial generada entre los electrodos y a la presencia de las EAB adheridas al ánodo y al cátodo, lo que generó una cosecha de electrones en los ánodos y una producción de protones que migraron para su reducción en los cátodos de las MECs durante la degradación de la materia orgánica de un agua residual real. Los valores de OCP por debajo de -0.29 V fueron observados en las MEC2, MEC3 y MEC6 (par M2-M1) indicando una menor actividad de los EAB y que corresponde a las bajas producciones de hidrógeno obtenidas en este estudio. No se encontró una relación directa entre los valores de OCP y la HPR. Sin embargo, la MEC1 logró el HPR más alto (392 m³ de H₂/m³_{Rd}) y el segundo OCP mayor con respecto a las demás MECs (-0,51 V). En estudios anteriores, los OCP para la mayoría de los bioánodos y biocátodos en MEC alimentados con aguas residuales sintéticas y reales se informaron entre -0,33 y

-0,76 V (Bajracharya *et al.*, 2016; Lim *et al.*, 2020). Los valores de OCP más negativos muestran una alta tendencia a la corrosión del metal y los valores de OCP menos negativos indican una baja tendencia a la corrosión (Elsener y Rossi, 2018). Los componentes de suero y vinaza utilizados en este estudio y el ambiente ácido del sistema generaron una tendencia a causar corrosión en los materiales de los electrodos. La combinación de un metal con el metal utilizado como ánodo y cátodo generó una protección catódica de los electrodos disminuyendo los fenómenos de corrosión de los materiales. Se observó que las biopelículas adheridas sobre los materiales de los electrodos sirven como protección para reducir los fenómenos de corrosión de los materiales y así alargar la vida útil de los electrodos. Por lo tanto, las producciones de biohidrógeno obtenidas en este estudio tuvieron una tendencia que hizo que las reacciones bioelectroquímicas se derivaran principalmente por la acción de las AEB y bacterias productoras de hidrógeno. De acuerdo con los resultados del análisis de OCP en las MECs, es importante seleccionar electrodos que generen valores de OCP relativamente altos cuidando la tendencia a la corrosión.

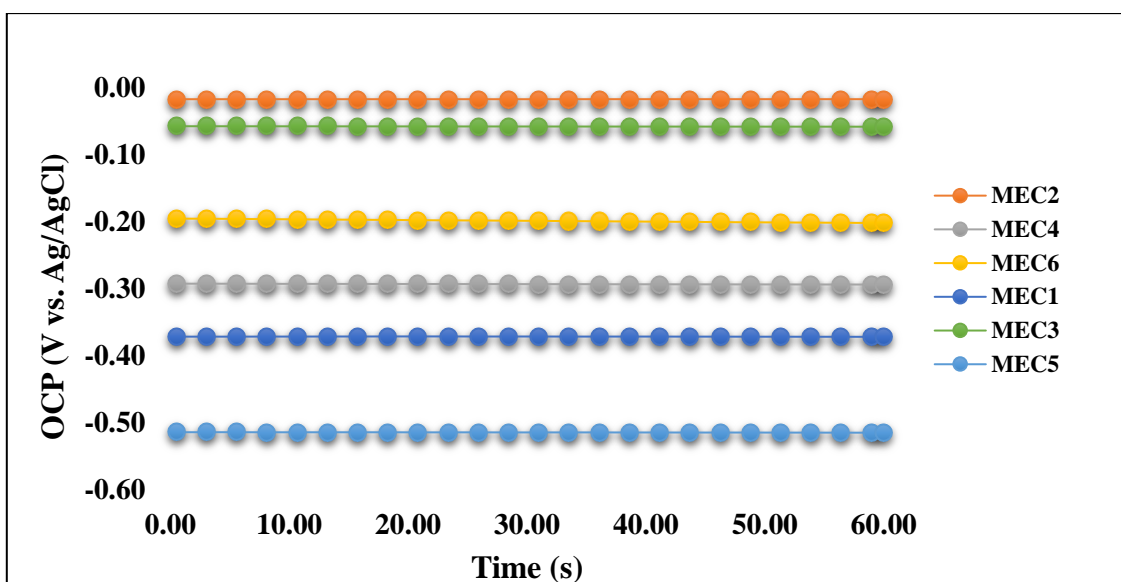


Figura 6. 7. Valores de Potencial de circuito abierto (OCP) para seis MECs durante el tratamiento de un agua residual real.

6.6. Valores de pH obtenidos en la MEC durante el tratamiento de un agua residual real

El pH inicial para las diferentes MECs cambió de un valor ácido hacia un valor alcalino por la formación de bicarbonatos que posteriormente fueron transformados a gas CO₂ (Figura 6.8), excepto en la MEC2 que dio un valor de 6.90 por debajo de las otras MECs. En general no se encontró una relación directa entre el pH y la producción de hidrógeno (HPR).

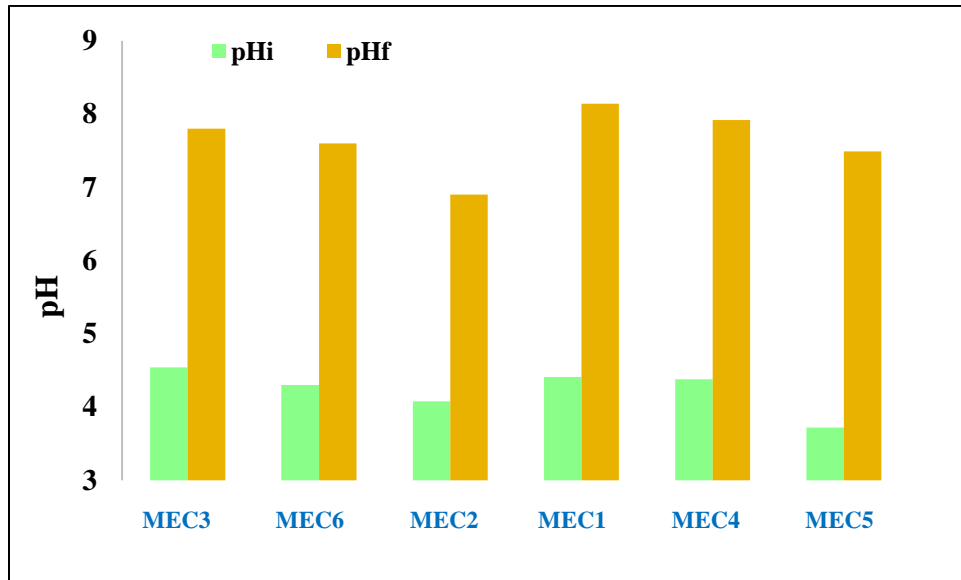


Figura 6. 8. pH inicial y final de un agua residual real durante el tratamiento en una MEC

Tabla 6. 4. Parámetros energéticos de las MECs durante el tratamiento de un agua residual de alta concentración.

MEC	I (mA)	Δ COD (g)	η_{H_2} (mol)	η_{CE} (mol)	η_{th} (DQO)	Δt	OER	r _{cat}	WH ₂	W _E	W _S	Eficiencia	HPR	V de
						(h)	η_{E+S} (%)		(kWh)	(kWh)	(kWh)	culómbica	(m ³ H ₂ /m ³ RD)	H ₂ /d (L)
MEC1	3.2	12.7	39.94	0.014	0.20	239.0	470.10	2799	3.17	0.61	0.06	7.20	392	98
MEC4	3.6	16.9	6.70	0.016	0.26	241.9	68.20	413	0.53	0.70	0.08	6.15	65	16
MEC5	4	10.6	2.92	0.028	0.17	380.6	18.25	103	0.26	1.22	0.05	17.15	18	5
MEC2	5.8	8.3	12.35	0.031	0.13	366.7	56.27	392	0.98	1.70	0.04	28.05	79	20
MEC3	4.6	7.2	12.35	0.042	0.11	408.0	63.79	295	0.98	1.50	0.04	48.71	71	18
MEC6	5.5	5.5	1.34	0.021	0.09	196.8	11.93	63	0.11	0.87	0.03	16.42	16	4

Tabla 6. 5. Desempeño de las MECs durante el tratamiento de diferentes aguas residuales reales

MEC # cámaras	Ánodo-Cátodo	Agua Resid.	Voltaje Aplicado (V)	Distancia entre electrodos (cm)	DQOi (g/L)	DQO removid a (%)	pH	T (°C)	HPR (m ³ /m ³ _{RD})	CD (A/m ²)	Energía total recuperada (OER) (%)	r _{cat} (%)	Eficiencia culómbica	Referencias
2	Cpapel-C tela/Pt	LS	0.9	-	0.8	85	5.7	30	0.03	4.0	27	52	58.1	Apostolopoulos, 2021
1	FG-SS malla #60	LS	0.8	4	19.9	-	7.0	32	0.16	1.2	-	263.7	-	Rivera, 2017
1	G cepillo-G tela/Pt	LS	0.8	2.5	4.0	-	6.3	37	0.8	0.065	-	35	120	Rago, 2016
2	G lámina-NiO.rGO*	Melaza	1.0	-	4.4	56.6	7.0	ambiente	0.10	1.2	-	20.8	56.64	Jayabalan, 2020
2	G lámina-Niespuma/NiMoO ₄	Melaza	1.0	-	4.2	54.38	4.5	ambiente	0.12	81.0	11.96	30	58.20	Jayabalan, 2021
2	C fieltro-Pt-Ir malla	Vinaza	0.45	-	3.0	36.7	7.0	37	0.24	3.4	-	-	74.00	Marone, 2016
1	M2-Cu/Ni	Melaza	0.8	2	17.2	73.05	4.4	25	392.0	107	470.1	2800	7.20	Este trabajo
1	M2 -Cu/Ni	Vinaza	0.8	2	20.5	82.35	4.4	25	56.0	68	68.2	412.57	6.15	Este trabajo
1	M2-Cu/Ni	LS	0.8	2	16.1	65.94	3.7	25	18.0	89	18.25	102.82	17.15	Este trabajo
1	M2-M1	LS	0.8	4	21.3	25.83	4.1	25	79	2	56.27	392.42	28.05	Este trabajo
1	M2-M1	Melaza	0.8	4	16.8	49.35	4.5	25	71	4.47	63.79	294.97	48.71	Este trabajo
1	M2-M1	Vinaza	0.8	4	19.4	36.98	4.3	25	16	1.75	11.93	63.03	16.42	Este trabajo

LS.-Lactosuero *NiO.rGO.-Oxido de Niquel-óxido de grafeno

M2.-malla plisada #60 de acero inoxidable 304; M1.-malla plana #60 de acero inoxidable 304

6.7. Conclusiones de la investigación con aguas reales a nivel laboratorio

Este estudio investigó la producción de biohidrógeno a partir de dos combinaciones diferentes de electrodos en una MEC de una sola cámara y sin membrana, utilizando tres aguas residuales reales con alta conductividad. El mejor desempeño de las MECs fue el de la MEC1 que tenía los electrodos metálicos SS304 malla plisada #60 (ánodo) y barra de Cu/Ni (cátodo). La forma “plisada” de SS304 malla #60 mostró una excelente superficie de electrodo para el transporte de electrones durante la degradación de la materia orgánica disminuyendo las resistencias internas y los sobrepotenciales en la MEC, además mostró una excelente superficie colonizadora para las bacterias electroactivas (EAB). Estos electrodos presentaron mejores actividades electrocatalíticas (bajo potencial de inicio de HER y alta tasa de producción de corriente) en comparación con otros electrodos metálicos y de carbono. Se determinó que el área del electrodo, el tipo de material, la forma del electrodo (por ejemplo, plisado, barra, plano), las comunidades de bacterias, la distancia entre electrodos y las configuraciones (combinaciones de electrodos), juegan un papel importante para mejorar el HER durante la producción de biohidrógeno en una MEC alimentada con aguas residuales reales. También se observó que las biopelículas adheridas tanto al ánodo como al cátodo (bioelectrodos) influyen en el rendimiento de la MEC. En este estudio se obtuvo una producción de biohidrógeno de hasta $392 \text{ m}^3 \text{ H}_2/\text{m}^3_{\text{RD}}$ con una mayor recuperación de energía total (470%) y una alta remoción de DQO (73.05%).

6.8. Referencias

Bajracharya S, ElMekawy A, Srikanth S, Pant D. Cathodes for microbial fuel cells. K.Y. Scott, Hao Eileen (Eds.), *Microbial electrochemical and fuel cells*, Woodhead Publishing, Boston **2016** pp. 179-213.

Christodoulou X, Okoroafor T, Parry S, Velasquez-Orta SB. The use of carbon dioxide in microbial electrosynthesis: Advancements, sustainability and economic feasibility. *J. CO₂ Util.* **2017**, 18, 390-399. <https://doi.org/10.1016/j.jcou.2017.01.027>

Elsener B, Rossi A. Passivation of steel and stainless steel in alkaline media simulating concrete. Klaus Wandelt (Eds.), *Encyclopedia of Interfacial Chemistry*, Elsevier **2018** pp. 365-375. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-409547-2.13772-2>.

Gul H, Raza W, Lee J, Azam M, Ashraf M, Kim KH. Progress in microbial fuel cell technology for wastewater treatment and energy harvesting. *Chemosphere* **2021**, 281, 130828. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.130828>

Jafary T, Wan Daud WR, Ghasemi M, Kim BH, Carmona-Martínez AA, Abu Bakar MH, Jahim JM, Ismail MA. Comprehensive study on development of a biocathode for cleaner production of hydrogen in a microbial electrolysis cell. *J. Clean. Prod.* **2017**, 164, 1135-1144. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2017.07.033>.

Lim SS, Fontmorin JM, Izadi P, Daud WRW, Scott K, Yu EH. Impact of applied cell voltage on the performance of a microbial electrolysis cell fully catalysed by microorganisms. *Int. J. Hydrog. Energy* **2020**, 45 (4), 2557-2568. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2019.11.142>.

Satar I, Abu Bakar MH, Wan Daud WR, Mohd Yasin NH, Somalu MR, Kim BH. Feasibility of Ni/Ti and Ni/GF cathodes in microbial electrolysis cells for hydrogen production from fermentation effluent: A step toward real application. *Int. J. Energy Res.* **2020**, 44, 7464-7476. <https://doi.org/10.1002/er.5466>

Yang N, Hafez H, Nakhla G. Impact of volatile fatty acids on microbial electrolysis cell performance. *Bioresour. Technol.* **2015**, 193, 449-455. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.06.124>

Capítulo 7 Obtención de hidrógeno en un RABE usando aguas residuales reales

7.1. Resultados y discusión

7.2. Producción de biohidrógeno y remoción de DQO en los RABEs

Las producciones acumuladas de biohidrógeno y HPR obtenidas en los RABEs mostraron que los RABE RMNi y RVNi generaron las mayores producciones de biohidrógeno en comparación con los otros RABEs (Tabla 7.1 y Figura 7.1). La máxima producción de biohidrógeno se produjo a los 23 días de operación, aunque los experimentos se realizaron durante 28 días. El HPR máximo fue de 156 m^3 de $\text{H}_2/\text{m}^3_{\text{RD}}$ para el RABE RMNi y 124 para RVNi, mientras que el HPR mínimo generado fue de $1.3 \text{ m}^3 \text{ H}_2/\text{m}^3_{\text{RD}}$ que correspondió al RMM1 (Figura 7.2). El Cu/Ni y el SS304 plisado, utilizados como cátodo y ánodo, fueron los mejores electrodos durante la producción de biohidrógeno. Sin embargo, el electrodo de Cu/Ni utilizado como cátodo (RMNi, RVNi y RWNi) mostró actividades electrocatalíticas altas en HPR solo en dos RABE: RMNi y RVNi donde se utilizó melaza y vinaza, obteniendo valores altos en comparación con los otros RABE. La combinación de diferentes materiales de electrodos y la distancia de los electrodos influyó en la producción de biohidrógeno en los RABE.

Tabla 7.1. Arreglo de los electrodos en los RABEs

RABE	Agua residual	Electrodos	d (cm)	HPR ($\text{m}^3 \text{ H}_2/\text{m}^3_{\text{RD}}$)
RMNi	Melaza	M2-Cu/Ni	2	156
RVNi	Vinaza	M2-Cu/Ni	2	124
RWNi	Lactosuero	M2-Cu/Ni	2	10.3
RMM1	Melaza	M2-M1	4	1.3
RWM1	Lactosuero	M2-M1	4	2.6
RVM1	Vinaza	M2-M1	4	10

Las eficiencias de remoción de la DQO en los experimentos, variaron entre 24,1 y 48,8% (Figura 7.2). La remoción máxima de DQO fue generada por RVNi con una DQO consumida (ΔDQO) de 8.92 g/L. El valor mínimo de remoción de DQO (menor a 24.10%) fue generado por RVM1. Esta baja eliminación generada se relacionó con un HPR bajo, determinado en estos RABE. La mayor remoción de DQO fue en los RABEs RMNi y RVNi, además, tuvo una relación directa con las mayores HPR. Sin embargo, el HPR de RMNi fue mejor que el HPR de RVNi usando el mismo par de electrodos (M2-Cu/Ni), la misma distancia entre electrodos (2 cm) y las mismas condiciones de reacción y además, fue mejor que los otros RABE. Lo que significa que las bacterias aprovecharon mejor la materia orgánica de la melaza que la vinaza, en la producción de hidrógeno, con un menor consumo en la DQO. La alta conductividad eléctrica de las aguas residuales de alta concentración (8.86 para el suero, 4.97 para la melaza y 4.12 mS/cm para la vinaza) no afectó las actividades de los

microorganismos durante la degradación de la materia orgánica, lo demuestra la presencia de los VFAs que son los metabolitos primarios en los RABEs, pero probablemente el pH ácido sí afectó las actividades bacterianas (Satar *et al.*, 2020; Gul *et al.*, 2021). La alta producción de biohidrógeno obtenida en este trabajo se debió a las altas concentraciones de DQO disponible para las bacterias, la alta conductividad del electrolito y las combinaciones de producción de protones, electrones y VFAs generadas por las bacterias electroactivas (EAB) adheridas al ánodo (bioánodo) y al la producción de biohidrógeno generado por bacterias productoras de hidrógeno suspendidas en el electrolito. Los RABEs fueron operados en una sola cámara sin ninguna membrana utilizada como separador entre la cámara anódica y la catódica (RABE de cámara única sin membrana). Por lo tanto, los cátodos funcionaban como biocátodos ya que estaban sumergidos en el inóculo, de modo que las bacterias adheridas a la superficie del electrodo catódico, sirvieron como biocatalizadores y maximizaron la producción de biohidrógeno.

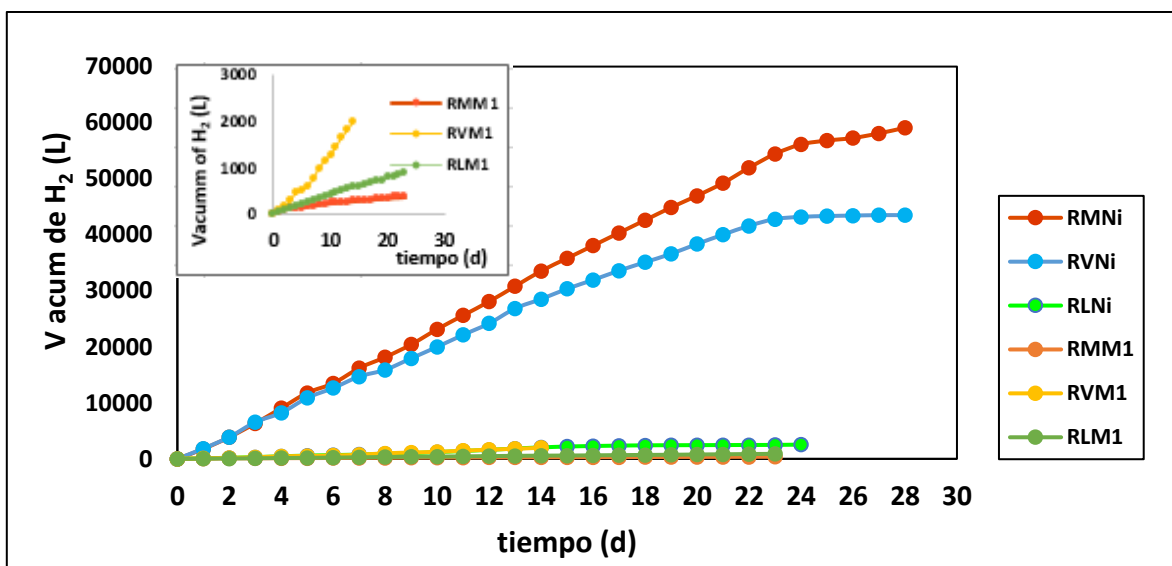


Figura 7. 1. Volúmenes de hidrógeno acumulado en los RABEs durante el tratamiento de un agua residual real.

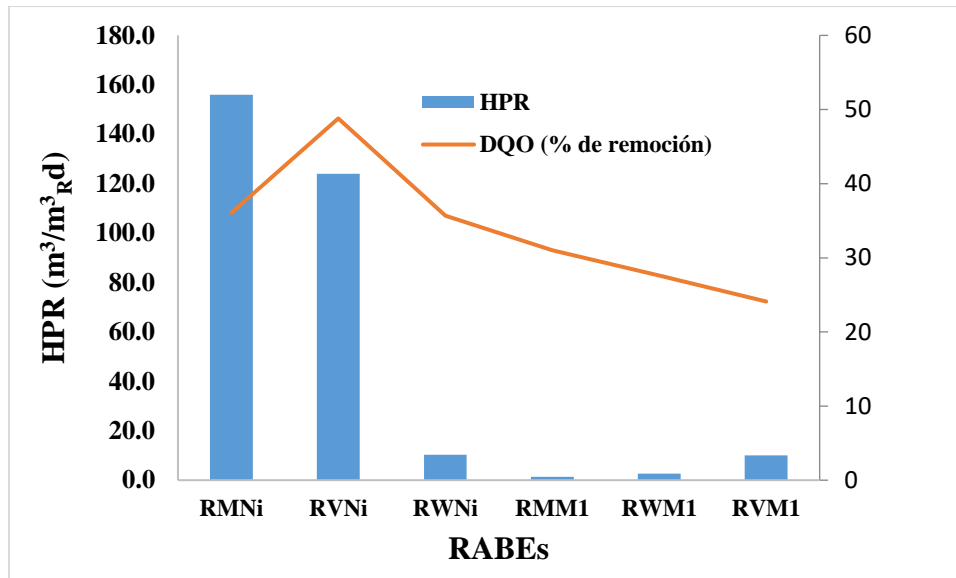


Figura 7.2. HPR y % de remoción de DQO obtenida en los RABEs durante el tratamiento de un agua residual real.

7.3. Generación de VFAs y contenido de biogas.

El monitoreo de los VFAs se realizó únicamente sobre la producción de hidrógeno del RABE correspondiente al par de electrodos M2-Cu/Ni con Melaza, Vinaza y Suero, que fue el que generó los mayores HPRs (Figura 7.3). Los resultados mostraron que los VFAs iniciales fueron utilizados por bacterias electrogénicas y, al mismo tiempo, los VFAs fueron producidos por bacterias anaerobias en la fermentación oscura (DF). Los VFAs fueron consumidos y producidos en todo el proceso experimental de los RABEs. Sin embargo, el ácido acético fue el VFA que más influyó en la producción de biohidrógeno, por los niveles de concentración elevados (Figura 7.3a) que mantuvo con respecto al ácido propiónico (Figura 7.3b) y al ácido butírico (Figura 7.3c).

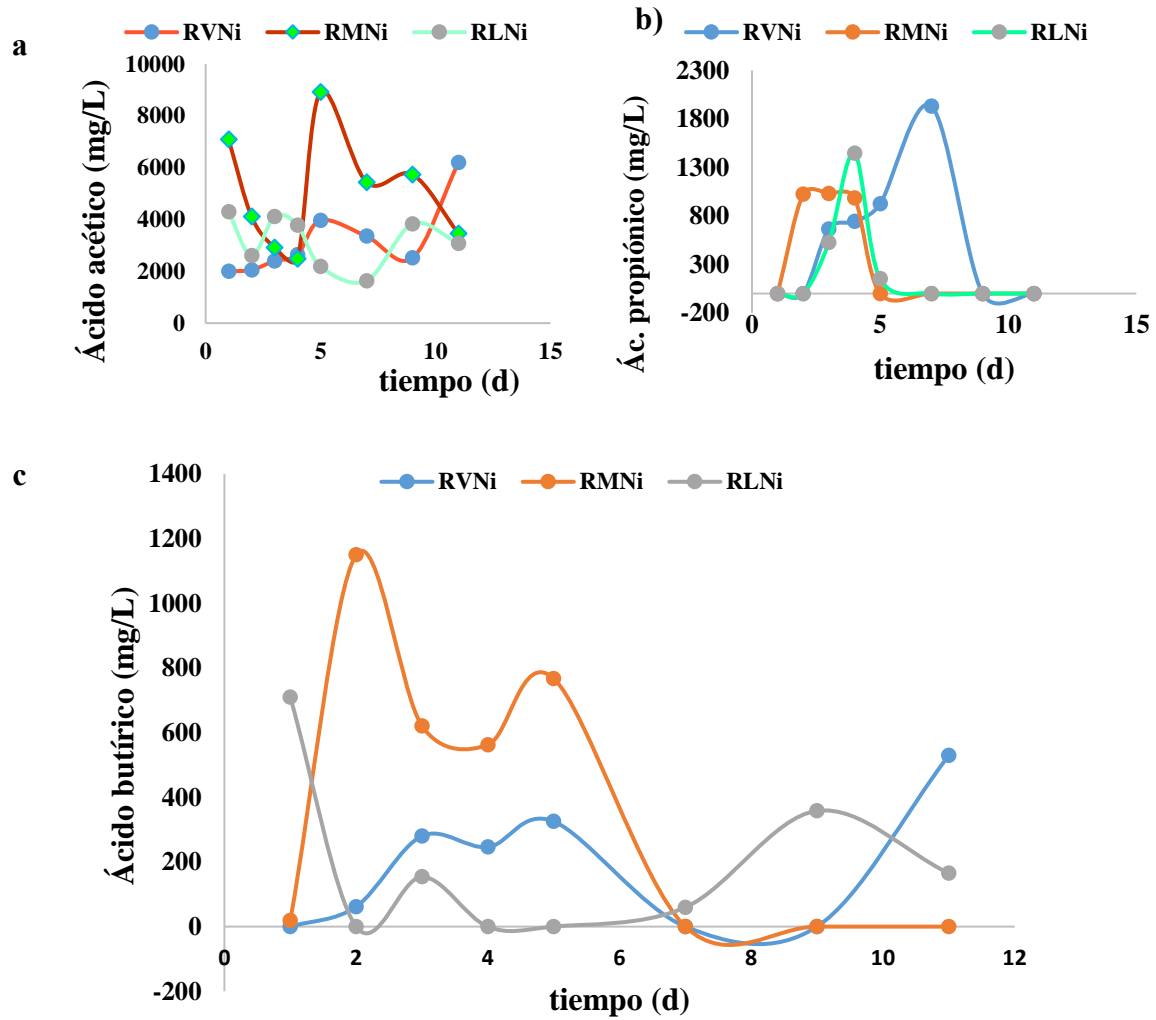


Figura 7. 3. VFAs generados durante el tratamiento en un RABE de un agua residual

7. 4. Análisis electroquímico

7.4.1. Voltametría de barrido lineal (LSV)

El RABE RLNi desarrolló la densidad de corriente más alta (242 A/m^2), mientras que el RMNi y RVNi desarrollaron 63 y 18 A/m^2 respectivamente, esto se debió a que el RLNi (lactosuero) tuvo una conductividad eléctrica más alta (8.86 mS/cm), en comparación con la melaza y la vinaza (RMNi y RVNi) de 4.97 y 4.12 mS/cm respectivamente (Figura 7.4). Las bajas densidades de corriente obtenidas para los demás RABE (RLM1, RVM1 y RMM1) de 2 a 22 A/m^2 se relacionaron con un HPR más bajo (Figura 7.2), lo que indica que parte de los electrones generados en el ánodo no fueron utilizados en el cátodo para generar hidrógeno, sólo la melaza y la vinaza (RMNi y RVNi) produjeron una cantidad significativa de hidrógeno (156 y $124 \text{ m}^3/\text{m}^3_{\text{RD}}$) utilizando M2-Cu/Ni como electrodos. Demostrando de esta forma la importancia de realizar combinaciones con diferentes electrodos en un RABE con el objetivo de mejorar la HER y aumentar la producción de biohidrógeno.

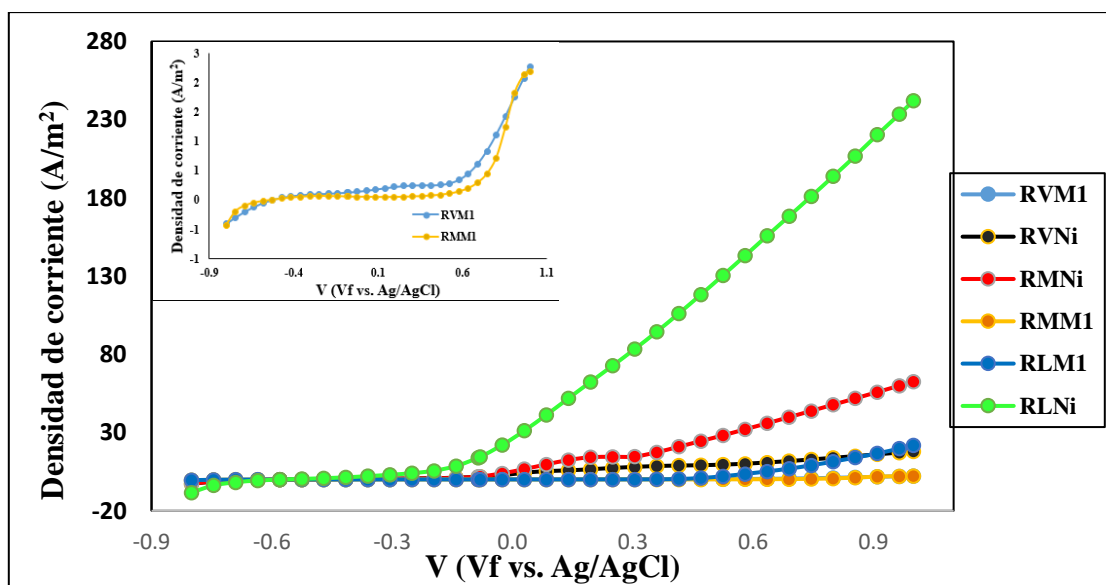


Figura 7.4. Densidades de corriente desarrolladas en los RABEs durante el tratamiento de un agua residual real.

7.4.2. Impedancia galvanostática electroquímica (Eisgalv)

La Figura 7.5 muestra los análisis de impedancia en los RABEs, de los valores de resistencia óhmica extraídos del gráfico de Nyquist. Los RABEs que usaron el par de electrodos M2-Cu/Ni (RVNi, RLNi, and RMi) presentaron resistencias desde 43.8 a 86.6Ω las cuales fueron significativamente más bajas comparados con el par M2-M1 (RVM1, RLM1 y RMM1) que fueron de 60.3 a 105Ω . No obstante, todos los RABEs presentaron una migración iónica y una transferencia de carga hacia el cátodo muy parecidas, como se observa en el inserto de la Figura 7.5, donde todas las pendientes son bastante pronunciadas. Los RABEs RMNi y

RVNi generaron las mayores producciones de biohidrógeno, lo que demuestra la alta actividad electrocatalítica del cátodo Cu/Ni frente al cátodo SS malla #60 plana. Los resultados del EIS mostraron que la menor resistencia a la transferencia de carga catódica obtenida para los RABEs se asoció con la actividad biocatódica, la conductividad del electrolito y la condición de pH ácido (Jafary *et al.*, 2017).

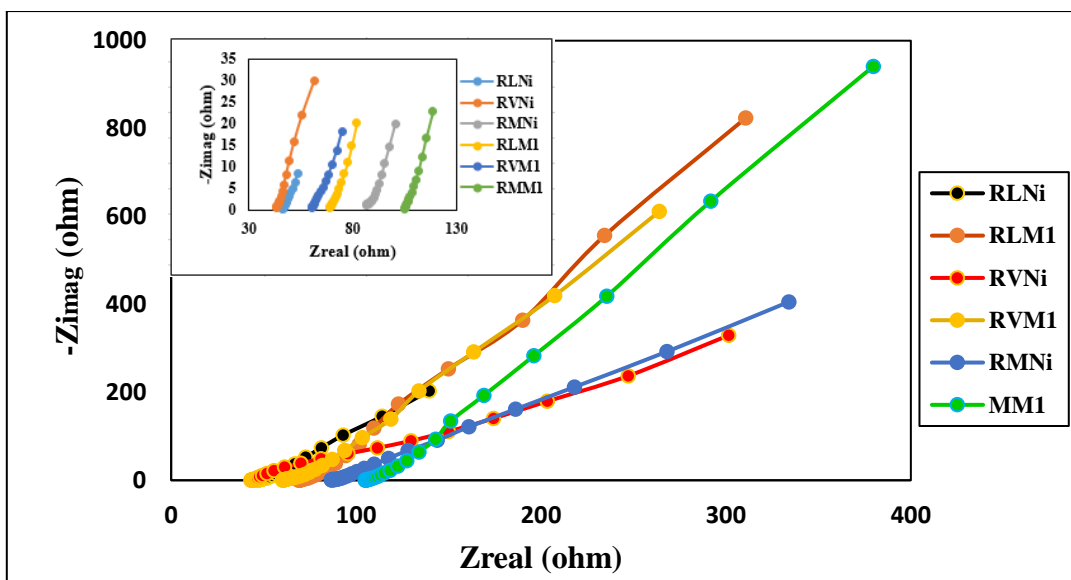


Figura 7.5. Valores de Impedancia galvanostática electroquímica (Eisgalv) generados en el tratamiento de un agua residual real realizados en un RABE.

7.4.3. Potencial de circuito abierto (OCP)

Para determinar el voltaje que podría generar la MEC, se realizó el análisis del potencial de circuito abierto. La Figura 7.6 muestra los valores de OCP obtenidos durante el tratamiento de un agua residual real en un RABE. Para el análisis OCP, no se suministró voltaje externo. Como se puede observar, en los RABE analizados se generaron valores de OCP de -0,02 a -0,51 V, lo que indica una producción eléctrica *in situ* por la presencia de las EABs adheridas a los ánodos y cátodos, los cuales generaron una cosecha de electrones en los ánodos y una producción de protones que migraron para su reducción en los cátodos de los RABEs durante la degradación de la materia orgánica. El menor valor de OCP (-0.51 V) fue generado en el RABE RLNi, que correspondió al lactosuero, el cual tuvo la mayor conductividad eléctrica (8.86 mS/cm) en comparación con la melaza y la Vinaza (RMNi y RVNi) con valores de 4.97 y 4.12 mS/cm, respectivamente. Los valores observados indican la superioridad del par de electrodos M2-Cu/Ni con respecto al par M2-M1 (RLM1, RMM1 y RVM1) en la generación de electricidad en el RABE, indicando una mayor actividad de los EAB y que corresponde a las altas producciones de biohidrógeno obtenidas en este trabajo. Además, se encontró una relación directa entre los valores de OCP en las pruebas y el HPR. En trabajos anteriores, los OCP reportados para la mayoría de los bioánodos y biocátodos en las MECs

alimentadas con aguas residuales sintéticas y reales fueron entre -0,33 y -0,76 V (Bajracharya *et al.*, 2016; Lim *et al.*, 2020). Los valores de OCP más negativos muestran una alta tendencia a la corrosión del metal y los valores de OCP menos negativos indican una baja tendencia a la misma (Elsener y Rossi, 2018). Los componentes de suero y vinaza utilizados en este trabajo y el ambiente ácido del sistema generaron una tendencia a causar corrosión en los materiales de los electrodos a diferencia de la melaza. Se observó que las biopelículas adheridas sobre la superficie de los electrodos, sirven como protección para reducir los fenómenos de corrosión de los materiales y así alargar la vida útil de los mismos. Por lo tanto, las producciones de biohidrógeno obtenidas en este trabajo tuvieron una tendencia que hizo que las reacciones bioelectroquímicas se derivaran principalmente por la acción de los AEB y las bacterias productoras de hidrógeno.

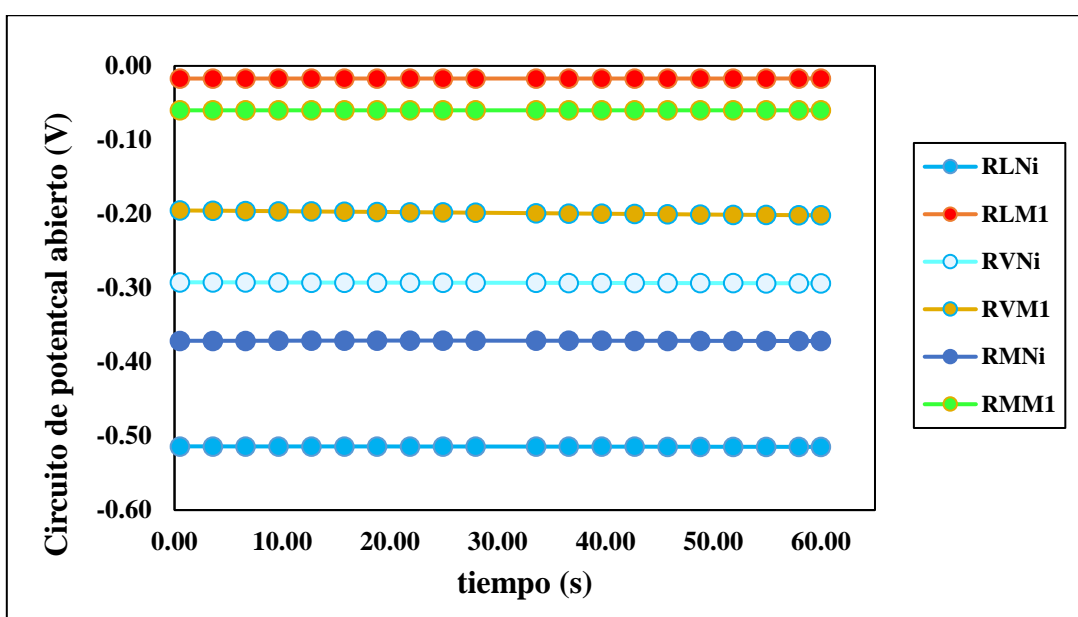


Figura 7.6. Valores de OCP generados en un RABE durante el tratamiento de un agua residual real

7.5. Recuperación de energía

Las recuperaciones de energía en un RABE de una sola cámara y sin membrana, durante el tratamiento de aguas residuales de alta concentración con diferentes combinaciones de electrodos, se evaluaron mediante diferentes parámetros, como CE, η_{E+S} , r_{cat} , η_{H_2} , η_{CE} y r_{H_2} (Tabla 7.2). Las eficiencias coulombicas en los RABE estuvieron entre 1.09 y 5.1%, lo indica que a pesar de que hubo remociones de materia orgánica desde 24 hasta 48.8%, la generación de electrones por EAB posiblemente fue baja, y así una menor cantidad de electrones migraron hacia el cátodo. Estos valores relativamente bajos de eficiencias coulombicas indicaron que la producción de biohidrógeno a través de vías bioelectrocatalíticas fue parcial. Los valores máximos de η_{E+S} , r_{cat} , η_{H_2} y η_{CE} , se observaron en los RABEs RMNi y RVNi. Las mayores recuperaciones catódicas de hidrógeno observadas en estos RABEs dieron como

resultado mayor recuperación energética de hidrógeno (182,5 y 139 %), mayores recuperaciones de energía total (1732 y 1582 %) y mayor HPR (156 y 124 m³ H₂/m³RD). Las mayores eficiencias energéticas obtenidas en este trabajo significan que la energía de biohidrógeno recuperada fue superior a la tensión de entrada (0.8 V). Según Tang *et al.*, 2022, la alta eficiencia energética en una MEC o en un RABE se debe a una entrada de bajo voltaje que aumenta la HER con una baja pérdida de sobrepotencial utilizando cátodos basados en Ni. Se encontró que hubo una relación directa entre la producción de biohidrógeno y la recuperación de energía total en todos los RABE. Sin embargo, no se observó una relación directa entre eficiencias coulombicas y recuperación de energía total durante la producción de biohidrógeno en este trabajo. Esto significa que las actividades metabólicas de las EAB y las bacterias productoras de hidrógeno fueron diferentes en los RABE durante el tratamiento de aguas residuales de alta concentración por lo que la producción de biohidrógeno a través del tiempo (Δt) varió, como puede observarse en la gráfica de biohidrógeno acumulado (Figura 7.1) generando diferentes η_{CE} y diferentes valores de corriente eléctrica debido a las variaciones de las HER, sobrepotenciales de los electrodos, combinaciones de electrodos y distancia entre los mismos. Asimismo, los altos η_{E+S} y r_{H_2} fueron relacionados con el alto consumo de materia orgánica. Los valores de r_{H_2} superiores al 100 % indicaron que las producciones de biohidrógeno estuvieron relacionadas con el mayor número de moles de biohidrógeno producido en los RABE RMNi y RVNi debido a las diferentes formas de producción de biohidrógeno (bacterias productoras de hidrógeno, EAB en el bioánodo, HER en el cátodo y EAB en el biocátodo). En la Tabla 7.3, se muestra una comparación de los resultados obtenidos en este trabajo con los de la literatura. Se puede observar que las HPR así como r_{cat} y r_{H_2} fueron significativamente más altas que las reportadas en la literatura.

Tabla 7.2. Parámetros energéticos de los RABEs durante el tratamiento de un agua residual de alta concentración.

RABE	I (mA)	Δ DQO		η_{CE} (mol/voltaje aplicado)	η_{th} debido a Δ DQO	Δt (h) 1 ciclo	OER			W_{H_2} (kWh)	W_E (kWh)	W_S (kWh)	Eficiencia culombica (%)	HPR (m ³ /m ³ _{RD})	(Vacum/ciclo) (L)
		(g/L) removida	η_{H_2} (mol) medidas				η_{E+S} (%)	r _{cat}							
RMNi	22.8	6.3	2298.2	0.25	5.9	576	1732	9381	182.5	10.51	0.03	4.18	156	56160/125	
RVNi	19.8	8.9	1750.7	0.20	8.4	552	1582	8586	139.0	8.74	0.04	2.44	124	42780/95	
RLNi	6.5	6.9	151.7	0.07	6.4	576	398	2173	12.0	3.00	0.03	1.09	10.3	3708/8	
RVM1	22.5	4.3	85.9	0.14	4.0	336	112	609	6.8	6.05	0.02	3.50	10	2100/5	
RLM1	26	5.5	36.7	0.27	5.2	552	25	137	2.9	11.48	0.03	5.19	2.6	897/2	
RMM1	7.4	5.9	18.4	0.08	5.5	552	44	241	1.5	3.27	0.03	1.38	1.3	449/1	

Tabla 7. 3. Rendimiento de los RABEs durante el tratamiento de aguas residuales reales

Ánodo	Cátodo	AR	V	d (cm)	DQO _i (g/L)	Remoción (%)	pH	T (°C)	HPR (m ³ /m ³ rd)	CD (A/m ²)	(OER) (%)	r _{cat} (%)	EC (%)	Referencias
C papel	C tela/Pt	LS	0.9	-	0.8	85	5.7	30	0.03	4.0	27	52	58.1	Apostolopoulos, 2021
G fieltro	SS malla #60	LS	0.8	4	19.9	-	7.0	32	0.16	1.2	-	263.7	-	Rivera, 2017
G cepillo	Grafito tela/Pt	LS	0.8	2.5	4.0	-	6.3	37	0.8	0.065	-	35	120	Rago, 2016
G plano	NiO.rGO*	Melaza	1.0	-	4.4	56.6	7.0	ambiente	0.10	1.2	-	20.8	56.64	Jayabalan, 2020
G plano	Ni foam/NiMoO ₄	Melaza	1.0	-	4.2	54.4	4.5	ambiente	0.12	81.0	11.96	30	58.20	Jayabalan, 2021
C fieltro	Pt-Ir malla	Vinaza	0.45	-	3.0	36.7	7.0	37	0.24	3.4	-	-	74.00	Maron, 2016
G fieltro	Ti/Pt	Orina	0.6-1.0	-	0.6	46.1	9.1	30	48.6	25	-	87.3	97.1	Kuntke, 2014
G plano	malla SS 304	HA	0.7	2.5	8.2	72	7	23	6.56	-	51.2	58.1	88.1	Gupta, 2015
SS plisado	Cu/Ni	Melaza	0.8	2	18.0	36	3.6	ambiente	156.0	63	4.81	2606	4.18	Este trabajo
“	Cu/Ni	Vinaza	0.8	2	18.0	48.8	3.5	ambiente	124.0	18	4.58	2489	2.44	Este trabajo
“	Cu/Ni	LS	0.8	2	20.0	35.7	4.1	ambiente	10.3	242	1.1	603	1.09	Este trabajo
“	SS plano	LS	0.8	4	20.0	27.6	4.1	ambiente	2.6	22	0.07	40	5.19	Este trabajo
“	“	Melaza	0.8	4	18.0	31	3.6	ambiente	1.3	2	0.13	70	1.38	Este trabajo
“	“	Vinaza	0.8	4	18.0	24	3.5	ambiente	10	2	0.54	290	3.50	Este trabajo

*Óxido de Niquel-Óxido de grafeno; V.-voltaje; AR.-Agua residual; LS.-Lactosuero; HA.-Hidrolizado de arroz; EC.-Eficiencia culómbica; OER.-Recuperación de energía total; r_{cat}-eficiencia catódica G.-grafito

7.6. Conclusiones de la investigación con aguas reales utilizando un RABE

En este trabajo se investigó la producción de biohidrógeno a partir de dos combinaciones diferentes de electrodos en un RABE de una sola cámara, sin membrana y con un volumen de quince litros, utilizando tres aguas residuales reales con una alta conductividad. Los RABEs de mejor desempeño fueron los identificados como RMNi y RVNi que contenían el par de electrodos metálicos 304SS malla plisada #60 como ánodo y barra de Cu/Ni como cátodo. La forma “plisada” del ánodo SS304 malla #60 mostró una excelente superficie para el transporte de electrones durante la degradación de la materia orgánica mejorando las resistencias internas y disminuyendo los sobrepotenciales en el RABE, además mostró una excelente superficie para la adhesión de las bacterias electroactivas (EAB). Además, el acomodo en forma de multielectrodos aumentó la relación del área del ánodo con respecto al área del cátodo, lo que aumentó la velocidad de reducción en el cátodo para obtener hidrógeno. Estos materiales presentaron mejores actividades electrocatalíticas (alto potencial de inicio de HER y alta tasa de producción de corriente) en comparación con el otro par de electrodos (304SS malla plisada #60 y 304SS malla plana #60). Se determinó que el área del electrodo, el tipo de material, la forma del electrodo (por ejemplo, plisado, barra, plano), las comunidades de bacterias, la distancia entre los electrodos y las configuraciones (combinaciones de electrodos), jugaron un papel importante para mejorar la HER durante la producción de biohidrógeno (HPR) en un RABE alimentado con aguas residuales reales. También se observó que las biopelículas adheridas tanto en el ánodo como en el cátodo (bioelectrodos) influyeron en el rendimiento del RABE. En este trabajo se obtuvo una producción de biohidrógeno de hasta 156 m^3 de $\text{H}_2/\text{m}^3_{\text{RD}}$ con una mayor recuperación de energía total (1732 %) y una eliminación de DQO media (36%).

7.7. Conclusiones generales

El objetivo fundamental de esta investigación fue el de lograr una producción de hidrógeno que superara los $50 \text{ m}^3/\text{m}^3_{\text{RD}}$; para ello se estudiaron 3 fuentes o matrices ambientales (lodo granular anaerobio, rúmen de vaca y estiércol de vaca) y de allí, escoger la que produjese la mayor cantidad de hidrógeno, usando varias combinaciones de electrodos, de diferente material, diferente área geométrica y diferente arquitectura, para posteriormente tratar un agua residual de alta carga orgánica (melaza, vinaza y lactosuero) en una MEC y, al mismo tiempo, producir biohidrógeno primeramente a un nivel laboratorio (0.250 L) y después escalarlo a un nivel mayor (RABE de 15 L) para evaluar el comportamiento del tratamiento del agua residual, los mejores pares de electrodos y la producción de hidrógeno. El análisis de los resultados obtenidos arrojó que se logró obtener una producción de hidrógeno muy superior a los $50 \text{ m}^3/\text{m}^3_{\text{RD}}$ ($314 \text{ m}^3/\text{m}^3_{\text{RD}}$ a nivel laboratorio usando agua sintética, $396 \text{ m}^3/\text{m}^3_{\text{RD}}$ para la melaza a un nivel laboratorio y $156 \text{ m}^3/\text{m}^3_{\text{RD}}$ para la melaza a un nivel mayor (RABE). Encontrándose que, de los once pares de electrodos estudiados, el mejor desempeño electroquímico fue realizado por el par de electrodos: **malla plisada #60 acero inoxidable - Cu/Ni**, seguido por el par **malla plisada #60 acero inoxidable304 - malla plana #60 acero inoxidable304**. El mejor sustrato fue la melaza, seguido de la vinaza y por último el lactosuero. De las tres matrices ambientales estudiadas, la mayor generadora de hidrógeno, fue el **lodo granular anaerobio**. De las dos distancias (2 y 4 cm) de separación entre

electrodos estudiadas, la que generó las mayores densidades de corriente, las menores HER y las mayores producciones de hidrógeno fue la distancia de 2 cm.

7.8. Referencias

Bajracharya S, ElMekawy A, Srikanth S, Pant D. Cathodes for microbial fuel cells. K.Y. Scott, Hao Eileen (Eds.), *Microbial electrochemical and fuel cells*, Woodhead Publishing, Boston **2016** pp. 179-213. 45 (4), 2557-2568. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2019.11.142>.

Elsener B, Rossi A. Passivation of steel and stainless steel in alkaline media simulating concrete. Klaus Wandelt (Eds.), *Encyclopedia of Interfacial Chemistry*, Elsevier **2018** pp. 365-375. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-409547-2.13772-2>.

Gul H, Raza W, Lee J, Azam M, Ashraf M, Kim KH. Progress in microbial fuel cell technology for wastewater treatment and energy harvesting. *Chemosphere* **2021**, 281, 130828. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.130828>.

Jafary T, Wan Daud WR, Ghasemi M, Kim BH, Carmona-Martínez AA, Abu Bakar MH, Jahim JM, Ismail MA. Comprehensive study on development of a biocathode for cleaner production of hydrogen in a microbial electrolysis cell. *J. Clean. Prod.* **2017**, 164, 1135-1144. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2017.07.033>.

Lim SS, Fontmorin JM, Izadi P, Daud WRW, Scott K, Yu EH. Impact of applied cell voltage on the performance of a microbial electrolysis cell fully catalysed by microorganisms. *Int. J. Hydrog. Energy* **2020**,

Satar I, Abu Bakar MH, Wan Daud WR, Mohd Yasin NH, Somalu MR, Kim BH. Feasibility of Ni/Ti and Ni/GF cathodes in microbial electrolysis cells for hydrogen production from fermentation effluent: A step toward real application. *Int. J. Energy Res.* **2020**, 44, 7464-7476. <https://doi.org/10.1002/er.5466>

Tang J, Bian, Y, Jin S, Sun D, Zhiyong Jason Ren, ZJ. Cathode material development in the past decade for H₂ production from microbial electrolysis cells. *ACS Environ. Au* **2022**, 2, 20-29. <https://doi.org/10.1021/acsenvironau.1c00021>

7.9. Bibliografía

Aiken DC, Curtis TP., Heidrich ES. Avenues to the financial viability of microbial electrolysis cells [MEC] for domestic wastewater treatment and hydrogen production. *Int. J. Hydrog. Energy* **2019**, 44 (5), 2426-2434. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2018.12.029>.

Yumechris Amekan, Dyah Sekar Ayu Pudak Wangi, Muhammad Nur Cahyanto, Sarto and Jaka Widada. Effect of Different Inoculum Combination on Biohydrogen Production from Melon Fruit Waste. *Int. Journal of Renewable Energy Development* 7 (2) 2018. Vol. 14 (2) pag. 101-109. 2018. uit Waste. *Int. Journal of Renewable Energy Development*. <https://doi.org/10.14710/ijred.7.2.101-109>

M.Y. Azwar, M.A. Hussain, A.K. Abdul-Wahab. Development of biohydrogen production by photobiological, fermentation and electrochemical processes: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. <http://dx.doi.org/10.1016/j.rser.2013.11.022>

Bajracharya S, ElMekawy A, Srikanth S, Pant D. Cathodes for microbial fuel cells. K.Y. Scott, Hao Eileen (Eds.), *Microbial electrochemical and fuel cells*, Woodhead Publishing, Boston **2016** pp. 179-213. 45 (4), 2557-2568. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2019.11.142>.

Battle-Vilanova P, Puig S, Gonzalez-Olmos R, Balaguer MD, Colprim J. Continuous acetate production through microbial electrosynthesis from CO₂ with microbial mixed culture. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **2016**, 91, 921-927. <https://doi.org/10.1002/jctb.4657>.

Betania Braz Romao, Felipe Thalles Moreira Silva, Henrique Coutinho de Barcelos Costa, Felipe Santos Moreira, Juliana de Souza Ferreira, Fabiana Regina Xavier Batista, and Vicelma Luiz Cardoso. Influence of Heat Pre-Treated Inoculum and pH Control on the Hydrogen Production by Microbial Consortium. Wiley Online Library (wileyonlinelibrary.com). DOI 10.1002/ep.12672

Brar KK, Cortez AA., Pellegrini VOA, Amulya K, Polikarpov I, Magdouli S, Kumar M, Yang Y-H, Bhatia SK, Brar SK. An overview on progress, advances, and future outlook for biohydrogen production technology. *Int. J. Hydrog. Energy* **2022**, <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2022.01.156>

Gil-Carrera L, Escapa A, Mehta P, Santoyo G, Guiot SR, Morán A, Tartakovsky B. Microbial electrolysis cell scale-up for combined wastewater treatment and hydrogen production. *Bioresour. Technol.* **2013**, 130, 584-591. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.12.062>

Cercado-Quezada, Bibiana. Análisis de los factores que inciden en la producción de biohidrógeno en celdas de electrólisis microbianas. *Revista de Tecnología e Innovación* 2016, 3-8: 21-34

Chae KJ, Choi MJ, Kim KY, Ajayi FF, Chang IS, Kim IS. Selective inhibition of methanogens for the improvement of biohydrogen production in microbial electrolysis cells. *Int J Hydrog Energy* 2010. 35. 13379–86. doi: 10.1016/j.ijhydene.2009.11.114

Chandrasekhar K, Kumar AN, Kumar G, Kim D-H, Song Y-C, Kim S-H. Electro-fermentation for biofuels and biochemicals production: Current status and future directions. *Bioresour. Technol.* **2021**, 323,124598. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.124598>.

Chaurasia AK, Goyal HG, Mondal P. Hydrogen gas production with Ni, Ni-Co and Ni-Co-P electrodeposits as potential cathode catalyst by microbial electrolysis cells. *Int. J. Hydrog. Energy* **2020**, 45 (36), 18250-18265. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2019.07.175>

Chaurasia AK, Mondal P. Enhancing biohydrogen production from sugar industry wastewater using Ni, Ni-Co and Ni-Co-P electrodeposits as cathodes in microbial electrolysis cells. *Chemosphere* **2022**, 286 (3), 131728. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.131728>.

Shaoan Cheng, Bruce E. Logan. High hydrogen production rate of microbial electrolysis cell (MEC) with reduced electrode spacing. *Bioresource Technology* 102 (2011) 3571–3574. doi:10.1016/j.biortech.2010.10.025

Choi M-J, Yang E, Yu H-W, Kim IS., Oh S-E, Chae K-J. Transition metal/carbon nanoparticle composite catalysts as platinum substitutes for bioelectrochemical hydrogen production using microbial electrolysis cells. *Int. J. Hydrog. Energy* **2019**, 44 (4), 2258-2265. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2018.07.020>.

Christodoulou X, Okoroafor T, Parry S, Velasquez-Orta SB. The use of carbon dioxide in microbial electrosynthesis: Advancements, sustainability and economic feasibility. *J. CO₂ Util.* **2017**, 18, 390-399. <https://doi.org/10.1016/j.jcou.2017.01.027>

Cui W, Lu Y, Zeng C, Yao Y, Liu G, Luo H, Zhang R. Hydrogen production in single-chamber microbial electrolysis cell under high applied voltages. *Sci. Total Environ.* **2021**, 780, 1-10. 146597. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.146597>

Christian Cisneros-Pérez, Julian Carrillo-Reyes, Lourdes B. Celis, Felipe Alatríste-Mondragón, Claudia Etchebere, Elías Razo-Flores. Inoculum pretreatment promotes differences in hydrogen production performance in EGSB reactors. *International journal of hydrogen energy* 40 (2015) 6329-6339. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijhydene.2015.03.048>.

Dai HY, Yang HM, Liu X, Song XL, Liang ZH. Hydrogen production using “Direct-Starting” biocathode microbial electrolysis cell and the analysis of microbial communities. *Acta Metall. Sin. (Engl. Lett.)* **2019**, 32 (3), 297–304. <https://doi.org/10.1007/s40195-018-0785-6>.

Dange P, Pandit, S.; Jadhav, D.; Shanmugam, P.; Gupta, P. K.; Kumar, S.; Kumar, M.; Yang, Y. H.; Bhatia, S. K. Development in microbial electrolysis cell-based biohydrogen production utilizing wastewater as a feedstock. *Sustainability* **2021**, 13, 8796. <https://doi.org/10.3390/su13168796>.

Da-Wei Liang, Si-Kan Peng, Shan-Fu Lu, Yan-Yan Liu, Fei Lan, Yan Xiang. Enhancement of hydrogen production in a single chamber microbial electrolysis cell through anode arrangement optimization. *Bioresource Technology* 102 (2011) 10881–10885. doi:10.1016/j.biortech.2011.09.028.

Danko, A. S., Pinheiro, F., Abreu, Â. A., & Alves, M. M. (2008). Effect of methanogenic inhibitors, inocula type, and temperature on biohydrogen production from food components. *Environmental Engineering and Management Journal*, 7(5), 531-536. September 2008. DOI:10.30638/eemj.2008.076

Douglas Call and Bruce E. Logan. Hydrogen Production in a Single Chamber Microbial Electrolysis Cell Lacking a Membrane. *Environ. Sci. Technol.* 2008, 42, 3401–3406. DOI 10.1021/es8001822.

Elsener B, Rossi A. Passivation of steel and stainless steel in alkaline media simulating concrete. Klaus Wandelt (Eds.), *Encyclopedia of Interfacial Chemistry*, Elsevier **2018** pp. 365-375. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-409547-2.13772-2>.

A. Escapa, L. Gil-Carrera, V. García, A. Morán. Performance of a continuous flow microbial electrolysis cell (MEC) fed with domestic wastewater. *Bioresource Technology* 117 (2012) 55–62. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2012.04.060>

80.-Aguilar-González, Mariana; Buitrón, Germán; Shimada-Miyasaka, Armando; Mora-Izaguirre, Ofelia Estado actual de los sistemas bioelectroquímicos: Factibilidad de su uso para aumentar la producción ruminal de propionato. *Agrociencia*, vol. 50, núm. 2, febrero-marzo, 2016, pp. 149-166

Estrada-Arriaga EB, Hernández-Romano J, García-Sánchez L, Guillén RA, Bahena-Bahena O, Guadarrama-Pérez O, Moeller GE. Domestic wastewater treatment and power generation in continuous flow air-cathode stacked microbial fuel cell: Effect of series and parallel configuration. *J. Environ. Manage.* **2018**, 214, 232-241. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2018.03.007>.

Fan Y, Xu S, Schaller R, Jiao J, Chaplen F, Liu H. Nanoparticle decorated anodes for enhanced current generation in microbial electrochemical cells. *Biosens Bioelectron* 2011, 26. 1908–12. DOI: 10.1016/j.bios.2010.05.006

Feng H, Huang L, Wang M, Xu Y, Shen D, Li N, Chen T, Guo K. An effective method for hydrogen production in a single-chamber microbial electrolysis by negative pressure control. *Int. J. Hydrog. Energy* **2018**, 43 (37), 17556-17561. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2018.07.197>.

Khanittha Fiala, Maturros Phabjanda and Panee Maneechom. Biohydrogen Production from Xylose by Anaerobic Mixed Cultures in Elephant Dung. *Agricultural Technology and Biological Sciences. Walailak J Sci & Tech* 2015; 12(3): 267-278. <http://wjst.wu.ac.th>

Folusho, F. (2010). Effect of hydrodynamic force and prolonged oxygen exposure. *international journal of hydrogen energy*, 35(8), 3206–3213. doi:10.1016/j.ijhydene.2010.01.057

Fudge T, Bulmer I, Bowman K, Pathmakanthan S, Gambier W, Dehouche Z, Al-Salem S M, Constantinou A. Microbial electrolysis cells for decentralized wastewater treatment: the next steps. *Water* **2021**, 13, 445. <https://doi.org/10.3390/w13040445>

Fujian Li, Weifeng Liu, Yi Sun, Weijun Ding, Shaoan Cheng. Enhancing hydrogen production with Ni-P coated nickel foam as cathode catalyst in single chamber

microbial electrolysis cells. *International journal of hydrogen energy* 42 (2017) 3641-3646
<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijhydene.2016.10.163>

González-Ugalde, C; Durán-Herrera, J. Formación acelerada de gránulos productores de hidrógeno para el arranque de reactores UASB utilizando vinazas. *Tecnología en Marcha*. Vol. 27, Nº 1. Pág 38-47. DOI: 10.18845/tm.v27i1.1694

Gul H, Raza W, Lee J, Azam M, Ashraf M, Kim KH. Progress in microbial fuel cell technology for wastewater treatment and energy harvesting. *Chemosphere* **2021**, 281, 130828.
<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.130828>.

Guo K, PrévotEAU A, Rabaey K. A novel tubular microbial electrolysis cell for high rate hydrogen production. *J. Power Sources* **2017**, 356, 484-490. <https://doi.org/10.1016/j.jpowsour.2017.03.029>

Gupta, P, Parkhey P. Design of a single chambered microbial electrolytic cell. *Biotechnol. Lett.* **2015**, 37, 1213-1219. doi:10.1007/s10529-015-1780-x

Hamza RA, Oliver T, Tay JH. Advances in biological systems for the treatment of high-strength wastewater. *J. Water Process Eng.* **2016**, 10, 128-142. <https://doi.org/10.1016/j.jwpe.2016.02.008>.

Hawkes FR, Hussy I, Kyazze G, Dinsdale R, Hawkes DL. Continuous dark fermentative hydrogen production by mesophilic microflora: principles and progress. *Int J. Hydrogen Energy* 2007 32:172–84. doi:10.1016/j.ijhydene.2006.08.014

Holladay JD, Hu J, King DL, Wang Y. An overview of hydrogen production technologies. *Catal Today* 2009;139:244–60. Doi: 10.1016/j.cattod.2008.08.039

78.-S. Hrapovic, M.-F. Manuel, J.H.T. Luong, S.R. Guiot, B. Tartakovsky. Electrodeposition of nickel particles on a gas diffusion cathode for hydrogen production in a microbial electrolysis cell. *International journal of hydrogen energy* 35 (2010) 7313-7320. doi:10.1016/j.ijhydene.2010.04.146

Hongqiang Hu, Yanzhen Fan, Hong Liu. Hydrogen production in single-chamber tubular microbial electrolysis cells using non-precious-metal catalysts. *international journal of hydrogen energy* 34 (2009) 8535–8542. doi:10.1016/j.ijhydene.2009.08.011

II. Jacobo S. Abreu Sherrer (2013). *Aprovechamiento de Bagazo de Agave tequilana Weber para la producción de biohidrógeno*. Tesis de maestría. Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica (IPICYT).

Jafary T, Wan Daud WR, Ghasemi M, Kim BH, Carmona-Martínez AA, Abu Bakar MH, Jahim JM, Ismail MA. Comprehensive study on development of a biocathode for cleaner production of hydrogen in a microbial electrolysis cell. *J. Clean. Prod.* **2017**, 164, 1135-1144. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2017.07.033>.

Jayabalan T, Matheswaran M, Preethi V, Mohamed SN. Enhancing biohydrogen production from sugar industry wastewater using metal oxide/graphene nanocomposite catalysts in microbial electrolysis cell. *Int. J. Hydrog. Energy* **2020**, 45 (13), 7647-7655. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2019.09.068>.

Jayabalan T, Matheswaran M, Radhakrishnan TK, Mohamed SN. Influence of Nickel molybdate nanocatalyst for enhancing biohydrogen production in microbial electrolysis cell utilizing sugar industrial effluent. *Bioresour. Technol.* **2021**, 320 Part A, 124284. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.124284>

Jeremiasse AW, Bergsma J, Kleijn JM, Saakes M, Buisman JN, Cohen-Stuart M, Hamelers VM. Performance of metal alloys as hydrogen evolution reaction. *Int. J. Hydrog. Energy* **2011**, 36, 10482-10489. doi: 10.1016/j.ijhydene.2011.06.013

Jeremiasse AW, Hamelers HVM, Buisman CJN. Microbial electrolysis cell with a microbial biocathode. *Bioelectrochemistry* **2010**, 78 (1), 39-43. <https://doi.org/10.1016/j.bioelechem.2009.05.005>

Kadier A, Wang J, Chandrasekhar K, Abdesahian P, Islam MA, Ghanbari F, Bajpai M, Katoch SS, Bhagawati PB, Li H, Kalil MS, Hamid AA, Hasan HA, Ma PC. Performance optimization of microbial electrolysis cell (MEC) for palm oil mill effluent (POME) wastewater treatment and sustainable Bio-H₂ production using response surface methodology (RSM). *Int. J. Hydrog. Energy* **2022**, 47 (34), 15464-15479. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2021.09.259>

Keruthiga K, Mohamed SN, Gandhi NN, Muthukumar K. Sugar industry waste-derived anode for enhanced biohydrogen production from rice mill wastewater using artificial photo-assisted microbial electrolysis cell. *Int. J. Hydrog. Energy* **2021**, 46 (39) 20425-20434. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2021.03.181>.

M.Z. Khan, A.S. Nizami, M. Rehan, O.K.M. Ouda, S. Sultana, I.M. Ismail, K. Shahzad
Microbial electrolysis cells for hydrogen production and urban wastewater treatment: A case study of Saudi Arabia. *Applied Energy* 185 (2017) 410–420. <http://dx.doi.org/10.1016/j.apenergy.2016.11.005>

Khongkliang P, Jehlee A, Kongjan P, Reungsang A, O-Thong S. High efficient biohydrogen production from palm oil mill effluent by two-stage dark fermentation and microbial electrolysis under thermophilic condition. *Int. J. Hydrog. Energy* **2019**, 44 (60), 31841-31852. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2019.10.022>.

Gopalakrishnan Kumar, Péter Bakonyi, Guangyin Zhen, Periyasamy Sivagurunathan, László Koók, Sang-Hyoun Kim, Gábor Tóth, Nándor Nemestóthy, Katalin Bélafi-Bakó. Microbial electrochemical systems for sustainable biohydrogen production: Surveying the experiences from a start-up viewpoint. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* Volume 70, April 2017, Pages 589-597. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2016.11.107>

P. Kuntke, T.H.J.A. Sleutels, M. Saakes, C.J.N. Buisman. Hydrogen production and ammonium recovery from urine by a Microbial Electrolysis Cell. *International journal of hydrogen energy* 39 (2014) 4771-4778. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijhydene.2013.10.089>

Godfrey Kyazze, Arseniy Popov, Richard Dinsdale, Sandra Esteves, Freda Hawkes, Giuliano Premier, Alan Guwy. Influence of catholyte pH and temperature on hydrogen production from acetate using a two chamber concentric tubular microbial electrolysis cell. *international journal of hydrogen energy* 35 (2010) 7716-7722. doi: 10.1016/j.ijhydene.2010.05.036.

Xiaohu Li, Ruizhe Zhang, Yawei Qian, Irini Angelidaki, Yifeng Zhang. The impact of anode acclimation strategy on microbial electrolysis cell treating hydrogen fermentation effluent. *Bioresource Technology* 236 (2017) 37–43. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2017.03.160>.

Lim SS, Fontmorin JM, Izadi P, Daud WRW, Scott K, Yu EH. Impact of applied cell voltage on the performance of a microbial electrolysis cell fully catalysed by microorganisms. *Int. J. Hydrog. Energy* **2020**, 45 (4), 2557-2568. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2019.11.142>.

I. A. López-López, G. Dávila-Vázquez, E. León-Becerril, E. Villegas-García, J. Gallardo-Valdez (2010). “Tequila Vinasses: Generation and Full Scale Treatment Processes”. *Reviews Environmental Science and Biotechnology*, (9) 2, 109-116. DOI:10.1007/s11157-010-9204-9.

Ma S, Wang H, Wang Y, Bu H, Bai J. Bio-hydrogen production from cornstalk wastes by orthogonal design method. *Renew. Energy* **2011**, 36 (2), 709-713. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2010.08.019>.

Ian S. McKay, Jay A. Schwalbe, Emmett D. Goodman, Joshua J. Willis, Arun Majumdar and Matteo Cargnello. Elucidating the synergistic mechanism of nickel–molybdenum electrocatalysts for the hydrogen evolution reaction. Cambridge University Press: 30 August 2016. doi: <https://doi.org/10.1557/mrc.2016.27>

Tania Méndez Romero. Diseño conceptual y análisis de factibilidad tecno-económica de una biorrefinería a partir de melaza de caña de azúcar. Tesis 2020. UMSNH. México.

Muddasar M, Liaquat R, Aslam A, Rahman MZU, Abdullah A, Khoja AH, Latif K, Bahadar A. Performance efficiency comparison of microbial electrolysis cells for sustainable production of biohydrogen—A comprehensive review. *Int. J. Energy Res.* **2022**, 46(5), 5625- 5645. doi:10.1002/er.7606.

M. Elvira Sandoval R. Tratamiento de vinazas provenientes de etanol en un reactor de lecho fluidizado inverso. Tesis. Universidad politécnica de Madrid. 2015.

Mutamim NSA, Noor ZZ, Hassan MAA, Olsson G. Application of membrane bioreactor technology in treating high strength industrial wastewater: a performance review. *Desalination* **2012**, 305, 1-11. <https://doi.org/10.1016/j.desal.2012.07.033>.

Elisa Navarro-Flores Zhiwen Chong Sasha Omanovic. Characterization of Ni, NiMo, NiW and NiFe electroactive coatings as electrocatalysts for hydrogen evolution in an acidic médium. *Journal of Molecular Catalysis A: Chemical*. Volume 226, Issue 2, 15 February 2005, Pages 179-197. <https://doi.org/10.1016/j.molcata.2004.10.029>

Nikolaidis P, Poullikkas A. A comparative overview of hydrogen production processes. *Renew. Sustain. Energy Rev.* **2017**, 67, 597-611. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2016.09.044>

Pan M, Su Y, Zhu X, Pan G, Zhang Y, Angelidaki I. Bioelectrochemically assisted sustainable conversion of industrial organic wastewater and clean production of microalgal protein. *Resour. Conserv. Recycl.* **2021**, 168, 105441. <https://doi.org/10.1016/j.resconrec.2021.105441>

Park SG, Rajesh PP, Sim Y-Uk, Jadhav DA, Tabish Noori, Md, Kim DH, Al-Qaradawi SY, Yang E, Jang JK, Chae KJ. Addressing scale-up challenges and enhancement in performance of hydrogen-producing microbial electrolysis cell through electrode modifications. *Energy Reports* **2022**, 8, 2726-2746. <https://doi.org/10.1016/j.egy.2022.01.198>.

Piyush Parkhey, Pratima Gupta. Improvisations in structural features of microbial electrolytic cell and process parameters of electrohydrogenesis for efficient biohydrogen production: a review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 69 (2017) 1085–1099. <http://dx.doi.org/10.1016/j.rser.2016.09.101>

Paz Mireles, Claudia Lizeth “Efecto de la composición de mezclas de metabolitos procedentes de la fermentación oscura para su uso en la producción de biohidrógeno en celdas de electrólisis microbiana”. Tesis de maestría. IPICYT)

Posadas-Hernández, M. García-Rojas, J.L. Khamkure, Sasirot. García-Sánchez, L. Gutierrez-Macías, T. Morales-Morales, Estrada-Arriaga E. B. Enhanced biohydrogen production in a membraneless single-chamber microbial electrolysis cell during high-strength wastewater treatment: Effect of electrode materials and configurations. **2023** <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2022.09.270>

Poveda E. Elpidia Suero lácteo, generalidades y potencial uso como fuente de calcio de alta biodisponibilidad. *Revista Chilena de Nutrición* [en línea]. 2013, 40(4), 397-403[fecha de Consulta 7 de Noviembre de 2022]. ISSN: 0716-1549. Disponible en: <https://www.redalyc.org/articulo.oaid=46929416011>

Qyyum MA, Ihsanullah I, Ahmad R, Ismail S, Khan A, Nizami A-S, Tawfik Ahmed. Biohydrogen production from real industrial wastewater: Potential bioreactors, challenges in commercialization and future directions. *Int. J. Hydrog. Energy* **2022**, <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2022.01.195>.

Rabaey, K., and R. A. Rozendal. 2010. Microbial electrosynthesis-revisiting the electrical route for microbial production. *Nat. Rev. Microbiol.* 8: 706-716. doi: 10.1038/nrmicro2422

Reguera, G., K. D. McCarthy, T. Mehta, J. S. Nicoll, M. T. Tuominen, and D. R. Lovley. 2005. Extracellular electron transfer via microbial nanowires. *Nature*. 435: 1098-1101. doi: 10.1038/nature03661

Rivera I, Bakonyi P, Cuautle-Marín MA, Buitrón G. Evaluation of various cheese whey treatment scenarios in single-chamber microbial electrolysis cells for improved biohydrogen production. *Chemosphere* **2017**, 174, 253-259. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.01.128>.

Roque BM, Brooke CG, Ladau J, Polley T, Marsh LJ, Najafi N, Pandey P, Singh L, Kinley R, Salwen JK, Eloe-Fadrosh E, Kebreab E, Hess M. Effect of the macroalgae *Asparagopsis taxiformis* on methane production and rumen microbiome assemblage. *Anim. microbiome* **2019**, 1, 3. <https://doi.org/10.1186/s42523-019-0004-4>.

Raphaël Rousseau, Luc Etcheverry, Emma Roubaud, Régine Basséguy, Marie-Line Délia, Alain Bergel. Microbial electrolysis cell (MEC): strengths, weaknesses and research needs from electrochemical engineering standpoint. 2019. <https://www.elsevier.com/open-access/userlicense/1.0/>

Rozendal RA, Hamelers VMH, Rabaey K, Keller J, Buisman CJN. Towards practical implementation of bioelectrochemical wastewater treatment. *Trends Biotechnol.* **2008**, 26(8), 450-459. doi: 10.1016/j.tibtech.2008.04.008

Rozendal RA, Jeremiassé AW, Hamelers HVM, Buisman CJN. Hydrogen production with a microbial biocathode. *Environ. Sci. Technol.* **2008**, 42, 629-34. <https://doi.org/10.1021/es071720+>.

Sánchez-Peña P, Rodríguez J, Gabriel D, Baeza JA, Guisasola A, Baeza M. Graphene functionalization with metallic Pt nanoparticles: A path to cost-efficient H₂ production in microbial electrolysis cells. *Int. J. Hydrog. Energy* **2022**, 47 (34), 15397-15409. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2022.03.078>.

Satar I, Abu Bakar MH, Wan Daud WR, Mohd Yasin NH, Somalu MR, Kim BH. Feasibility of Ni/Ti and Ni/GF cathodes in microbial electrolysis cells for hydrogen production from fermentation effluent: A step toward real application. *Int. J. Energy Res.* **2020**, 44, 7464-7476. <https://doi.org/10.1002/er.5466>

Priscilla A. Selembo, Matthew D. Merrill, Bruce E. Logan. Hydrogen production with nickel powder cathode catalysts in microbial electrolysis cells. *international journal of hydrogen energy* 35 (2010) 428-437. doi: 10.1016/j.ijhydene.2009.11.014

Raymond A. Serway - Emeritus, James Madison University John W. Jewett - California State Polytechnic University, Pomona. *Physics for Scientists and Engineers*. ISBN 0534408427. 1296 pages. Thomson Brooks/Cole © 2004. 6th Edition. Consultado Nov. 25 de 2019.

Shen R, Liu Z, He Y, Zhang Y, Lu J, Zhu Z, Si B, Zhang C, Xing X-H. Microbial electrolysis cell to treat hydrothermal liquefied wastewater from cornstalk and recover hydrogen: Degradation of organic compounds and characterization of microbial community. *Int. J. Hydrog. Energy* **2016**, 41(7), 4132-4142. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2016.01.032>.

Shin HS, Youn JH, Kim SH. Hydrogen production from food waste in anaerobic mesophilic and thermophilic acidogenesis. *Int J. Hydrogen Energy* 2004. 29.1355-63. doi: 10.1016/j.ijhydene.2003.09.011

Katerina Stamatelatou, Georgia Antonopoulou, Asimina Tremouli, and Gerasimos Lyberatos. Production of Gaseous Biofuels and Electricity from Cheese Whey. *Ind. Eng. Chem. Res.* 2011, 50, 639-644. doi:10.1021/ie1002262

Min Sun, Lin-Feng Zhai, Wen-Wei Li, Han-Qing Yu. Harvest and utilization of chemical energy in wastes by microbial fuel cells. *Chem Soc Rev* 2016. 45. 2847-70. doi: 10.1039/c5cs00903k.

Tak SS, Shetye O, Muley O, Jaiswal H, Malik SN. Emerging technologies for hydrogen production from wastewater. *Int. J. Hydrog. Energy* **2022**, <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2022.06.225>.

Tang J, Bian, Y, Jin S, Sun D, Zhiyong Jason Ren, ZJ. Cathode material development in the past decade for H₂ production from microbial electrolysis cells. *ACS Environ. Au* **2022**, 2, 20-29. <https://doi.org/10.1021/acsenvironau.1c00021>

B. Tartakovsky, M.-F. Manuel, H. Wang, S.R. Guiot. High rate membrane-less microbial electrolysis cell for continuous hydrogen production. *international journal of hydrogen energy* 34 (2009) 672-677. doi: 10.1016/j.ijhydene.2008.11.003.

B. Tartakovsky, P. Mehta, G. Santoyo, S.R. Guiot. Maximizing hydrogen production in a microbial electrolysis cell by real-time optimization of applied voltage. *international journal of hydrogen energy* 36 (2011) 10557-10564. doi: 10.1016/j.ijhydene.2011.05.162

Esra Telli. Copper – Zinc and Copper-Iron Binary Electrode for Hydrogen Evolution Reaction. *SAKARYA UNIVERSITY JOURNAL OF SCIENCE*. e-ISSN: 2147-835X. doi:10.16984/saufenbilder.310429

Vargas C. Yury A., Liliana Ibeth Pérez, L. Ibeth. aprovechamiento de residuos agroindustriales para el mejoramiento de la calidad del ambiente. homepage: <http://revistas.unimilitar.edu.co/index.php/rfcb>. Vol. 14 (1) 2018, 59-72 <http://dx.doi.org/10.18359/rfcb.3108>

L. Vereá, Oumarou Savadogo, A. Verde, J. Campos, F. Ginez, P.J. Sebastian. Performance of a microbial electrolysis cell (MEC) for hydrogen production with a new process for the biofilm formation. *International journal of hydrogen energy* 39 (2014) 8938-8946. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijhydene.2014.03.203>

L. Wang, Y. Chen, Y. Ye, B. Lu, S. Zhu and S. Shen. Evaluation of low-cost cathode catalysts for high yield biohydrogen production in microbial electrolysis cell. *Water Science & Technology* 9 63.3 9 2011. doi: 10.2166/wst.2011.241

Wang Y, Zhao Y, Wu A, Dong Z, Li J, Wang J. Hydrogen production using electrodeposited Ni and Ni/Co on carbon paper as cathode catalyst in microbial electrolysis cells. *Int. J. Electrochem. Sci.* **2018**, 13, 10848 – 10858. doi:10.20964/2018.11.71S

Wu T, Zhu G, Jha AK, Zou R, Liu L, Huang X, Liu C. Hydrogen production with effluent from an anaerobic baffled reactor (ABR) using a single-chamber microbial electrolysis cell (MEC). *Int. J. Hydrog. Energy* **2013**, 38 (25), 11117-11123. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2013.03.029>.

Yang N, Hafez H, Nakhla G. Impact of volatile fatty acids on microbial electrolysis cell performance. *Bioresour. Technol.* **2015**, 193, 449-455. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.06.124>

Yejie Ye, Liyong Wang, Yingwen Chen, Shemin Zhu and Shubao Shen. High yield hydrogen production in a single-chamber membrane-less microbial electrolysis cell. *Water Science & Technology—WST* | 61.3 | 2010. doi: 10.2166/wst.2010.900

Yu B, Feng L, He Y, Yang L, Xun Y. Effects of anode materials on the performance and anode microbial community of soil microbial fuel cell. *J. Hazard. Mater.* **2021**, 401, 123394. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2020.123394>

Yuan H, He Z. Platinum group metal-free catalysts for hydrogen evolution reaction in microbial electrolysis cells. *The Chemical Record* **2017**, 17(7), 641-652. <https://doi.org/10.1002/tcr.201700007>.

Zhang F, Wei Y, Li G. Principle and product overview of bioelectrosynthesis. In *Bioelectrosynthesis* **2020** (eds A. Wang, W. Liu, B. Zhang and W. Cai). <https://doi.org/10.1002/9783527343829.ch1>

Zhang Y, Merrill MD, Logan BE. The use and optimization of stainless steel mesh cathodes in microbial electrolysis cells. *Int. J. Hydrog. Energy* **2010**, 35 (21), 12020-12028. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2010.08.064>.

Zhao N, Liang D, Meng S, Li X. Bibliometric and content analysis on emerging technologies of hydrogen production using microbial electrolysis cells. *Int. J. Hydrog. Energy* **2020**, 45 (58), 33310-33324. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2020.09.104>.

Zhi Z, Pan Y, Lu X, Zhen G, Zhao Y, Zhu X, Xiong J, Zhao T. Electrically regulating co-fermentation of sewage sludge and food waste towards promoting biomethane production and mass reduction. *Bioresour. Technol.* **2019**, 279, 218-227. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.01.142>.

Zumar M.A. Bundhoo. Coupling dark fermentation with biochemical or bioelectrochemical systems for enhanced bio-energy production: A review. international journal of hydrogen energy. Vol. 42 (2017) pags. 26667-26686 <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2017.09.050>