



**Centro de Investigación Científica de Yucatán, A. C.**

**Posgrado en Energía Renovable**

**Generación de Hidrógeno en una Celda de Electrólisis Microbiana  
(CEM) utilizando dos configuraciones: Catalizada por Platino y un  
Biocátodo.**

**Tesis que presenta**

**LIMBERG ALEJANDRO GÓMEZ ROQUE**

**En la opción al título de**

**MAESTRO EN CIENCIAS EN ENERGÍA RENOVABLE**

**Mérida, Yucatán, México**

**Noviembre 2011**



Declaro que la información contenida en la sección de Materiales y Métodos, los Resultados y Discusión de este documento proviene de las actividades de experimentación realizadas durante el periodo que se me asignó para desarrollar mi trabajo de tesis de maestría, en los laboratorios de la Unidad de Energía Renovable, del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A. C., y que dicha información le pertenece en términos de la Ley de la Propiedad Industrial, por lo que no me reservo ningún derecho sobre ello.

Mérida, Yucatán, México

Noviembre de 2011.

---

Limberg Alejandro Gómez Roque





El trabajo de tesis titulado “Generación de Hidrógeno en una Celda de Electrólisis Microbiana (CEM) utilizando dos configuraciones: Catalizada por Platino y un Biocátodo”, fue desarrollado por el estudiante Limberg Alejandro Gómez Roque en el laboratorio USF15 de la Unidad de Energía Renovable del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A. C., bajo la asesoría de la Dra. Liliana Alzate Gaviria y la coasesoría Dra. Tatiana Romero Castañón del Instituto de Investigaciones Eléctricas (Cuernavaca, Morelos, México), en el programa de Maestría en Ciencias en Energía Renovable de este Centro de Investigación.

---

Dr. Oscar A. Moreno Valenzuela

Director Académico

Centro de Investigación Científica de Yucatán, A. C.



## AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Liliana Alzate Gaviria por dedicar su tiempo y esfuerzo a la supervisión y desarrollo de la tesis. Al técnico y amigo M. C. Jorge A. Domínguez Maldonado por su disposición y apoyo incondicional a lo largo de toda mi maestría y al Dr. Manuel Flota.

A la Dra. Tatiana Romero Castañón por darme la oportunidad de trabajar en el Laboratorio de Hidrógeno y Celdas de Combustible del Instituto de Investigaciones Eléctricas (IIE), por brindarme siempre su apoyo y por aceptar la coasesoría de esta tesis. De igual manera agradezco a Félix Loyola, Roberto y Jorge por su ayuda y amabilidad que siempre me mostraron durante mi estancia.

A la Dra. Virginia A. Herrera Valencia y al Dr. Felipe de Jesús Díaz Ballote por sus observaciones y sugerencias y por aceptar formar parte de mi comité tutorial. De igual manera agradezco a la Dra. Ruby Alejandra Valdez Ojeda y al Dr. Luis Rodríguez Gil por el tiempo dedicado en la revisión de esta tesis.

Al Ing. Gabriel Pool Balam del Departamento de Instrumentación del CICY por su ayuda en la construcción de equipos necesarios para este proyecto y por su asesoría técnica.

A mis compañeros y amigos de laboratorio (alfabéticamente): Alberto Zumárraga, Diana Sánchez, Merly Arguello, Nancy Eb, Pablo Villegas, Roberto Us y Santiago Franco. También quiero agradecer a Javier Moreno de la Universidad Politécnica de Chiapas por el apoyo en el inicio y operación de las CEM y al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el apoyo otorgado número 236006.

Por último agradezco a mis padres, hermanos y tíos por continuar brindándome su apoyo en cada una de mis metas y sobre todo en mi formación profesional.





## INDICE GENERAL

RESUMEN.....	ix
ABSTRACT .....	x
GLOSARIO Y ABREVIATURAS .....	xi
CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 JUSTIFICACIÓN.....	4
1.2 OBJETIVOS.....	4
1.2.1 Objetivo general .....	4
1.2.3 Objetivos específicos.....	5
1.3 HIPÓTESIS .....	5
CAPÍTULO 2: ANTECEDENTES .....	6
2.1 Hidrógeno generado a partir de fermentación anaerobia.....	6
2.2 Generación de hidrógeno en Celdas de Electrólisis Microbianas .....	11
2.3 Microorganismos electroquímicamente activos.....	14
2.3.1 Mecanismos de transferencia de electrones.....	15
2.3.2 Consorcios microbianos y syntrofia .....	21
2.4 Inicio y operación de una CEM.....	22
2.4.1 Inóculo y Sustrato.....	22
2.4.2 Componentes y operación de la CEM .....	22
2.5 Cátodos en sistemas CEM.....	23
2.5.1 CEM catalizadas por platino.....	24
2.5.2 CEM catalizadas por otros materiales .....	28
2.5.3 CEM catalizada por un biocátodo .....	29
CAPÍTULO 3: METODOLOGÍA.....	36
3.1 Diseño, construcción y ensamble de la CEM.....	36
3.2 Sustrato e inóculo .....	39
3.3 Demanda Química de Oxígeno (DQO) .....	39
3.4 Medición del potencial de hidrógeno (pH).....	39
3.5 Caracterización y medición del gas generado .....	40
3.6 Análisis electroquímico .....	41
3.7 Inicio y operación.....	42



3.7.1 CEM Pt .....	42
3.7.2 CEM b .....	43
CAPÍTULO 4: RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	45
4.1 CEM Pt .....	45
4.1.1 Medición del pH en CEM Pt .....	46
4.1.2 Análisis electroquímico .....	48
4.1.3 Generación de H <sub>2</sub> y otros gases .....	52
4.1.4 Comunidad microbiana .....	58
4.1.5 Análisis de DQO.....	59
4.2 CEM b .....	59
4.2.1 Pruebas preliminares para la formación del biocátodo.....	59
4.2.2 Formación del biocátodo en CEM b.....	62
4.2.3 CEM b catalizada por un biocátodo y generación de H <sub>2</sub> .....	67
CAPÍTULO 5: CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS .....	71
5.1 Conclusiones.....	71
5.2 Perspectivas .....	72
BIBLIOGRAFÍA.....	73

## INDICE DE TABLAS

Tabla 1. CEM catalizadas con Pt y otros materiales. ....	34
Tabla 2. CEM catalizadas con Pt y alimentadas con acetato.....	56
Tabla 3. Resultados obtenidos en CEM b. ....	68



## INDICE DE FIGURAS

Figura 1.1. Representación esquemática de producción de hidrógeno a través de la electrólisis microbiana.....	2
Figura 2.1. Diagrama de la fermentación anaerobia para la producción de hidrógeno .....	7
Figura 2.2. Descripción general de las posibles rutas metabólicas durante la fermentación anaerobia de la glucosa.....	9
Figura 2.3. Potencial redox a pH 7 del par redox NADH/NAD y el potencial redox estándar a pH 7 de los pares redox formato/HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> y F <sub>dred</sub> /F <sub>dox</sub> , trazado con respecto a la presión parcial de hidrógeno a la cual pueden ser oxidados para producir hidrógeno.....	10
Figura 2.4. Transferencia de electrones por contacto directo.....	17
Figura 2.5. Transferencia de electrones por mediadores redox .....	18
Figura 2.6. Imagen de la estructura de los nanocables de <i>Shewanella oneidensis</i> MR-1 obtenida por Microscopía Electrónica de Barrido .....	21
Figura 2.7. Diagrama de CCM y CEM.....	12
Figura 2.8. Fotografía de una CEM.....	23
Figura 2.9 Esquema general y fotografía del proceso CEM con un voltaje aplicado usando una fuente de poder y un Multímetro conectado a un monitor de voltaje a través de un resistor óhmico .....	25
Figura 2.10. Sistema de una sola cámara y elementos que la componen .....	26
Figura 2.11. CEM estudiada por Ditzig <i>et al.</i> (2007) y Potencial anódico con respecto a la concentración del agua residual.....	27
Figura 2.12. Procedimiento para la obtención del biocátodo. ....	31
Figura 2.13. Biocátodo controlado a un potencial de -0.7 V (vs. EEH) en una media celda .....	32
Figura 2.14. Biocátodo y bioánodo en una CEM .....	33



Figura 3.1. Esquema de la CEM empleada en este estudio.....	37
Figura 3.2. Fotografía del prototipo de este estudio y prototipo armado y en funcionamiento. ....	38
Figura 3.3. Electrodo de tela de carbón sujetos con malla de acero inoxidable como cable conductor.....	38
Figura 3.4. MilligasCounter® MGC-1 y MilligasCounter® acoplado a la CEM Pt.....	40
Figura 3.5. (A)Fuente de poder utilizada en el presente estudio y Potenciostato BioLogic® SAS VSP 400. ....	41
Figura 3.6. Tanque de hidruro metálico con 20L de capacidad. ....	43
Figura 4.1. Desarrollo del potencial en función del tiempo de CEM Pt.....	45
Figura 4.2. Comportamiento de pH en la CEM Pt.....	47
Figura 4.3. Voltamperogramas cíclicos del ánodo de CEM Pt. ....	49
Figura 4.5. Generación de H <sub>2</sub> en el cátodo de CEM Pt.....	53
Figura 4.6. Cromatograma de la cámara catódica en CEM Pt durante la Fase II.....	53
Figura 4.7. Cronoamperometría durante 24 h y a un potencial de 0.9V .....	54
Figura 4.8. Carga generada durante 24 h y a un potencial de 0.9V.....	55
Figura 4.9. Cambio en el color del anolito. ....	58
Figura 4.10. Pruebas preliminares para la formación del biocátodo a +0.34V (vs. EEH) durante 24 h. ....	60
Figura 4.11. Pruebas preliminares para la formación del biocátodo. ....	61
Figura 4.12. Desarrollo de la corriente durante la formación del biocátodo en CEM b.....	62
Figura 4.13. Barrido para la inversión de la polaridad del bioelectrodo de -0.2 a -0.8V vs. EEH a 0.025 mV/S y barrido obtenido por Rozendal <i>et al.</i> (2008) de iguales características de operación.....	64
Figura 4.14. Corriente generada con un potencial aplicado de -0.7 V. ....	66





Figura 4.15. Curva de polarización de CEM b totalmente biológica. ....	68
Figura 4.16. Comparativa de volúmenes de H <sub>2</sub> obtenidos entre Rozendal <i>et al.</i> (2008), Jeremiasse <i>et al.</i> (2010) y en CEM b a 1 V. ....	69



## RESUMEN

Las Celdas de Electrólisis Microbianas (CEM) son dispositivos biológicos que ofrecen una nueva manera de producir hidrógeno electrolizando cualquier tipo de materia orgánica por la acción de microorganismos electroquímicamente activos y un potencial externo (entre 0.22 y 1 V). Las CEM requieren de un catalizador para que se forme el hidrógeno, siendo el platino el de mayor uso en estos dispositivos. Sin embargo, el uso del platino encarece el sistema y disminuye su desempeño (envenenamiento) si se expone a compuestos como CO, CO<sub>2</sub> y sulfuros. En el presente estudio se utilizaron dos tipos de catalizadores: platino (CEM Pt) y un biocátodo obtenido mediante una técnica electroquímica que permitió revertir la reacción de la enzima hidrogenasa presente en los microorganismos electroquímicamente activos, por lo que fue posible convertir un bioánodo en un biocátodo generador de hidrógeno (CEM b). CEM Pt (0.5 mg/cm<sup>2</sup>, 10%Pt/C) generó 0.032 m<sup>3</sup> de H<sub>2</sub>/m<sup>3</sup> de volumen del líquido del reactor / día a un potencial de 0.9 V y CEM b generó 0.010 m<sup>3</sup> de H<sub>2</sub>/m<sup>3</sup> de volumen del líquido del reactor / día, a un potencial de 1 V.



## ABSTRACT

Microbial Electrolysis Cells (CEM) are biological devices that offer a new way to produce hydrogen electrolyzing any type of organic matter by the action of electrochemically active microorganisms and an external potential (between 0.22 and 1 V). The CEM require a catalyst to form hydrogen, being platinum the most widely used in these devices. However, platinum is expensive and performance may decrease (poisoning) when it is exposed to compounds such as CO, CO<sub>2</sub> and sulfides. In the present study two types of catalysts were used: platinum (CEM Pt) and a biocathode using a technique that was allowed to reverse electrochemical reaction of hydrogenase enzyme present in the electrochemically active microorganisms, so it was possible to convert a bioanode to biocathode hydrogen generator (CEM b). CEM Pt (0.5 mg/cm<sup>2</sup>, 10% Pt / C) generated H<sub>2</sub> 0.032 m<sup>3</sup> / m<sup>3</sup> of liquid reactor volume / day at a potential of 0.9 V and CEM b generated H<sub>2</sub> 0.010 m<sup>3</sup> / m<sup>3</sup> liquid volume reactor / day at a potential of 1 V.



## GLOSARIO Y ABREVIATURAS

**AEM:** *Anion Exchange Membrane*. Membrana de Intercambio Aniónico.

**Ánodo:** Electrodo en el cual se produce la reacción de oxidación.

**ATP:** Adenosintrifosfato. Biomolécula energética básica del metabolismo celular.

**Biopelícula:** Capas múltiples de microorganismos.

**Cátodo:** Electrodo en el que se produce una reacción de reducción.

**CCM:** Celda de Combustible Microbiana.

**CEM:** Celda de Electrólisis Microbiana.

**DQO:** Demanda Química de Oxígeno. Se utiliza para medir el grado de contaminación de una muestra de acuerdo con la cantidad de sustancias susceptibles a ser oxidadas por medios químicos.

**EEH:** Electrodo Estándar de Hidrógeno. Electrodo utilizado como referencia en mediciones de potencial redox.

**Enzima:** Proteína que tiene función de catalizador biológico.

**ESC:** Electrodo Saturado de Calomel. Electrodo utilizado como referencia en pruebas electroquímicas. Tiene un valor de +0.244 vs. EEH.

**Fdox/red:** Ferredoxina oxidada o reducida. Es una proteína capaz de sufrir oxidorreducción reversible por transferencia de electrones.





**FEM:** Fuerza electromotriz. Fuerza que mantiene una diferencia de potencial entre dos puntos de un circuito.

**Inóculo:** Microorganismos vivos de cualquier naturaleza con capacidad de reproducirse en un medio específico.

**NAD<sup>+</sup>:** Dinucleótido de Nicotinamida Adenina. Coenzima en forma oxidada encargada del transporte de electrones para la producción de energía celular.

**NADH:** Forma reducida del Nucleótido de Nicotinamida Adenina.

**PEM:** *Protonic Exchange Membrane*. Membrana de Intercambio Protónico.

**TRH:** Tiempo de Retención Hidráulico. Parámetro que indica el tiempo de permanencia de un fluido sobre un volumen fijo.



## CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN

El uso del hidrógeno para ser empleado con fines energéticos ha sido una tarea compleja ya que no existen fuentes naturales para la extracción de este gas. Para generarlo de forma industrial es necesario llevar a cabo la ruptura de la molécula del agua mediante electrólisis o a partir del reformado del gas natural [1]. En la actualidad el hidrógeno juega un papel importante en la industria, tal como la química, la petroquímica y la alimenticia. La aplicación principal del hidrógeno en la industria química es para la producción de metanol, amoníaco, ácido clorhídrico y como agente reductor para minerales metálicos. En la petroquímica se utiliza para el refinado de combustibles fósiles y en la industria de los alimentos es usado como agente hidrogenante, particularmente en el incremento de la saturación de grasas y aceites insaturados.

Para hacer frente a las futuras demandas de hidrógeno es necesario considerar todas las fuentes renovables disponibles. En teoría, se pueden generar grandes cantidades de hidrógeno a partir de la materia orgánica disuelta en aguas residuales por medio de tecnologías de fermentación como la fermentación anaerobia, aunque existen barreras termodinámicas que limitan la conversión total de los carbohidratos presentes en el medio a tratar. Lo anterior se debe a que no todo el sustrato se convierte a hidrógeno, la mayor parte es convertido a subproductos como acetato y butirato [1]. Para que existan mejores rendimientos en el sistema, estos subproductos necesitan ser convertidos a hidrógeno, pero la fermentación anaerobia no es capaz de hacerlo ya que la conversión involucra reacciones endotérmicas [1].

Bajo este contexto, existe un novedoso dispositivo biológico para generar hidrógeno llamado Celda de Electrólisis Microbiana (CEM), el cual es capaz de “electrolizar” cualquier sustrato biodegradable, como por ejemplo la materia orgánica presente en aguas residuales, y convertirla directamente a hidrógeno y CO<sub>2</sub> [1]. Las CEM provienen de las Celdas de Combustible Microbianas (CCM) [2], que tiene como principal objetivo convertir la energía química en eléctrica.

La electrólisis de la materia orgánica en una CEM se consigue gracias a un consorcio de microorganismos electroquímicamente activos los cuales son capaces de transferir electrones a través de su metabolismo a un aceptor final externo, que en este caso puede ser un electrodo (ánodo). De esta manera, los electrones pueden ser dirigidos a un cátodo mediante un circuito externo, sin embargo, la fuerza electromotriz que se origina no es la suficiente para que este flujo se lleve a cabo, por lo que es necesario aplicar un potencial auxiliar mediante una fuente de poder. Mientras ocurre el flujo de electrones liberados del ánodo al cátodo, un número igual de protones (producto del metabolismo de los microorganismos) permean a través de una membrana de intercambio protónico (siglas en inglés Protonic Exchange Membrane, PEM), reduciéndose en el cátodo que generalmente emplea platino como catalizador para formar hidrógeno molecular (Figura 1.1).

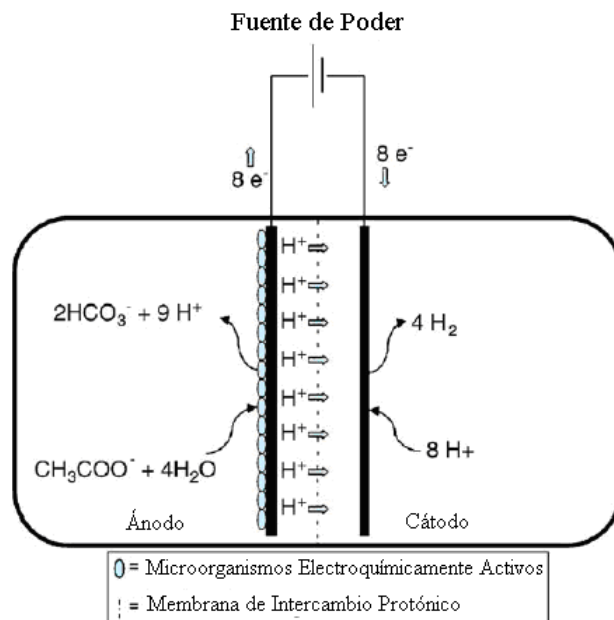


Figura 1.1 Representación esquemática de producción de hidrógeno a través de la electrólisis microbiana [3].

Este tipo de sistema puede funcionar como complemento en la tecnología de fermentación anaerobia, ya que tiene la capacidad de convertir los subproductos remanentes a hidrógeno, por lo que el acetato es comúnmente utilizado como sustrato modelo para los experimentos de electrólisis microbiana [3].

Teóricamente un potencial externo de 0.114 V es necesario para la producción de hidrógeno en un sistema CEM, sin embargo, de manera experimental se requiere un poco más de energía para que la reacción se lleve a cabo. De esta manera, la electrólisis catalizada por microorganismos puede llevarse a cabo con potenciales aplicados entre 0.22 V a 1 V [3]. De manera comparativa, la producción de hidrógeno a través de electrólisis del agua opera a voltajes aplicados de 1.6 V [4], siendo evidente la diferencia de la demanda energética entre ambos procesos.

Uno de los grandes retos en la investigación de los sistemas CEM y CCM, es el catalizador presente en el cátodo. Las CEM operan generalmente con platino como catalizador, ya que se ha demostrado que es muy efectivo en otros sistemas como sucede en las celdas de combustible convencionales de hidrógeno. Sin embargo, estas últimas operan a densidades de corriente alrededor de los  $10^3$  a  $10^4$  A/m<sup>2</sup>, que son mayores a las CEM y CCM (entre 1 y 10 A/m<sup>2</sup>) [5]. Como resultado de estas densidades de corriente, la producción de hidrógeno o electricidad es baja como para justificar el uso de metales preciosos.

Muchos estudios sobre catalizadores alternativos se han llevado a cabo para la generación de hidrógeno en electrolizadores de agua, pero la limitación de extender estos resultados a las CEM es que solo han probado bajo condiciones ácidas o alcalinas, ya que las soluciones en las CEM son normalmente cercanas al neutro y operan bajo condiciones biológicas y químicas más complicadas que los electrolizadores de agua [6]. Por lo anterior, es necesario el desarrollo de un catalizador de bajo costo en las CEM para la generación de hidrógeno bajo las condiciones de este sistema [5].

Dentro de este panorama, los biocátodos son una opción viable ya que prometen ser aplicados en las CEM con materiales relativamente baratos utilizando microorganismos electroquímicamente activos. La mayoría de los conceptos de biocátodos que se han desarrollado para catalizar la producción de hidrógeno han sido enzimáticos [7, 8], que tienen desventajas ya que son inestables y se desnaturalizan fácilmente [9]. El uso de microorganismos electroquímicamente activos en el cátodo en vez de enzimas podría resolver este problema ya que de esta manera se obtendría más estabilidad y sobre todo un biocátodo autoregenerable [5].

## **1.1 JUSTIFICACIÓN**

La implementación de un biocátodo en una Celda de Electrólisis Microbiana ofrecerá una alternativa económica al platino en estos dispositivos, minimizando de esta manera los costos finales de la celda. Así mismo se obtiene un sistema generador de energía renovable que a su vez tendrá un impacto ambiental positivo mediante la reducción de cargas orgánicas en aguas residuales.

## **1.2 OBJETIVOS**

### **1.2.1 Objetivo general**

Desarrollar un sistema CEM con reacciones anódicas y catódicas catalizadas por microorganismos electroquímicamente activos y comparar su desempeño respecto a una CEM con cátodo de platino.

### **1.2.3 Objetivos específicos**

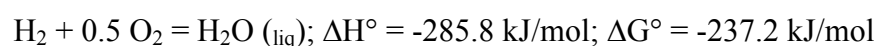
- 1.- Construcción e inicio de una CEM catalizada por platino
  
- 2.- Obtener un biocátodo a partir de microorganismos electroquímicamente activos modificados mediante técnicas electroquímicas e iniciar una CEM catalizada por un biocátodo.
  
- 3.- Realizar pruebas electroquímicas y medición del hidrógeno generado.
  
- 4.- Análisis comparativo de los resultados obtenidos de las CEM evaluadas.

### **1.3 HIPÓTESIS**

El empleo de un biocátodo en una CEM generará hidrógeno con rendimientos cercanos a una CEM convencional catalizada con platino.

## CAPÍTULO 2: ANTECEDENTES

El Hidrógeno fue descubierto en 1766 por Henry Cavendish (1731-1810) en Londres, Inglaterra y lo describió como “aire inflamable” como resultado de la reacción de un ácido fuerte con ciertos metales como el zinc. Más tarde en 1783, Antoine Lavoisier (1743-1794) le dio el nombre de hidrógeno, generador de agua. La reacción del hidrógeno con oxígeno produce agua y energía [1].



Esta energía tiene la capacidad de resolver muchos de los problemas ambientales que existen a nivel mundial como resultado del uso de combustibles fósiles. Sin embargo, el desarrollo de un sistema basado en la energía del hidrógeno requiere estudios multifacéticos sobre las fuentes de hidrógeno, producción, separación, almacenamiento y toda la infraestructura que conlleva el manejo de este gas. Se debe tener en cuenta que el hidrógeno es un vector energético y no una fuente de energía primaria, por lo que debe ser producido para su utilización. El hidrógeno puede ser producido a partir del carbón (gasificación), gas natural y propano (reformado, oxidación parcial), fracciones del petróleo (deshidrociclización, descomposición pirolítica), agua (electrólisis) y biomasa (gasificación, conversión biológica). La competitividad relativa entre las diferentes opciones depende de la producción a escala, pureza y fuentes de energía disponibles [1].

### 2.1 Hidrógeno generado a partir de fermentación anaerobia

La fermentación anaerobia es una alternativa biológica para la generación de hidrógeno [10]. El proceso de fermentación anaerobia está compuesto por tres fases: hidrólisis, acidogénesis y metanogénesis. Como se muestra en la Figura 2.1, la hidrólisis y acidogénesis producen hidrógeno y ácidos orgánicos, que pueden ser utilizados para producir metano en la fase de metanogénesis. La producción de hidrógeno requiere entre 1 y 2 días de tiempo de retención hidráulico (TRH) y la producción de metano requiere de 12



a 20 días. Si el gas de hidrógeno no es retirado a tiempo del sistema, el mismo es utilizado para la producción de metano [11].

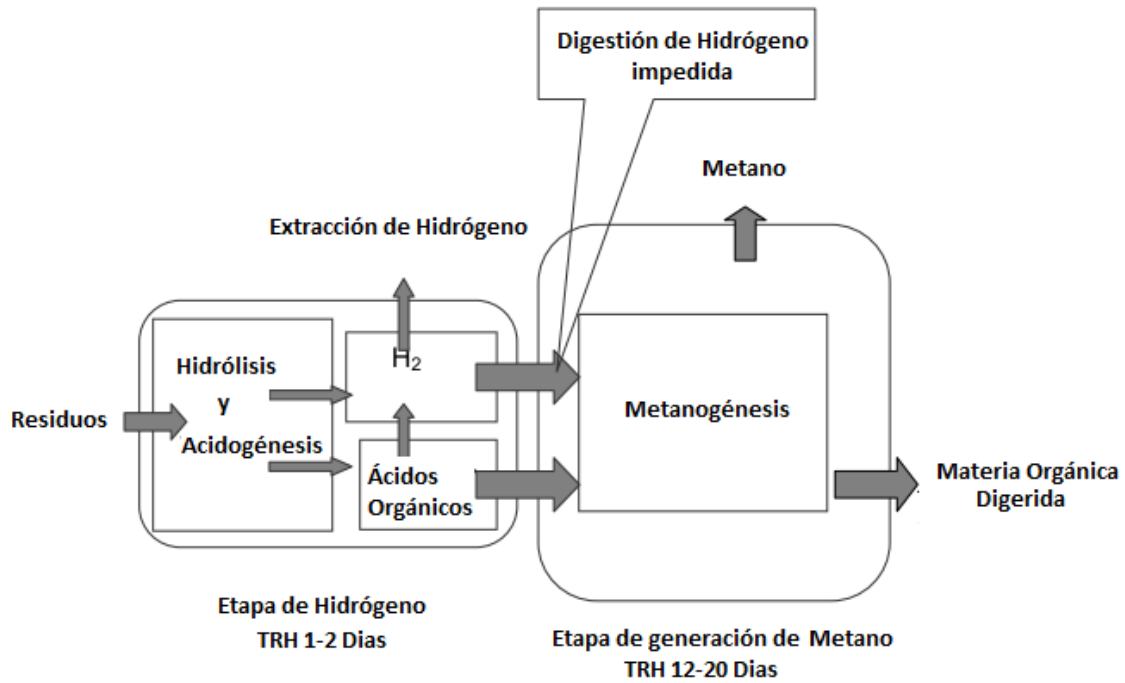
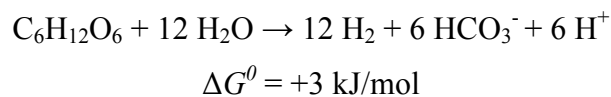


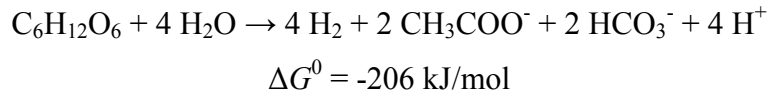
Figura 2.1 Diagrama de la fermentación anaerobia para la producción de hidrógeno [11].

Los sustratos ricos en carbohidratos son los más adecuados para este tipo de fermentación, por lo que la glucosa es utilizada para su estudio.

Teóricamente se pueden producir 12 moles de hidrógeno por cada mol de glucosa, pero la reacción se vuelve termodinámicamente desfavorable, por lo que no hay energía metabólica en los microorganismos para llevarla a cabo [12]:



Desde un punto de vista termodinámico y bioquímico, la reacción que maximiza la producción de hidrógeno es la generación de 4 moles hidrógeno por mol glucosa, con 2 moles de acetato por mol de glucosa como subproducto [12].



La ruta metabólica para lograr esta reacción empieza a partir de la glucólisis [12] (Figura 2.2). La conversión de la glucosa genera 2 moles de Piruvato, 2 de NADH, y 2 ATP. Posteriormente, el piruvato es oxidado a acetil coenzima A que puede ser convertida a acetato con generación de ATP adicional, que duplica la formación de ATP de 2 moles de ATP por mol de glucosa (a partir de la glucólisis) a 4 moles de ATP por mol de glucosa. Sin embargo, antes de que ocurra la formación de acetato, todos los agentes reductores (NADH, ferredoxinas reducidas y formato) primero tienen que ser eliminados adecuadamente. Los pares redox ferredoxina reducida/ferredoxina oxidada, F<sub>red</sub>/F<sub>ox</sub> ( $E^{0'} = -0.420 \text{ V}$ ) y formato/  $\text{HCO}_3^-$  ( $E^{0'} = -0.406 \text{ V}$ ) tienen un potencial estándar redox que es similar a la reducción de protones ( $E^{0'} = -420 \text{ V}$ ), F<sub>red</sub> y formato pueden ser fácilmente convertidos a hidrógeno a presiones parciales de hidrógeno comunes en los reactores de digestión anaerobia que se encuentran entre 0 y 1 bar ( $0 \ll P_{\text{H}_2} < 1 \text{ bar}$ ). Por otro lado, la reoxidación del NADH es poco posible bajo condiciones de acumulación de hidrógeno.

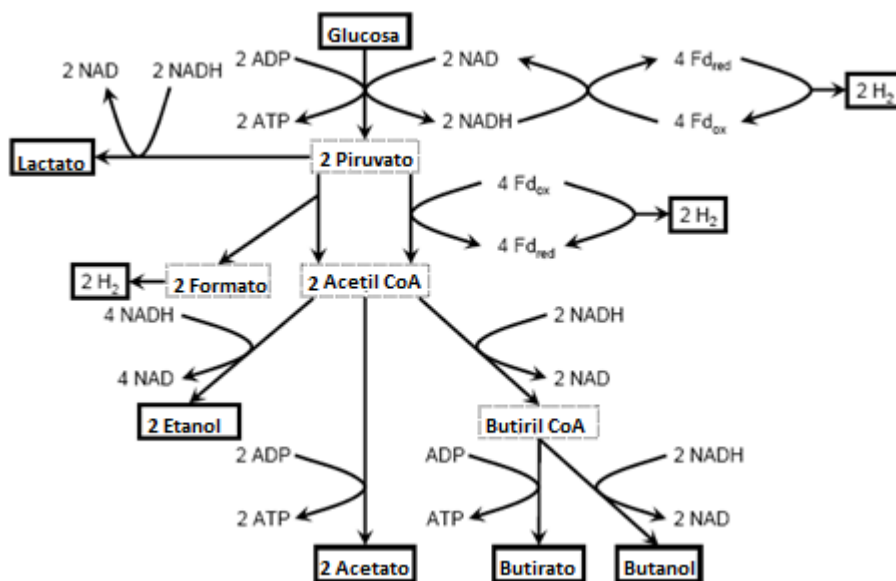


Figura 2.2. Descripción general de las posibles rutas metabólicas durante la fermentación anaerobia de la glucosa [12].

El par redox NADH/NAD ( $E^0 = -0.320 \text{ V}$ ) tiene un potencial redox estándar que es significativamente más alto que la reducción de protones ( $E^0 = -0.420 \text{ V}$ ). Esto significa que NADH solo puede ser convertida a hidrógeno a bajas presiones parciales. La relación NADH/NAD se encuentra de manera típica en el orden de 0.1 a 10, lo que significa que la presión parcial de hidrógeno necesita estar por debajo de 5 a 426 Pa respectivamente antes de que el NADH pueda ser oxidado para formar hidrógeno (Figura 2.3). Si la presión parcial del hidrógeno está por debajo de esos valores, el NADH puede ser oxidado por la enzima NADH ferredoxinoxidoreductasa. Esta oxidación produce Fd<sub>red</sub> que posteriormente puede ser convertida a hidrógeno como se describió anteriormente (Figura 3). Esto incrementa el rendimiento de hidrógeno a 4 moles por mol de glucosa. Además, como todos los agentes reductores son ahora desechados de manera adecuada, acetil-CoA puede ser convertida a acetato con generación adicional de ATP.

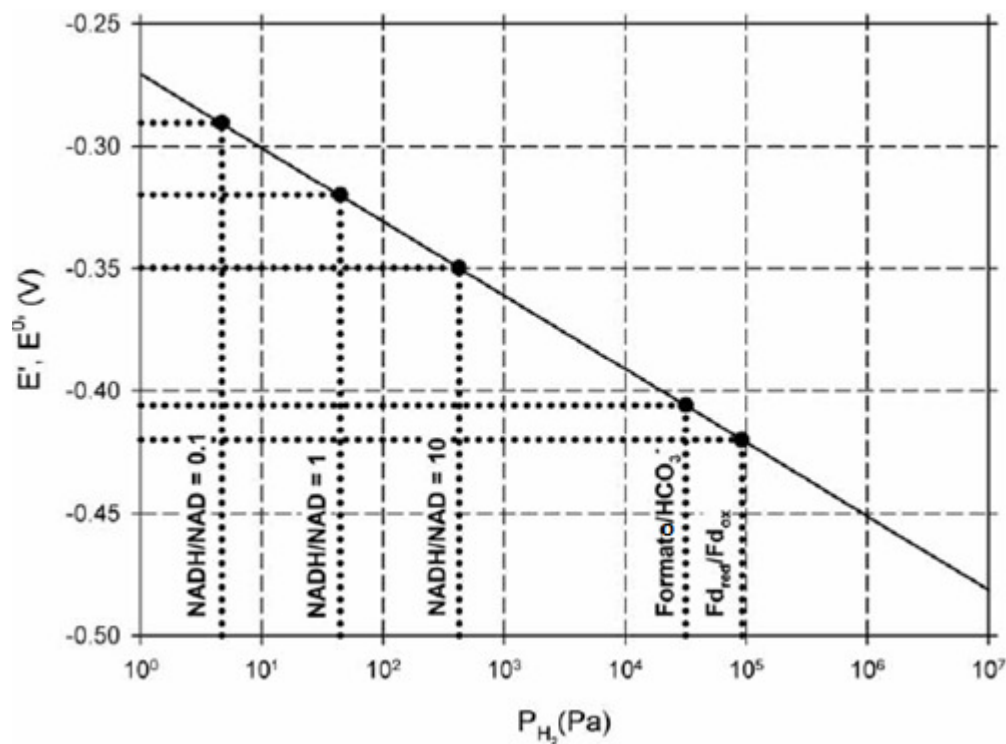
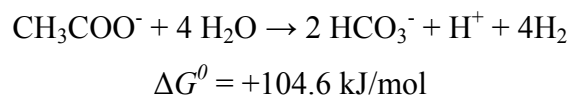


Figura 2.3. Potencial redox a pH 7 ( $E'$ ) del par redox NADH/NAD ( $E^0$ ) y el potencial redox estándar a pH 7 ( $E^0$ ) de los pares redox Formato/ $\text{HCO}_3^-$  y  $\text{Fd}_{\text{red}}/\text{Fd}_{\text{ox}}$ , trazado con respecto a la presión parcial de hidrógeno a la cual pueden ser oxidados para producir hidrógeno [12].

Sin embargo, si la presión parcial del hidrógeno no es lo suficientemente baja como para mantener una tasa de oxidación eficiente, se activan rutas metabólicas alternas para la oxidación de NADH. En ese caso, los microorganismos empiezan a oxidar NADH para producir más subproductos de fermentación en vez de acetato, tal como butirato, lactato, etanol y butanol (Figura 2.2). Esas rutas metabólicas alternas pueden consumir efectivamente el exceso de agentes reductores en forma de NADH, pero genera menos de 4 moles de ATP por mol de glucosa que cuando el acetato es el producto final [5].

En teoría, el acetato también puede ser convertido a hidrógeno en la fermentación anaerobia, en este caso la conversión genera 4 moles de hidrógeno por mol de acetato, pero la reacción también se convierte desfavorable [12]:



Para que se lleve a cabo esta reacción se requiere que la presión parcial del hidrógeno sea muy baja (alrededor de 1 Pa en condiciones estándar) para que la energía libre sea lo suficientemente negativa para generar energía intracelular (ATP) y llevar a cabo la reacción [12]. De manera práctica es imposible establecer estas condiciones, sin embargo, se puede aplicar una segunda tecnología que sea capaz de hacer frente a la naturaleza endotérmica de la reacción en la conversión de subproductos para la producción de hidrógeno. Las CEM figuran como excelentes candidatos para dicha problemática, ya que tienen la capacidad de superar el límite termodinámico con la ayuda de energía auxiliar. Además, comparado con la fermentación anaerobia, las CEM pueden utilizar mayor variedad de sustratos. La fermentación anaerobia requiere sustratos ricos en carbohidratos, lo cual limita el uso de proteínas o ácidos orgánicos como sustrato. En las CEM, las bacterias pueden degradar un amplio número de sustratos, desde compuestos ricos en azúcares, ácidos carboxílicos, alcoholes, proteínas hasta mezclas más complejas como biomasa doméstica y aguas residuales del procesamiento de alimentos [6].

## **2.2 Generación de hidrógeno en Celdas de Electrólisis Microbianas**

En el año 2006 dos grupos de investigación descubrieron de forma independiente una tecnología capaz de vencer la naturaleza endotérmica de la conversión de compuestos orgánicos disueltos en aguas residuales a hidrógeno mediante el suministro de un voltaje externo a una celda compuesta por un ánodo colonizado por microorganismos electroquímicamente activos y un cátodo, separados por una membrana de intercambio protónico. Uno de los grupos fue dirigido por el Dr. Bruce E. Logan de la Universidad de Pensilvania (Estados Unidos) [13], y el otro por el Dr. René A. Rozendal de la Universidad de Queensland (Australia) [12]. Estos científicos descubrieron que los microorganismos electroquímicamente activos pueden utilizarse para generar hidrógeno a partir de los procesos basados en las Celdas de Combustible Microbianas. En una CCM, los microorganismos oxidan la materia orgánica liberando dentro de la solución  $\text{CO}_2$ , protones y electrones que son captados por un electrodo (ánodo). Los electrones fluyen desde el ánodo al cátodo a través de un circuito externo donde se utilizan para la reducción del oxígeno, generándose una reacción espontánea. Si se elimina la presencia de oxígeno en el

cátodo, la generación de corriente deja de ser espontánea. Sin embargo, si se aplica un pequeño potencial externo se puede producir hidrógeno a partir de la reducción de los protones en el cátodo (Figura 2.7).

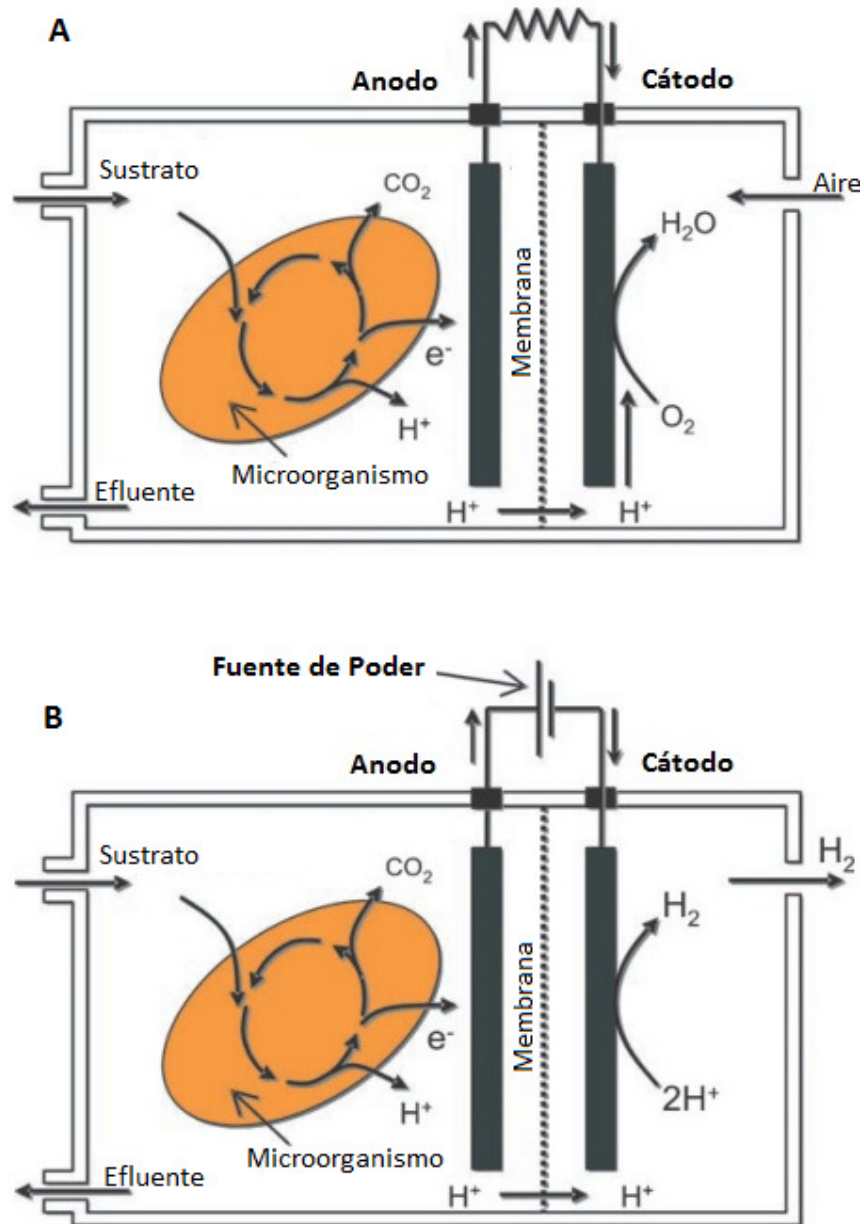
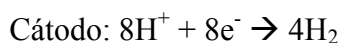
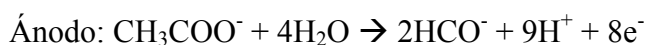


Figura 2.7. Diagrama de (A) CCM y (B) CEM [14].

El sistema ha recibido otros nombres, incluyendo “reactor microbiano electroquímicamente asistido” [15]. Los términos “electroquímicamente” y “asistido” son usados porque un voltaje adicional debe ser agregado al circuito. Si se sigue la nomenclatura utilizada para las CCM, entonces debe ser llamado "Celda de Electrólisis Microbiana", ya que es un proceso que depende de la electrólisis de la materia orgánica catalizada por microorganismos, por lo que en este trabajo se sigue la convención de nomenclatura desarrollada para las CCM. Las reacciones que se llevan a cabo en una CEM son las siguientes [12, 13, 16]:



En una CEM y CCM el potencial anódico a partir de acetato puede alcanzar un límite teórico de  $E_{\text{an}} = -0.3 \text{ V}$  (vs. EEH) de acuerdo a la ecuación de Nernst que se detalla más adelante [12, 13]. Con oxígeno, el potencial del cátodo en una CCM es generalmente  $0.2 \text{ V}$  (vs. EEH), alcanzando en promedio un potencial de celda de alrededor de  $0.5 \text{ V}$  [ $0.2 \text{ V} - (-0.3 \text{ V}) = 0.5 \text{ V}$ ]. Si deseamos formar hidrógeno entonces hay que vencer el potencial catódico, tomando en cuenta la reacción simplificada  $2\text{H}^+ + 2\text{e}^- \rightarrow \text{H}_2$  (en condiciones estándares, pH 7 y 1 M) [13]:

$$E_{\text{cat}} = E^0 - \frac{RT}{nF} \ln \frac{H_2}{[\text{H}^+]^2} = 0 - \frac{\left(\frac{8.31 \text{ J}}{\text{mol K}}\right) (298.15 \text{ K})}{(2)(9.65 \times 10^4 \text{ C/mol})} \ln \frac{1 \text{ M}}{[10^{-7} \text{ M}]^2} = -\mathbf{0.414 \text{ V}}$$

Esta expresión es conocida como la *ecuación de Nernst*, que se utiliza para calcular el potencial de reducción de un electrodo.  $E_{\text{cat}}$  corresponde al potencial del cátodo,  $E^0$  = potencial del electrodo en condiciones estándar,  $R$  constante universal de los gases ideales,  $n$  número de electrones transferidos,  $F$  constante de Faraday y el último término es representado por  $Q = \frac{[\text{C}]^c[\text{D}]^d}{[\text{A}]^a[\text{B}]^b}$  donde  $[\text{C}]$  y  $[\text{D}]$  son las concentraciones molares en caso de gases o de iones disueltos de los productos de la reacción  $[\text{A}]$  y  $[\text{B}]$ . Los exponentes son la

cantidad de moles de cada sustancia implicada en la reacción (coeficientes estequiométricos).

Por lo tanto, el voltaje de la celda calculada para un sistema que podría producir hidrógeno en el cátodo es [13]:

$$E_{FEM} = E_{cat} - E_{an} = (-0.414 V) - (-0.3 V) = -0.114 V$$

Donde  $E_{FEM}$  (también llamado potencial de celda completa) es la fuerza electromotriz que se define como la fuerza capaz de mantener una diferencia de potencial entre dos puntos de un circuito abierto o de producir una corriente eléctrica en un circuito cerrado,  $E_{cat}$  y  $E_{an}$  son el potencial del cátodo y ánodo respectivamente. Como el voltaje de la celda es negativo, la reacción no es espontánea. Esto ayuda a explicar porque la bacteria que produce acetato y el hidrógeno en una fermentación anaerobia no puede seguir convirtiendo el sustrato remanente: la reacción requiere energía una vez que el acetato es transformado a ciertas concentraciones de hidrógeno. Sin embargo, el hidrógeno gaseoso teóricamente puede ser generado en una CEM aplicando un voltaje mayor a 0.114 V [17]. De esta manera, la electrólisis microbiana de la materia orgánica asistida por un potencial externo nos permitirá producir hidrógeno en el proceso de la CEM [13].

### **2.3 Microorganismos electroquímicamente activos**

Los primeros millones de años de la vida en el planeta se desarrollaron sin el beneficio de la atmósfera que existe hoy en día. Los microorganismos anaerobios evolucionaron usando varios métodos para sobrevivir sin necesidad de utilizar oxígeno para la respiración. Las bacterias evolucionaron para ser capaces de usar diferentes tipos de aceptores de electrones, pero lo más sorprendente fue su capacidad de transferir electrones fuera de la célula. La presencia de microorganismos electroquímicamente activos (o exoelectrógenos) tienen gran importancia en el medio ambiente, principalmente en la oxidación y reducción de metales y



los efectos asociados en la disolución mineral, ciclo del carbono, y la absorción del fósforo y metales pesados [13]. Hasta el momento se ha obtenido gran cantidad de información gracias al estudio de dos géneros que son reductores metálicos, *Shewanella* y *Geobacter* los cuales ya han sido secuenciados [18, 19]. La secuenciación de genomas de los microorganismos exoelectrógenos ofrece una excelente oportunidad para aprender más acerca de la naturaleza fundamental de la electrogénesis [13].

### **2.3.1 Mecanismos de transferencia de electrones**

La transferencia extracelular de electrones se puede definir como el proceso en el cual los electrones derivados de la oxidación de compuestos orgánicos son transferidos a la superficie externa de la célula para reducir un aceptor terminal de electrones extracelular [20]. Se han planteado diferentes mecanismos para explicar cómo los microorganismos liberan los electrones: transferencia directa con la participación de citocromos, transferencia con ayuda de mediadores externos o producidos por el mismo organismo y transferencia por medio de los nanocables bacterianos [21].

#### ***a) Transferencia directa de electrones al electrodo***

Entre los microorganismos más estudiados de esta clase se encuentran los géneros *Geobacter*, *Shewanella* y *Rhodospirillum rubrum*; los cuales poseen mecanismos de transporte de electrones internos y no requieren la ayuda de mediadores para transferir dichos electrones al ánodo. El uso de microorganismos exoelectrógenos en CCM y CEM hacen posible la oxidación completa de la materia orgánica a dióxido de carbono, lo que se traduce en una alta eficiencia coulombica en el proceso [20]. De igual manera se ha reportado algunas CCM que han sido operadas por más de 2 años sin disminuir su desempeño [20]. La reacción de una CCM que se lleva a cabo en el ánodo sin mediadores se ha estudiado principalmente en la familia *Geobacteraceae*, en este proceso el ánodo actúa como aceptor final de electrones de manera similar a como lo hacen con los óxidos minerales sólidos que se encuentran en el subsuelo, su hábitat natural. La familia *Geobacteraceae* son un grupo

de microorganismos capaces de acoplar la respiración anaeróbica a la reducción de metales en el ambiente. Debido a su metabolismo son capaces de biorremediar medios con metales pesados incluyendo Uranio (VI), Vanadio (VI) Cromo (VI); así como biodegradar varios contaminantes orgánicos como por ejemplo los hidrocarburos monoaromáticos. Los miembros del género *Geobacter* producen energía útil biológicamente en forma de ATP durante la reducción de óxidos de metales bajo condiciones anaerobias en suelos y sedimentos. Su característica principal es la habilidad para oxidar compuestos orgánicos como ácidos grasos, alcoholes, compuestos monoaromáticos por la vía de los ácidos tricarbónicos, mediante la transferencia de electrones a óxidos de Fe(III) insolubles, sustancias húmicas u óxidos de Mn(IV) [22]. La mayoría de los estudios relacionados con la transferencia de electrones se han hecho utilizando *Geobacter sulfurreducens*, ya que su genoma se conoce completamente y se sabe que es un gran generador de potencia. La manera en que esta bacteria transfiere electrones al electrodo, es a través de una serie de citocromos tipo *c* (más de 100 codificados en su genoma), asociados a la membrana interna, periplasma y membrana externa [20]. *Rhodoferrax ferrireducens*, es también una bacteria de especial importancia en la producción de bioelectricidad, fue aislada de sedimentos del subsuelo como un reductor de Fe (III), oxida azúcares como glucosa, fructosa, sacarosa, lactosa y xilosa a CO<sub>2</sub> con el 80% de la recuperación de los electrones en forma de electricidad. La gran producción de energía le es atribuida a la cantidad de células adheridas a la superficie del electrodo (biopelícula) durante largos períodos de tiempo y a su habilidad para mantenerse activa.

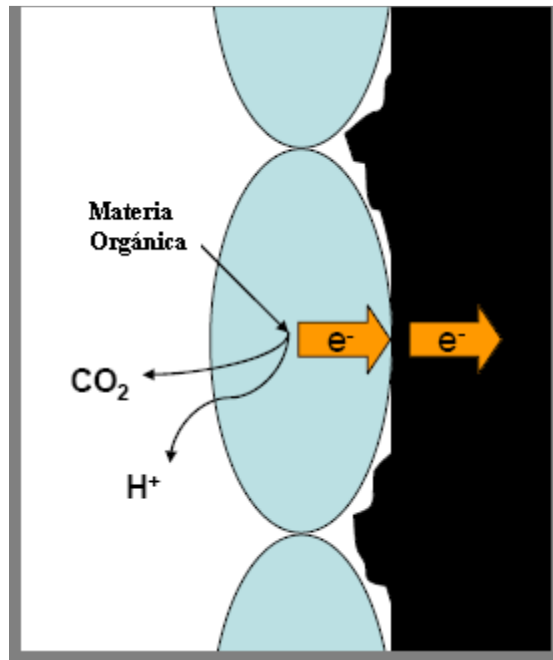


Figura 2.4. Transferencia de electrones por contacto directo con el aceptor de electrones [12].

***b) Transferencia con ayuda de mediadores externos o producidos por el mismo organismo.***

Un mediador es un compuesto que puede entrar en la célula, aceptar electrones de varios acarreadores intracelulares de electrones, salir de la célula en estado reducido y entonces donar los electrones al ánodo (Figura 2.5). Estos mediadores juegan un papel fundamental en la transferencia de electrones en aquellos microorganismos que son incapaces de transferir electrones al ánodo directamente [12].

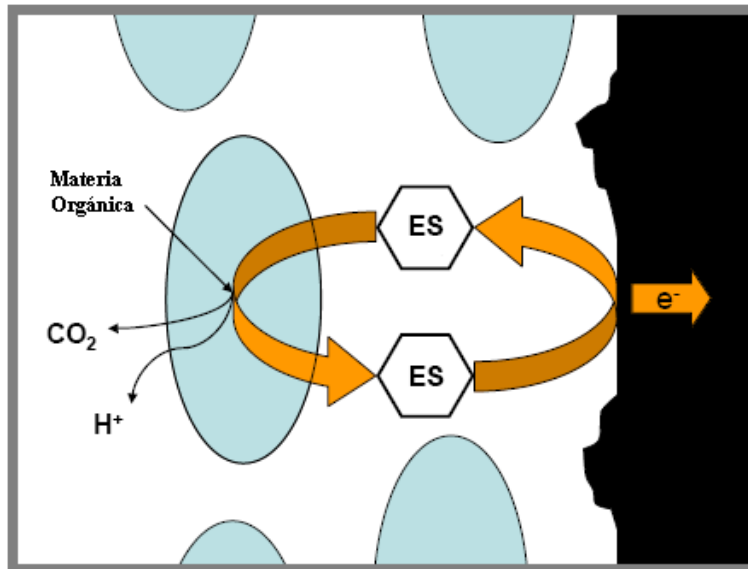


Figura 2.5. Transferencia de electrones por mediadores redox (ES) [12].

Los microorganismos que tienen la capacidad de reducir Fe (III) enfrentan el problema de cómo tener acceso efectivamente a un aceptor de electrones que no puede difundirse a la célula. Las bacterias del género *Shewanella* han resuelto este problema liberando quinonas solubles que pueden acarrear electrones de la superficie celular a óxido de Fe (III) aunque éste se encuentre a una distancia considerable de la célula. Se ha reportado que *Shewanella* tiene la capacidad de transferir electrones a metales localizados a más de 50  $\mu\text{m}$  de la superficie de la célula [22]. Las bacterias del género *Shewanella* son miembros de las  $\gamma$  Proteobacterias, son microorganismos acuáticos con una amplia distribución alrededor del mundo y forman un grupo diverso de bacterias anaerobias facultativas que se encuentran en ambientes marinos y de agua dulce [23]. Son fisiológicamente diversos, por lo que pueden tener varias aplicaciones biotecnológicas, como son la deshalogenación de algunos compuestos y otros contaminantes ambientales, así como la generación de energía. Las bacterias del género *Shewanella* pueden respirar empleando un diverso grupo de aceptores de electrones lo que les ha permitido adaptarse a ambientes extremos y variados. Estos organismos son fáciles de crecer y manejar en un laboratorio, por lo que muestran un gran potencial para la biorremediación de varios contaminantes ambientales. Diversos estudios han sugerido que las células de *Shewanella sp.* tienen la capacidad para producir y secretar acarreadores de electrones para promover la reducción de óxidos de Fe (III), aunque dichos

compuestos no han sido totalmente identificados. Recientemente se demostró que este microorganismo produce flavinas que emplean como mediadores para la transferencia de electrones fuera de la célula [24, 25]. Sin embargo, el mecanismo de transferencia de electrones hacia la superficie del electrodo por esta bacteria no ha sido esclarecido.

En el caso de microorganismos que no son capaces de producir sus propios mediadores y que son incapaces de transferir eficientemente los electrones derivados del metabolismo central afuera de la célula, requieren de mediadores presentes en el medio natural (o bien mediadores artificiales incorporados) para que transporten los electrones al ánodo. Las propiedades que se buscan en un compuesto para ser utilizado como un buen mediador son: un potencial diferente del potencial del organismo para facilitar la transferencia de electrones mientras se mantiene un alto potencial electroquímico en la celda, un alto coeficiente de difusión en el electrolito y en la membrana celular, rápida transferencia de electrones del organismo al electrodo, capacidad para repetidos ciclos redox, no citotoxicidad y buenos perfiles de absorción, adsorción, resorción al organismo, electrodo y otras superficies de la CCM y CEM, de forma que permanezca en la solución y permanezca disponible para el proceso. Ejemplos de mediadores de este tipo son: rojo neutro, fenazinas, fenotiazinas, benzilviolágeno, entre otros [21]. Existen varios problemas en el uso de mediadores para facilitar el transporte de electrones, entre ellos se encuentra el hecho de que los compuestos utilizados suelen ser tóxicos para los seres humanos, por lo que se debe evitar utilizar estos compuestos en los procesos de producción de electricidad en lugares que se exponga el medio ambiente a ellos, como puede ser en plantas de tratamiento de aguas residuales, sedimentos acuáticos, entre otros. Otro problema es el corto tiempo que se mantienen estables, lo cual limita el tiempo de vida de la CCM o CEM. Además, incluso en presencia de mediadores los microorganismos fermentativos producen ácidos, lo que eventualmente desestabiliza el sistema, ya que los donadores de electrones se transforman en ácido carboxílicos y no en electricidad o hidrógeno, por lo tanto, la eficiencia baja sin importar el uso de los mediadores [21].

### ***c) Transferencia por medio de los nanocables bacterianos.***

Se ha descubierto la presencia de nanocables en algunos microorganismos exoelectrógenos los cuales se han identificado en bacterias como *Geobacter sulfurreducens*, *Shewanella oneidensis*, una cianobacteria fototrófica *Synechocystis* y un microorganismo fermentador termofílico *Pelotomaculum thermopropionicum* [26] (Figura 2.6). Existen opiniones encontradas con respecto a la presencia de estas estructuras en las bacterias que pueden reducir óxidos de Fe (III) o Mn (IV). El crecimiento en Fe (III) requiere de la presencia de nanocables especializados, los cuales son conductores de electrones y se encuentran localizados en la periferia de la célula. Estos nanocables son los encargados de realizar la conexión eléctrica entre la célula y los óxidos de Fe (III) y deben estar en contacto directo con el ánodo o formando una red entre las células para facilitar la transferencia de electrones a través de la biopelícula lo mejor posible, pues se sabe que *Geobacter* crece en monocapas y los nanocables proveen soporte estructural en la formación de dicha biopelícula y son esenciales en la generación de corriente. Utilizando *G. sulfurreducens* se realizó un estudio en el que se evaluó en presencia de Fe (III) soluble e insoluble la transferencia de electrones y el papel que juega la presencia o ausencia de nanocables en este proceso. *G. sulfurreducens* produce nanocables durante su crecimiento en óxido de Fe (III) pero no en Fe (III) soluble, lo que hace suponer que esa producción es una manera de hacer contacto con el Fe (III) no soluble en los sedimentos [27]. Reguera *et al.* (2005) [27], evaluaron la conductividad eléctrica a través de los nanocables mediante microscopía de fuerza atómica. (AFM por sus siglas en inglés). Los resultados en esos estudios muestran que los nanocables de *G. sulfurreducens* son altamente conductivos e indican que *Geobacter* requiere de estas estructuras para poder reducir óxidos de Fe (III) en el ambiente. Estos resultados nos llevan a pensar que la producción de nanocables conductores en bacterias que reducen óxidos metálicos es un mecanismo de transferencia de electrones de la célula hacia el aceptor externo de electrones [21, 27].

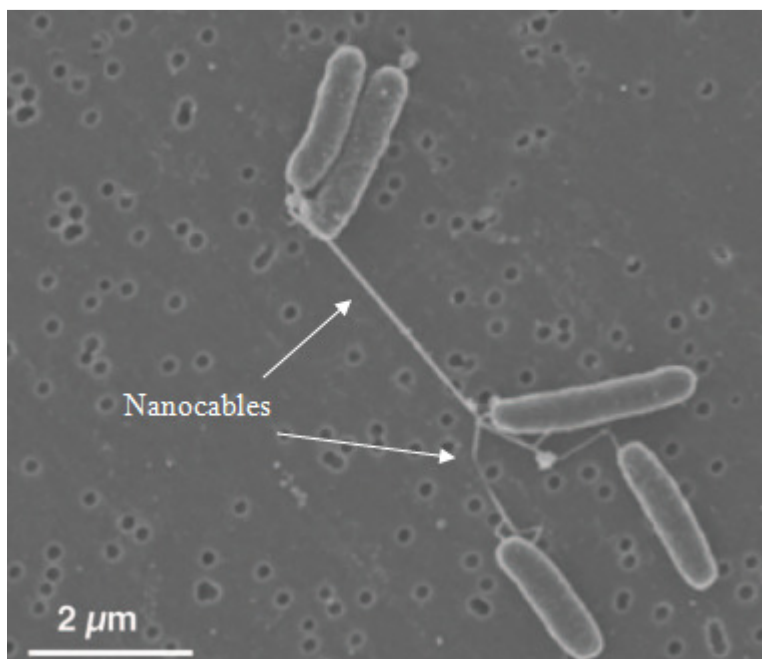


Figura 2.6. Imagen de la estructura de los nanocables de *Shewanella oneidensis* MR-1 obtenida por Microscopía Electrónica de Barrido [26].

### 2.3.2 Consorcios microbianos y simbiosis

La simbiosis se puede definir como la asociación o dependencia de dos o más tipos diferentes de organismos que combinan sus capacidades metabólicas para catabolizar un sustrato que no puede ser degradado por alguno de estos organismos de manera independiente [28, 29]. Esto sucede tanto en la fermentación anaerobia para la producción de  $H_2$  y  $CH_4$  como en las CEM.

En la fermentación anaerobia, la oxidación de  $H_2$  a  $CH_4$  debe ser suprimida cuando el objetivo principal es la producción de hidrógeno. Sin embargo, la acumulación excesiva de hidrógeno puede detener termodinámicamente el proceso de fermentación que lo produce, por lo que se presenta una simbiosis balanceada entre bacterias que producen hidrógeno por fermentación y microorganismos metanogénicos que oxidan el hidrógeno, compensando este exceso. Por otro lado, en una CEM la acumulación de hidrógeno puede llevar a dos resultados indeseables: disminución de la velocidad de oxidación o desviación del flujo de

electrones hacia  $\text{CH}_4$ , lo cual significa que el  $\text{H}_2$  debe ser recolectado rápidamente para evitar su acumulación [30].

## **2.4 Inicio y operación de una CEM**

### **2.4.1 Inóculo y Sustrato**

El inóculo se obtiene a partir de lodos provenientes generalmente de sedimentadores secundarios de plantas de tratamientos de aguas residuales o de sistemas CCM estabilizados con largos periodos de operación [31]. Una vez obtenido, el inóculo se agrega a la cámara anódica y se mantiene en una solución de nutrientes con búfer para mantener el pH estable (pH 7). Por otra parte, la cámara catódica solo contiene búfer de fosfatos con un pH de 7 [32]. La solución en el ánodo generalmente contiene lo siguiente [31]:  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  4.58 g/L,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  2.45 g/L,  $\text{NH}_4\text{Cl}$  0.31 g/L,  $\text{KCl}$  0.13 g/L, minerales traza y vitaminas.

El sustrato en el sistema suele ser acetato, que dependiendo del objetivo del estudio se puede utilizar únicamente como fuente de carbono o bien se puede mezclar con agua residual doméstica (50:50 en volumen de agua residual y solución de nutrientes con acetato) para que se induzca al microorganismo a degradar compuestos orgánicos más complejos [31]. También se han utilizado otros sustratos como glicerol, celulosa y proteínas (albúmina de suero bovino) [33, 34, 35].

### **2.4.2 Componentes y operación de la CEM**

La CEM generalmente están compuestas por dos cámaras, donde cada una aloja al ánodo y otra al cátodo. Las cámaras son separadas por una membrana intercambiadora de protones (Nafion<sup>®</sup> 117) y un voltaje es agregado en el circuito usando una fuente de poder (Figura 2.8). Los electrodos son materiales conductores que hacen contacto con el medio. Suelen ser de tela de grafito, barras de grafito, escobillas de carbón, etc.



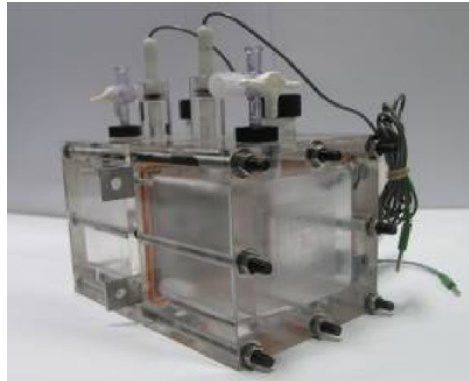


Figura 2.8. Fotografía de una CEM [16]

Para su funcionamiento, las CEM inicialmente se operan de modo que generen electricidad, con el cátodo expuesto al aire (modo CCM) [31]. El sistema se opera a temperatura ambiente, reemplazando la solución nutriente cada vez que el potencial de la celda disminuya considerablemente ( $< 20$  mV aproximadamente). Una vez que se alcanza un potencial alrededor de los 0.5 V por al menos cinco ciclos consecutivos, el cátodo se sella y el sistema se cambia a modo CEM [36].

Al sistema se le aplica un potencial externo por medio de una fuente de poder que suministre un potencial de entre 0.2 a 1 V, conectando el polo positivo al ánodo y el polo negativo al cátodo para aumentar la fuerza electromotriz y favorecer el flujo de electrones de ánodo a cátodo [31, 36]. Para medir los potenciales de media celda se utilizan electrodos de referencia como el electrodo estándar de hidrógeno, Ag/AgCl, entre otros.

## 2.5 Cátodos en sistemas CEM

De manera similar a un electrolizador de agua, un cátodo en la CEM normalmente contiene catalizadores metálicos y materiales de soporte para el catalizador. Un soporte catalítico proporciona una superficie física para la dispersión de pequeñas partículas de metal para lograr mayor área superficial. El carbón generalmente se ha usado como soporte debido a la mínima interferencia con el catalizador y a la buena conductividad. Los soportes de carbón

también reducen la carga de metales nobles sobre el electrodo. En la mayoría de las CEM, los cátodos con platino utilizan polvo de carbón como soporte para el platino y la mezcla se aplica sobre una superficie de carbón como tela de carbón o papel carbón acompañada con un aglutinante como el Nafion® líquido [6].

El uso de catalizadores disminuye considerablemente la barrera de energía de activación, de este modo baja la contribución del sobrepotencial catódico y mejora las cinéticas de la reacción de generación de hidrógeno en la superficie del cátodo. El platino es el mejor material catalizador para esta reacción y se usa comúnmente en los sistemas CEM para mejorar la generación de hidrógeno sobre el cátodo. Sin embargo, su elevado costo es uno de los grandes retos para el escalamiento de las CEM [6]. Además de los costos del platino, su rendimiento puede ser negativamente afectado por contaminación biológica y química (envenenamiento) por acción de CO, CO<sub>2</sub> y sulfuro [37, 38, 39]. Debido a lo anterior, para mejorar el desempeño y la factibilidad económica de las CEM, el platino necesita ser reemplazado por catalizadores alternativos. Hasta el momento, se han sugerido tres estrategias principales: el uso de materiales con mayor área superficial específica como el grafito granular y escobillas de acero inoxidable [40, 41], catalizadores más económicos como acero inoxidable [41, 42] y biocátodos microbianos [5, 43, 44, 45, 46].

### **2.5.1 CEM catalizadas por platino**

El primer sistema CEM reportado para la generación de H<sub>2</sub> fue desarrollado por Liu *et al.* (2005) [17], usando un reactor de 2 contenedores (310 mL cada uno) con un volumen de operación de 200 mL y separadas por una membrana intercambiadora de protones (Nafion® 117) (Figura 2.9). El ánodo fue de tela de carbón y el cátodo de papel carbón con 0.5 mg-Pt/cm<sup>2</sup> (12 cm<sup>2</sup> por cada electrodo). Este sistema tuvo el mismo diseño usado por Oh *et al.* (2004) [47] modificando el espacio entre los electrodos a 15 cm. La celda generó un promedio de 2.9 mol de H<sub>2</sub> por mol de acetato comparado con un rendimiento teórico de 4 mol de H<sub>2</sub> por mol de acetato [12]. El potencial aplicado fue de 0.25 V. La recuperación de los electrones del acetato como corriente presentó un valor alto, obteniendo una

eficiencia coulombica de 60% a 78%. La recuperación catódica de hidrógeno ( $r_{\text{Cat}}$ ) fue mayor a 90%.

La eficiencia coulombica ( $C_E$ ) es calculada como  $C_E = C_p / C_T \times 100\%$ , donde  $C_p$  es el total de coulombs calculado al integrar la corriente en el tiempo.  $C_T$  es la cantidad de coulombs teóricos que pueden ser producidos a partir del acetato, calculado como  $C_T = FbSv/M$ , donde  $F$  es la constante de Faraday,  $b = 8$  que es el número de moles de electrones producidos por mol de sustrato (acetato),  $S$  es la concentración del sustrato,  $v$  es el volumen del líquido y  $M = 82$  g/mol que corresponde al peso molecular del acetato de sodio [17].

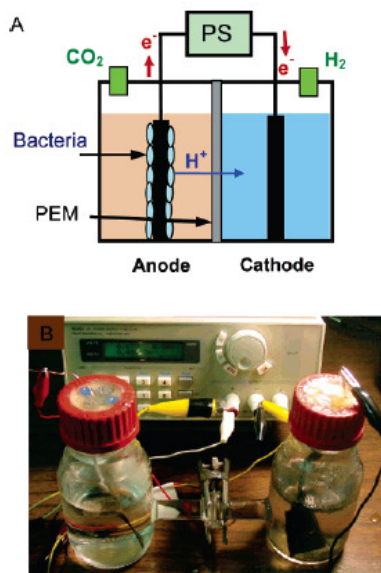


Figura 2.9 (A) Esquema general y (B) fotografía del proceso CEM con un voltaje aplicado usando una fuente de poder (PS) y un Multímetro (M) conectado a un monitor de voltaje a través de un resistor óhmico [17].

Durante el mismo experimento, Liu *et al.* estudió un segundo reactor diseñado por Liu y Logan (2004) [32], el cual se convirtió en una celda de dos cámaras, con un cilindro de 4 cm de largo y 3 cm de diámetro, sellándolo para evitar la entrada de oxígeno al sistema (Figura 2.10A). El gas generado fue liberado hacia un tubo conectado a un contenedor donde el hidrógeno fue analizado periódicamente. Las eficiencias coulombicas fueron similares a las obtenidas en la primera celda, la recuperación de hidrógeno ( $r_{\text{Cat}}$ ) en este sistema fue de 60- 73%. Se cree que la baja recuperación se debió a la pérdida de gas de los

ductos conectados entre la cámara catódica y el recipiente colector de gas, también por la difusión a través de la membrana hacia la cámara anódica [17].

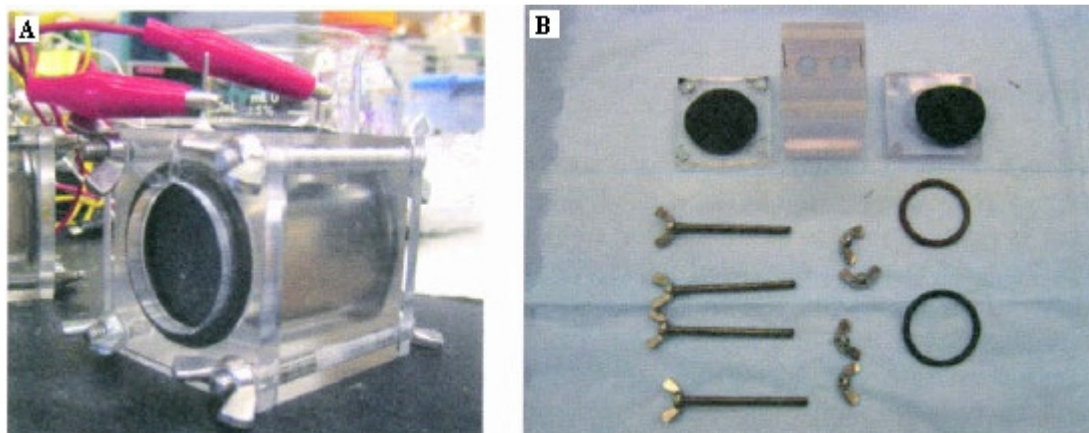


Figura 2.10. (A) Sistema de una sola cámara y (B) elementos que la componen [32].

Ditzig *et al.* (2007) [15] estudió la producción de  $H_2$  en una CEM de doble cámara a partir de materia orgánica disuelta en aguas residuales domésticas. El ánodo fue un electrodo de papel carbón con grafito granular de 2-6 mm de diámetro y el cátodo de papel carbón con  $0.5 \text{ mg-Pt/ cm}^2$  (Figura 2.11).

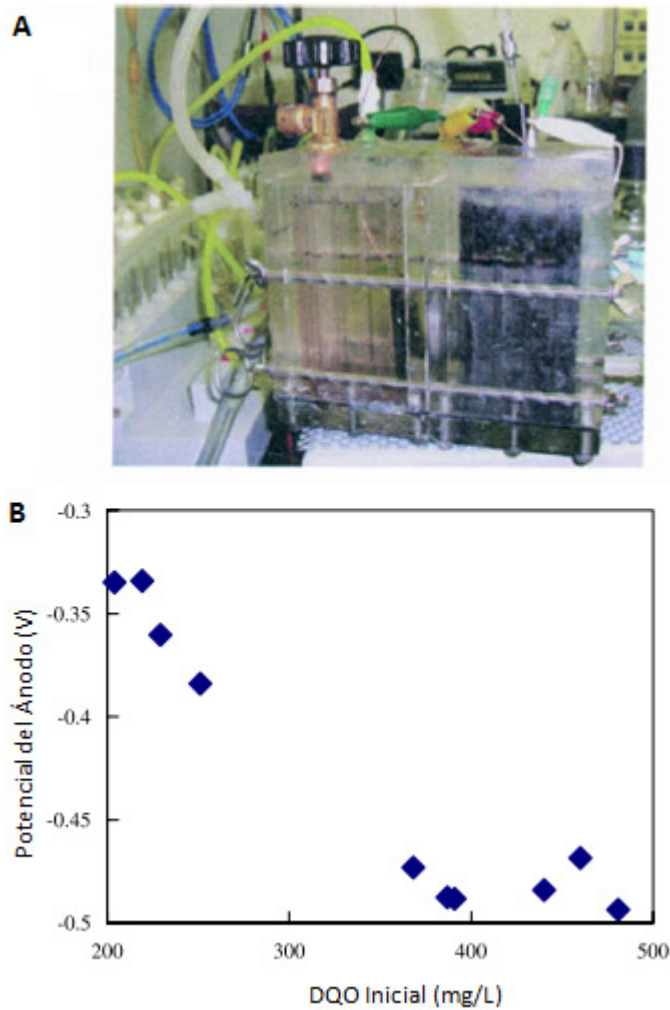


Figura 2.11. (A) CEM estudiada por Ditzig *et al.* (2007) y (B) Potencial anódico (vs. Ag/AgCl) con respecto a la concentración del agua residual [15].

La membrana (Nafion®) tuvo un área de  $11.4 \text{ cm}^2$  y las cámaras un volumen de operación de 256 mL cada una. El voltaje mínimo necesitado para producir hidrógeno fue de 0.23 V, pero se necesitaron potenciales de 0.59 V para obtener cantidades significativas. La remoción del DQO fue de 95%, sin embargo, el desempeño del reactor como método para la producción de hidrógeno fue pobre. A un voltaje aplicado de 0.5 V, la recuperación de hidrógeno fue 42.7% y la  $C_E$  fue 23%, generando  $0.0125 \text{ mg H}_2/\text{mg-DQO}$ .

Ditzig *et al.* (2007) encontró que la  $C_E$  en aguas residuales es más baja que la obtenida con compuestos como acetato, debido a que en el agua residual doméstica tiene menos concentración de materia orgánica comparada con las concentraciones usadas en pruebas CCM y CEM mayores a 1g/L de acetato. Como se muestra en la Figura 2.11 (B) el potencial del ánodo bajó con una mayor concentración de DQO del agua residual (-0.5 V vs. Ag/AgCl o -0.3 V vs. EEH) logrando solo de esta manera un potencial similar al del acetato (-0.3 V vs. EEH) [15].

### 2.5.2 CEM catalizadas por otros materiales

En el 2008, Call *et al.* [41] propusieron el uso de cátodos de escobilla de acero inoxidable en una CEM para comparar su desempeño con aquellos que utilizan platino como catalizador. Call *et al.* seleccionaron un acero inoxidable con alto contenido de níquel (SS304) y analizaron el desempeño en términos de densidades de corriente, producción y recuperación de hidrógeno. Utilizando un área superficial específica de  $810 \text{ m}^2/\text{m}^3$ , el hidrógeno se produjo a una tasa de  $1.7 \text{ m}^3 \text{ H}_2 / \text{m}^3$  volumen del líquido del cátodo / día con una densidad de corriente de  $188 \text{ A}/\text{m}^3$  a un potencial aplicado de 0.6 V. La recuperación catódica del hidrógeno fue de 83%. En el trabajo se demostró que una superficie grande de acero inoxidable contribuyó a la generación de grandes densidades de corriente, por lo que se puede lograr la producción de hidrógeno a tasas comparables con aquellas que son catalizadas con metales preciosos como el platino.

En el mismo año, Selembo *et al.* [42] en una CEM compararon con platino diferentes aleaciones de níquel y acero inoxidable bajo condiciones de pH neutros utilizando cátodos de hojas de metal, así como el desempeño del óxido de níquel depositado en una superficie de hoja de metal. Para la comparación con una CEM convencional se hicieron pruebas utilizando platino sobre un cátodo de tela de carbón. El acero inoxidable A286 fue superior al platino en términos de recuperación catódica de  $\text{H}_2$  (61% vs. 47%) y una tasa de producción de  $\text{H}_2$   $1.5 \text{ m}^3 \text{ H}_2 / \text{m}^3$  volumen del líquido del cátodo / día vs.  $0.68 \text{ m}^3 \text{ H}_2 / \text{m}^3$  volumen del líquido del cátodo / día a un potencial aplicado de 0.9 V. El níquel 625 tuvo

mejor desempeño que otras aleaciones del mismo metal, pero no superó al acero inoxidable A625. Posteriormente, el desempeño de los cátodos de acero inoxidable y níquel se incrementó por la electrodeposición de una capa de óxido de níquel en una hoja de metal, obteniendo recuperación de H<sub>2</sub> de 52% y una tasa de producción de H<sub>2</sub> de 0.76 m<sup>3</sup> H<sub>2</sub> / m<sup>3</sup> volumen del líquido del cátodo / día, a un potencial aplicado de 0.6 V. Esos resultados reafirman que en sistemas CEM se puede utilizar cátodos sin necesidad de metales preciosos.

### **2.5.3 CEM catalizada por un biocátodo**

La estrategia para lograr biológicamente reacciones catódicas se basa principalmente en la reversibilidad de la enzima hidrogenasa [48]. La hidrogenasa está ampliamente distribuida en los microorganismos anaerobios. Ésta tiene diversos orígenes filogenéticos y produce el hidrógeno tanto irreversible como reversiblemente, dependiendo de las condiciones medioambientales en las que se encuentre, siendo reversible sólo en condiciones de anaerobiosis estricta [49]. Se sabe que la reacción catalizada por la hidrogenasa tiene la forma:



Uno de los primeros conceptos de biocátodos desarrollados para catalizar la producción de hidrógeno fue basado en un cultivo puro de la bacteria *Desulfovibrio vulgaris* con violeta de metilo como mediador redox [50]. Sin embargo, con respecto a la estabilidad de operación de la CEM, es mucho más deseable un biocátodo que no necesite mediadores redox.

En el 2008, Rozendal *et al.* [5] desarrolló un biocátodo como alternativa potencial al platino, obteniéndolo a partir de un bioánodo de tela de grafito con microorganismos electroquímicamente activos (no identificados aún). El procedimiento para formar el biocátodo se dividió en 3 partes y se resume en la Figura 2.12:

- Se inició una CEM con doble cámara conformada por un lado con un bioánodo activo y por otro por un cátodo en una solución de ferricianida que funcionó como aceptor artificial de electrones. El bioánodo fue alimentado con acetato y a la vez se suministró hidrógeno para que los microorganismos lo oxidaran, aplicando durante 170 h un potencial de +0.1 V (vs. EEH) con un potenciostato, iniciando de esta manera la activación de la hidrogenasa (oxidación). Posteriormente bajaron el potencial a -0.2 V (vs. EEH) para forzar a que el microorganismo generara corrientes catódicas (reducción) (Figura 2.12A).
- En la siguiente parte se eliminó al acetato del medio y se sustituyó por bicarbonato de sodio. Durante esta parte se mantuvo el suministro de hidrógeno, actuando como único donador de electrones y mantuvo un potencial de -0.2 V (vs. EEH) (Figura 2.12B).
- Finalmente se eliminó el suministro de hidrógeno y se llevó a cabo un barrido de -0.2 a -0.8 V con un potenciostato a 0.025 mV/s, con lo que se observó que a partir de los -0.7 V (vs. EEH) el bioánodo empezaba a generar corrientes catódicas (reducción), por lo que se polarizó el electrodo a este potencial y la solución de la otra cámara, que anteriormente funcionaba como cámara catódica, se reemplazó por ferrocianida para que actúe como donador artificial de electrones, por lo que la cámara cambió su función a anódica. De esta manera, el electrodo que inició como bioánodo fue convertido en un biocátodo mediante la manipulación electroquímica descrita (Figura 2.12C).



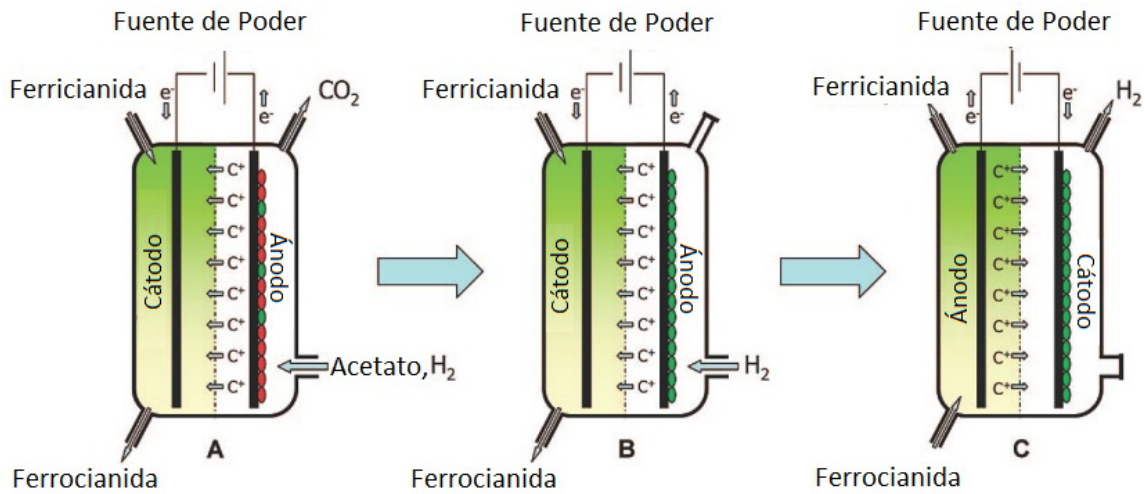


Figura 2.12. Procedimiento para la obtención del biocátodo ( $C^+$  = Cationes). (A) Inoculación con microorganismos electroquímicamente activos y adaptación a la oxidación de H<sub>2</sub>. (B) Adaptación solo a la oxidación de H<sub>2</sub>. (C) Inversión de la polaridad para la producción de H<sub>2</sub> [5].

Con un potencial controlado de  $-0.7$  V (vs. EEH), la CEM con biocátodo generó una densidad de corriente de  $1.1$  A/m<sup>2</sup> y tuvo una recuperación catódica de hidrógeno de 49%. Este biocátodo no requirió mediadores para la producción de hidrógeno, lo cual es una ventaja comparada con otros trabajos [50, 51], sin embargo, el biocátodo solo funcionó en una media celda (Figura 2.13), mientras que en el ánodo se oxidó ferrocianida. En este trabajo se logró generar  $0.63$  m<sup>3</sup> H<sub>2</sub> / m<sup>3</sup> volumen del líquido del cátodo / día.

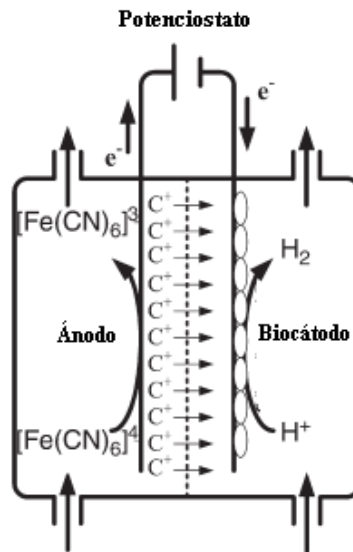


Figura 2.13. Biocátodo controlado a un potencial de  $-0.7\text{ V}$  (vs. EEH) en una media celda ( $C^+$ =Cationes) [46].

En el 2009, Jereniasse *et al.* [46] demostró por primera vez que es posible el funcionamiento de una CEM catalizada por microorganismos tanto en el ánodo como en el cátodo (Figura15). La celda operó a un potencial de  $0.5\text{ V}$ , obteniendo densidades de corriente máximas de  $1.4\text{ A/m}^2$  y eficiencias catódicas de 21%. Los microorganismos electroquímicamente activos del cátodo fueron tomados de la celda realizada por Rozendal *et al.* (2008) [5], por lo que no fue necesario repetir el proceso de obtención del biocátodo. Este estudio fue importante porque el desempeño de una celda catalizada completamente por microorganismos puede ser diferente al desempeño en estudios de media celda, ya que el bioánodo y biocátodo son influenciados uno al otro por las especies que pasan a través de la membrana [46]. En este trabajo se generó  $0.16\text{ m}^3\text{ H}_2 / \text{m}^3\text{ de H}_2 / \text{m}^3$  del volumen del líquido del reactor / día.

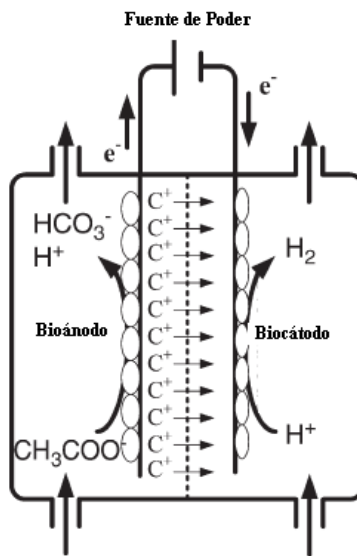


Figura 2.14. Biocátodo y bioánodo en una CEM ( $\text{C}^+$ =Cationes) [46].

Los valores obtenidos de trabajos realizados en celdas CEM con platino y otras alternativas de catalizadores se resumen en la Tabla 1.

Tabla 1. CEM catalizadas con Pt y otros materiales.

Sustrato	Inóculo	Cátodo	Sistema	Potencial Aplicado (V)	Densidad de Corriente (A/m <sup>2</sup> )	Generación H <sub>2</sub> (m <sup>3</sup> /m <sup>3</sup> /d)	Referencia	
Acetato	Previa CCM Alimentada con Agua Residual	Papel Carbón	Doble Cámara/PEM	0.45	0.22	0.37	[17]	
Acetato	Lodos Activados Reactor UASB	Malla de Titanio	Doble Cámara/PEM	0.5	0.5	0.02	[3]	
Agua Residual Doméstica	Lodos de planta de Tratamiento de Aguas Residuales	Papel Carbón	Doble Cámara/PEM	0.5	0.35	0.01	[15]	
Acetato	Previa CCM	Tela de Carbón	Doble Cámara/PEM	1.0	2.4	0.33	[52]	
Acetato	Lodos de planta de Tratamiento de Aguas Residuales	Placa de Titanio	Doble Cámara/PEM	0.8	2.8	0.052	[16]	
Ácido Acético	Previa CEM	Malla de Titanio	Doble Cámara/AEM/PEM	1.0	3 (AEM) 2.2 (PEM)	48 mL/hr (AEM) 33 mL/hr (PEM)	[53]	
<b>Con Platino</b>	Ácido Acético	Lodos de planta de Tratamiento de Aguas Residuales	Tela de Carbón	Doble Cámara/Sin Membrana	1.0	4.7	6.32	[54]
Acetato	Previa CCM	Tela de Carbón	Mono Cámara/Sin Membrana	0.6	9.3	0.53	[55]	
Acetato	Previa CCM	Tela de Carbón	Mono Cámara/Sin Membrana	0.8	11.6	3.12	[31]	

	Sustrato	Inóculo	Cátodo	Sistema	Potencial Aplicado (V)	Densidad de Corriente (A/m <sup>2</sup> )	Generación de H <sub>2</sub> (m <sup>3</sup> /m <sup>3</sup> /d)	Referencia
<b>Con Platino</b>	Acetato	Previa CCM	Papel Carbón	Doble Cámara/PEM	0.35	0.4	0.015	[56]
	P-Glicerol	Lodos de planta de Tratamiento de Aguas Residuales	Tela de Carbón	Mono Cámara/Sin Membrana	0.9	221 A/m <sup>3*</sup>	2.0	[35]
	Melazas	Lodos de planta de Tratamiento de Aguas Residuales	Tela de Carbón con	Mono Cámara/PEM	0.6	5.6	1.41	[36]
	Cerdazas	Lodos de una fosa séptica de una granja	Tela de Carbón	Mono Cámara/Sin Membrana	0.5	4.2	1	[57]
<b>Sin Platino</b>	Acetato	Previa CCM	Tela de Carbón (Biocátodo)	Doble Cámara/PEM	-0.7	-1.2	0.63	[5]
	Acetato	Previa CCM	Tela de Carbón (Biocátodo)	Doble Cámara/PEM	0.5	1.4	0.16	[46]
	Acetato	Previa CCM	Acero Inoxidable A286	Mono Cámara/Sin Membrana	0.9	222 A/m <sup>3*</sup>	1.50	[42]
	Acetato	Previa CCM	Escobilla de Acero Inoxidable (304)	Mono Cámara/Sin Membrana	0.6	88 A/m <sup>3*</sup>	1.7	[41]

\*Densidades de corriente volumétricas en función al volumen del líquido del reactor.

## CAPÍTULO 3: METODOLOGÍA

### 3.1 Diseño, construcción y ensamble de la CEM

Se construyeron 4 Celdas de Electrólisis Microbiana de doble cámara con polimetilmetacrilato. Cada cámara fue de 0.64 L con un volumen de operación de 0.57 L cada una. Las cámaras estuvieron separadas por una membrana tipo PEM (Nafion® 117, DuPont, USA) con un área de 22.2 cm<sup>2</sup> (Figuras 16 y 17). El ánodo y el cátodo se hicieron de tela de grafito con dimensiones de 4 x 8 cm (32 cm<sup>2</sup>), estuvieron sujetos por una tira de malla de acero inoxidable como conductor y unidos con resina epóxica (Figura 3.3), comprobando que la resistencia fuera la mínima posible. La resistencia entre el cable conductor de acero inoxidable y la tela de carbón fue de 10 Ω. El área de los electrodos fue escogida de tal manera que se aprovechara al máximo las dimensiones de cada cámara sin que los electrodos toquen los bordes ni el fondo de la misma [15, 16, 58].

El cátodo se preparó con 0.5 mg/cm<sup>2</sup> de platino (10% Pt/C) y se depositó la tinta catalítica sobre el lado del electrodo que queda frente al ánodo [31, 33]. Lo anterior se hizo de manera manual con un pincel plano de 0.5 cm de ancho y se comprobó la cantidad de tinta depositada correspondiente al área del electrodo mediante peso constante. El biocátodo se obtuvo mediante la inversión de la polaridad de un bioánodo activo [5].

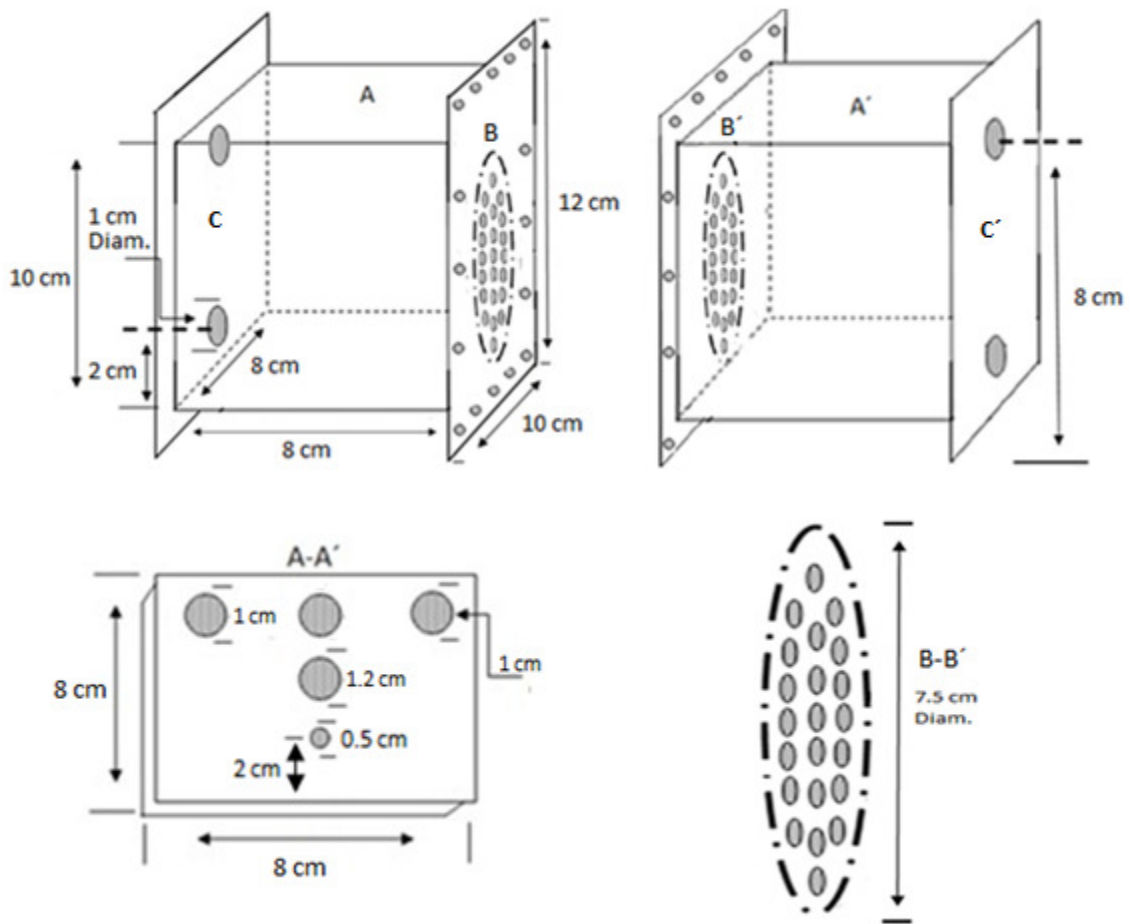


Figura 3.1. Esquema de la CEM empleada en este estudio. (A-A') Tapas de la CEM con 3 orificios de 1 cm de diámetro cada uno para muestreo y salida de gases, 1 orificio de 1.2 cm de diámetro para colocar el electrodo de referencia y un orificio de 0.5 cm para la salida del cable de cada electrodo. (B-B') Soporte para la membrana con una junta tórica de 7.5 cm de diámetro. (C-C') 2 agujeros de 1 cm de diámetro cada uno para entrada y salida de nutrientes.

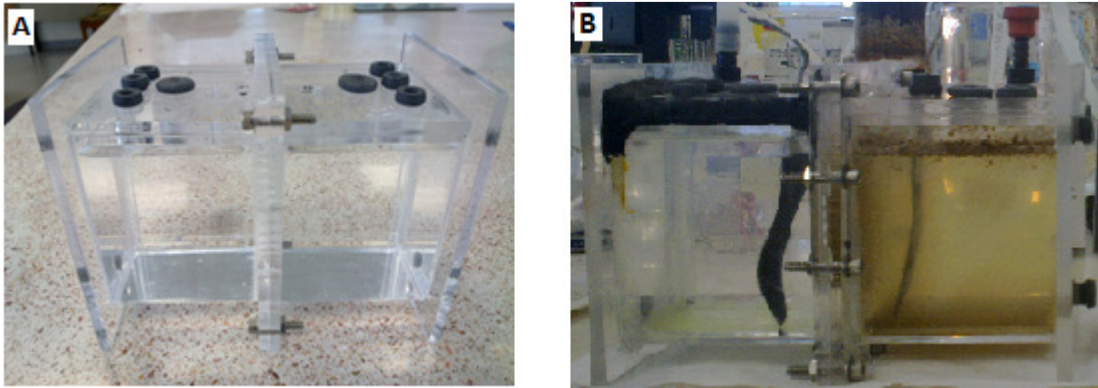


Figura 3.2. (A) Fotografía del prototipo de este estudio y (B) Prototipo armado y en funcionamiento con electrodos de tela de carbón.

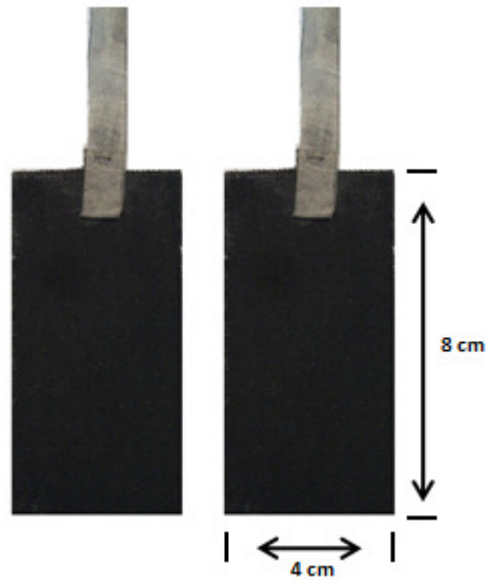


Figura 3.3. Electrodos de tela de carbón sujetados con malla de acero inoxidable como cable conductor.

Las 4 celdas construidas tuvieron la siguiente nomenclatura y función:

- CEM b: Utilizada para la formación del biocátodo. Inició con un cátodo convencional ( $0.5 \text{ mg Pt/cm}^2$ ) y durante el proceso se reemplazó por un bioánodo activo de CEM Reserva.



- CEM Pt: CEM que operó con un cátodo de Pt ( $0.5 \text{ mg Pt /cm}^2$ ) para fines comparativos con respecto a CEM b.
- Control: CEM sin inóculo y sin catalizador.
- CEM Reserva: Se utilizó para obtener un bioánodo para la CEM b durante el proceso de formación del biocátodo.

### **3.2 Sustrato e inóculo**

Para la cámara anódica se preparó un medio de nutrientes de acuerdo a lo publicado por Rozendal *et al.* (2008) [5]:  $0.74 \text{ g/L KCl}$ ,  $0.58 \text{ g/L NaCl}$ ,  $0.68 \text{ g/L KH}_2\text{PO}_4$ ,  $0.87 \text{ g/L K}_2\text{HPO}_4$ ,  $0.28 \text{ g/L NH}_4\text{Cl}$ ,  $0.1 \text{ g/L MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  y  $0.1 \text{ g/L CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ . Se agregó como fuente de carbono  $\text{NaCH}_3\text{COO}$  en la cámara anódica de la CEM Pt [5, 46], utilizando inicialmente  $3.16 \text{ mM}$  [16, 59] y posteriormente  $12.14 \text{ mM}$ , mientras que en la cámara catódica tuvo búfer de fosfatos con una concentración  $50 \text{ mM}$ . Durante el proceso de formación del biocátodo en la CEM b, el  $\text{NaCH}_3\text{COO}$  fue reemplazado por  $10 \text{ mM}$  de  $\text{NaHCO}_3$ . El inóculo empleado fue  $100 \text{ mL}$  de un consorcio microbiano mixto descrito por Alzate *et al.* (2010) [60].

### **3.3 Demanda Química de Oxígeno (DQO)**

Para determinar los porcentajes de remoción de DQO en la celdas se realizó el método 8000 de la USEPA [61, 62], utilizando un digestor Hatch® DBR200 y un colorímetro DR/890 respectivamente. El análisis se realizó al inicio y fin de cada ciclo de 24 horas.

### **3.4 Medición del potencial de hidrógeno (pH)**

Se hicieron mediciones de pH cada 24 horas con un equipo ThermoOrion modelo 350.

### 3.5 Caracterización y medición del gas generado

Para la medición del gas generado se utilizó un medidor de flujo (Ritter MilligasCounter® MGC-1) que tiene la capacidad de medir bajas tasas de flujo y a bajas presiones (Figura 3.4).

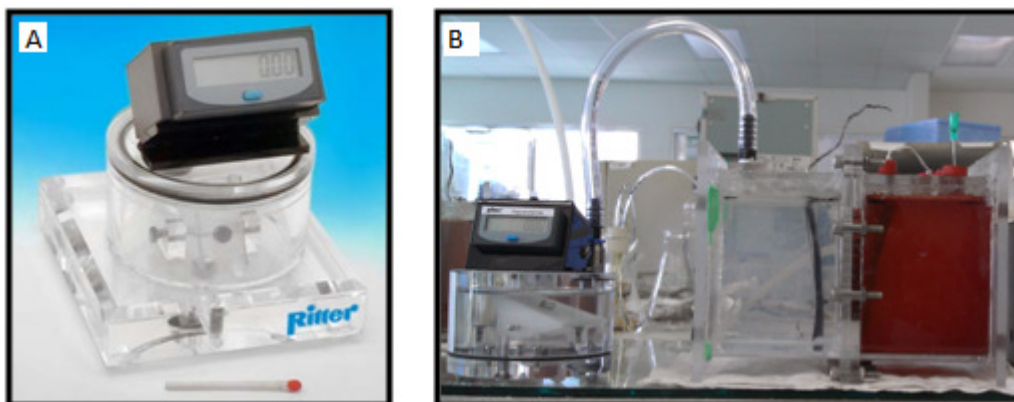


Figura 3.4. (A) MilligasCounter® MGC-1. (B) MilligasCounter® acoplado a la CEM Pt.

Para la caracterización del gas se tomaron muestras de 1 mL de la parte superior de la cámara catódica y se inyectó en un cromatógrafo de gases Perkin Elmer Clarus 500® equipado con un detector de conductividad térmica (TCD) empleando una columna Molsieve (empacada 30 m x 0.53 mm) y nitrógeno como gas acarreador. El volumen de H<sub>2</sub> contenido en el gas (V<sub>t</sub>) fue determinado de acuerdo a Hu *et al.* (2008) [55].

Para el cálculo del volumen de hidrógeno esperado de acuerdo a la carga obtenida de la CEM se utilizó la siguiente fórmula [55]:

$$V_{E,t} = \frac{C_t V_M}{2F}$$

Donde “V<sub>E,t</sub>” (mL) es el volumen de H<sub>2</sub> esperado en el tiempo de muestra determinado basado en la carga (C), “F” es la constante de Faraday (96,485 C/mol), “C<sub>t</sub>” son los Coulombs generados y V<sub>M</sub> es el volumen molar del gas (25,000 mL/mol a 28 °C).

La recuperación catódica de hidrógeno ( $r_{Cat}$ ) se calculó en base a la relación del volumen de hidrógeno obtenido experimentalmente ( $V_t$ ) entre el volumen de hidrógeno esperado ( $V_{E,t}$ )

La tasa de producción de hidrógeno ( $Q$ ) se expresó en  $m^3$  de  $H_2$  generado /  $m^3$  del volumen del líquido del reactor / día ( $m^3/m^3/d$ ) de acuerdo a Logan *et al.* (2008) [13]:

$$Q = 3.68 \times 10^{-5} I_V T r_{Cat}$$

Donde “ $I_V$ ” es la densidad de corriente volumétrica ( $A/m^3$ ) basada en el volumen de operación del reactor, “ $T$ ” es la temperatura (K) y “ $r_{Cat}$ ” la recuperación catódica de hidrógeno.

### 3.6 Análisis electroquímico

El potencial aplicado se llevó a cabo con una fuente de poder ajustable de 0 a 5 V con intervalos de 0.01 V (Departamento de instrumentación del CICY, Mérida, Yucatán, México) y con un potenciostato BioLogic® SAS VSP 400 (Figura 3.5).

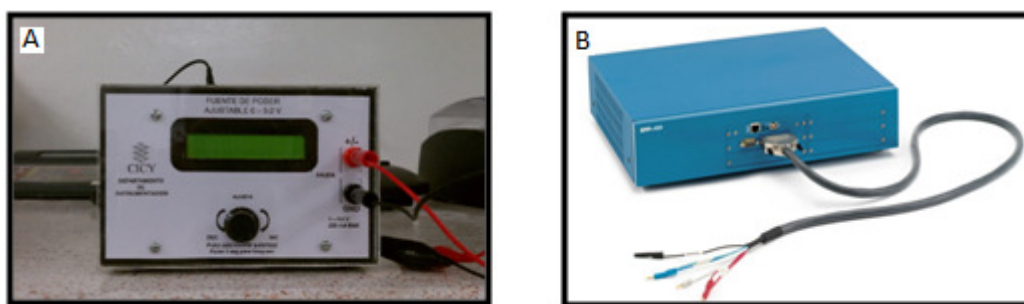


Figura 3.5. (A) Fuente de poder utilizada en el presente trabajo (Ing. Gabriel Pool Balam, Departamento de Instrumentación del CICY, Mérida, Yucatán, México) y (B) Potenciostato BioLogic® SAS VSP 400.

Se realizaron cronoamperometrías y voltamperometrías cíclicas, de igual manera se obtuvieron curvas de polarización y mediciones de potenciales anódicos. En todas las pruebas se utilizaron electrodos de referencia de Calomel (+0.244 V vs. EEH) y como

electrodo auxiliar un alambre de platino Premion® de 8 cm de largo y 0.5 mm de espesor con una pureza del 99.997%. Todos los potenciales están expresados contra el Electrodo Normal de Hidrógeno (EEH).

### 3.7 Inicio y operación

Las 4 celdas fueron sometidas a pruebas de estanqueidad durante una semana, asegurando que no existieran fugas de líquidos y de gases. Las celdas se alimentaron cada 24 horas con 100 ml de nutrientes y fuente de carbono, para CEM Pt fue acetato de sodio y para la CEM b bicarbonato de sodio. Asimismo, CEM Pt fue sometida a 0.6 V y 0.9 V y CEM b a 0.9 V y 1 V. Los potenciales aplicados de las celdas fueron basados en las curvas de polarización realizadas en las mismas, seleccionando aquellos con mayores densidades de corriente. La temperatura de operación para todas las celdas fue  $28 \pm 2$  °C.

#### 3.7.1 CEM Pt

El desarrollo de la CEM Pt se dividió en tres fases.

- Fase I. La CEM Pt inició como una celda de combustible microbiana durante 35 días, con una alimentación de acetato de sodio con una concentración de 3.16 mM de acuerdo a Chae *et al.* (2008) y Gou *et al.* (2010) [16, 59]. Después de alcanzar un potencial máximo a circuito abierto de 0.8 V se procedió a desplazar el oxígeno de la cámara catódica con N<sub>2</sub> (Praxair, 99.999%) durante 20 minutos y se selló completamente para evitar la oxigenación del catolito y así poder convertirla en celda de electrólisis microbiana [31, 57, 63].
- Fase II. La CEM Pt funcionó como CEM para la generación de hidrógeno a un potencial de 0.6 V, con una alimentación de 3.16 mM de acetato de sodio cada 24 h durante 5 meses (Enero-Mayo 2011).

- Fase III. La alimentación fue de 12.14 mM de acetato de sodio cada 24 h basado en Rozendal *et al.* (2008) [5] y se aplicó un potencial de 0.9 V durante 4 meses (Junio-Septiembre 2011). Todas las pruebas electroquímicas en CEM Pt fueron realizadas durante esta fase.

### 3.7.2 CEM b

La CEM b se utilizó para la formación del biocátodo y se inició a partir de 100 mL de la cámara anódica de la CEM Pt durante la Fase III. Esta fase duró 3 meses, de los cuales 1 mes para la formación del biocátodo y 2 meses de operación como CEM catalizada por el biocátodo. Se midieron las densidades de corriente de CEM b con un potenciostato durante todo el proceso de formación del biocátodo, con el objetivo de observar los cambios de corriente de oxidación a reducción. Para fines prácticos, durante la formación del biocátodo se nombró al bioánodo como bioelectrodo. El suministro de H<sub>2</sub> se hizo mediante un tanque de hidruro metálico de 20L (Figura 3.6. MH20, Udomi Fuel Cells ®) para que el bioelectrodo oxidara el gas [5].



Figura 3.6. Tanque de hidruro metálico con 20L de capacidad.

Para conseguir la adaptación a la oxidación de  $H_2$  en la CEM b y posteriormente la inversión de la polaridad del bioelectrodo, se llevaron a cabo las siguientes etapas:

- Etapa 1: Se le suministró hidrógeno a la cámara del bioelectrodo (5.0 ultra alta pureza) para la adaptación de los microorganismos a la oxidación del gas a una velocidad de flujo de 40 mL/min [64]. Durante esta etapa se realizaron pruebas preliminares aplicando un potencial al bioelectrodo de +0.34 V (vs. EEH) durante una semana. Posteriormente se cambió el potencial por +0.1 V con la finalidad de que el bioelectrodo se adaptara a potenciales cada vez más bajos [5]. La fuente de carbono fue de 12.14 mM de acetato de sodio cada 24 h.
- Etapa 2: Cuando la densidad de corriente dejó de presentar cambios con un potencial de +0.1 V (fase estacionaria), se aplicó un potencial sobre el bioelectrodo de -0.2 V (vs. EEH) y posteriormente se eliminó el acetato de sodio del medio de nutrientes y se reemplazó por 10 mM de bicarbonato de sodio cada 24 h como fuente de carbono inorgánico [5].
- Etapa 3: Se interrumpió la alimentación de  $H_2$  y se llevó a cabo un barrido lineal de -0.2 a - 0.8 Volts a una velocidad de 0.025 mV/s con la finalidad de observar el potencial específico en el que se generan corrientes catódicas, que de acuerdo a la literatura, debe ser aproximado al potencial teórico de formación del hidrógeno a pH 7 que es -0.414 V vs. EEH [12]. Finalmente, se procedió a aplicar el potencial obtenido del barrido lineal para convertir el bioelectrodo en un biocátodo. En este punto el cátodo de la CEM b se reemplazó por un bioánodo de la CEM Reserva. La alimentación fue de 10 mM de bicarbonato de sodio cada 24 h [5].

Una vez que se obtuvo la CEM b catalizada por el biocátodo, durante un mes se aplicó un potencial de 0.9 V y posteriormente se aumentó a 1 V por un mes más. Se comparó las densidades de corriente y volúmenes de hidrógeno generado con respecto a CEM Pt [46].

## CAPÍTULO 4: RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1 CEM Pt

La CEM Pt inició como una CCM produciendo electricidad (Fase I) durante 35 días y posteriormente se convirtió a CEM para generar hidrógeno. En esta fase la CEM Pt se inoculó con 100 mL de una CCM con 6 meses de operación (Lab. de Energía Renovable, CICY), la cual a su vez fue iniciada por un inóculo mixto descrito por Alzate *et al.* en el 2010 [60]. La Figura 4.1 muestra el comportamiento del potencial a circuito abierto de la CEM Pt durante esta fase.

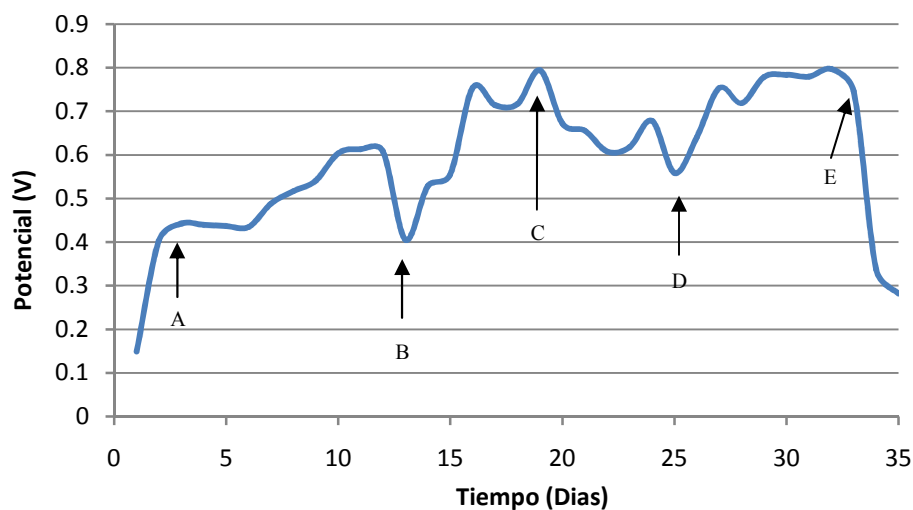


Figura 4.1. Desarrollo del potencial en función del tiempo de CEM Pt. (A) 100 mL inóculo CCM y 1.7 mM Acetato. (B) Cambio catolito. (C) Potencial generado de 0.79 V (D) Cambio de inóculo. (E) Conversión de CCM a CEM.

Como se puede observar en la Figura 4.1, la generación de potencial a circuito abierto alcanzó 0.44 V, el cual se mantuvo constante desde el día 2 al 6 (Figura 4.1A). A partir del día 6 hubo un aumento notable en el potencial, pero este se vio afectado en el día 12 debido a la contaminación del catolito causada por hongos. Se reemplazó el catolito

completamente y se lavó el cátodo con agua destilada (Figura 4.1B). Esto tuvo un impacto positivo ya que en el día 19 generó un potencial de 0.79 V (Figura 4.1C). La literatura menciona que una celda trabajando en modo CCM tiene la capacidad de generar potenciales a circuito abierto de 1.1 V suponiendo una saturación catódica de oxígeno cercana al 100% o utilizando un aceptor de electrones químico como la ferricianida [65]. Sin embargo, de manera experimental las CCM generan alrededor de 0.75 V [66] y máximo de 0.80 V [67] debido a problemas en la superficie del electrodo, las características electroquímicas del mismo y las cinéticas junto con los mecanismos de transferencia de electrones que ocurren en la celda [66].

En el día 25 se reinoculó la celda (Figura 4.1D), de esta manera se generó un potencial de 0.8 V en el día 32. A partir de este día se obtuvo reproducibilidad en el potencial generado.

Desde el día 34 se cambió el modo de operación de la celda a electrólisis microbiana para la generación de hidrógeno (Figura 4.1E), iniciando la anaerobiosis en la cámara catódica con suministro de nitrógeno gaseoso, lo que provocó la disminución del potencial a 0.28 V en el día 35 debido a la ausencia del oxígeno como aceptor de electrones en el cátodo [31, 57].

De manera similar, Call *et al.* (2008) inició una CCM con un inóculo tomado de una celda con 11 meses de operación. El inóculo lo combinó en una proporción 50:50 con el medio de nutrientes y procedió a inocular la CCM. Este proceso fue repetido durante ciclos de 24 h hasta que la celda produjo valores superiores a 0.1 V. Cuando obtuvo voltajes máximos reproducibles durante tres ciclos, la celda se preparó para ser convertida a CEM [31].

#### **4.1.1 Medición del pH en CEM Pt**

Las reacciones en las CEM consumen protones equimolarmente con electrones, el transporte de especies catódicas que no sean protones causa un aumento de pH en la cámara catódica. Ese aumento de pH en el cátodo genera un gradiente de pH a través de la



membrana de intercambio protónico, que afecta el desempeño de la CEM [12]. Por otra parte, la acumulación de protones puede provocar la acidificación de la cámara anódica por problemas de transporte hacia fuera de la biopelícula y de la membrana de intercambio protónico [68]. Debido a lo anterior, los cambios bruscos de pH pueden funcionar como indicadores de fallas en la membrana de intercambio protónico o bien problemas con la solución búfer.

Durante este experimento se observó de manera general que el pH de la CEM Pt se mantuvo estable, oscilando en valores cercanos a 7, tanto para el ánodo como para el cátodo. Los resultados se muestran en la Figura 4.2, donde los pH fueron medidos durante 35 días.

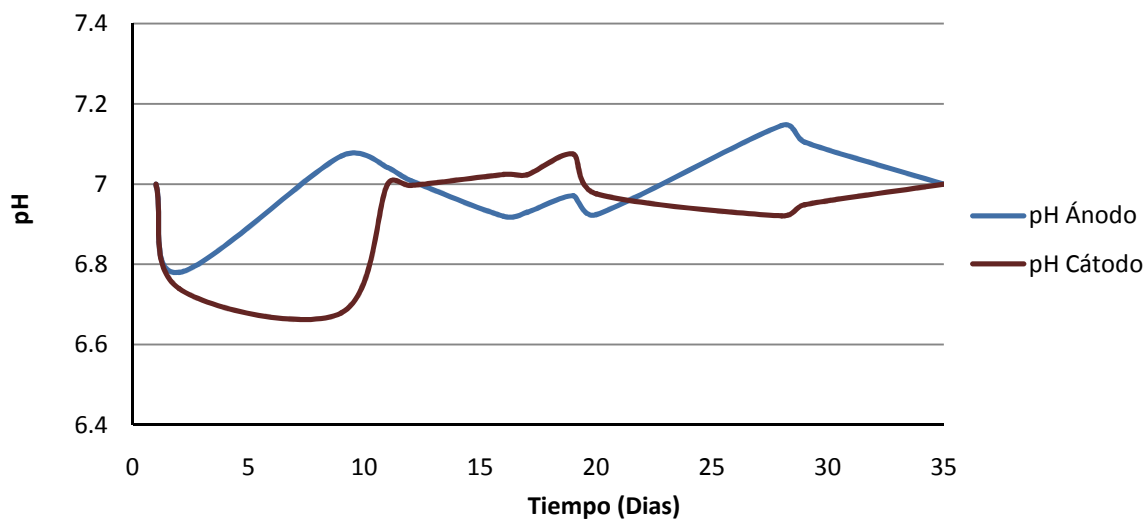


Figura 4.2. Comportamiento de pH en la CEM Pt

En el día 1 el pH tuvo inestabilidad en ánodo y cátodo, ya que por tratarse de un inóculo mixto fue necesaria la estabilización de los microorganismos electroquímicamente activos sobre el ánodo. A partir del día 11 mejoró el pH en las dos cámaras, con valores cercanos al 7. Esto indica que los microorganismos lograron un metabolismo estable, oxidando el acetato de sodio y aportando protones al medio. La importancia de mantener un pH cercano al neutro se debe a dos razones. La primera es que de manera natural los microorganismos

electroquímicamente activos se desarrollan en ambientes con pH cercanos a 7 [12]. Además, en los sistemas biológicos el citoplasma de la mayoría de las células se mantiene a este pH [13]. La segunda es para evitar requerimientos de energía externa excesiva para la formación de hidrógeno. En la sección 2.3 se menciona que de acuerdo a la ecuación de Nernst, el potencial de oxidación del acetato a pH 7 es de -0.3 V vs. EEH [12, 13]. Este valor junto con el potencial del cátodo genera un potencial de celda no espontáneo de -0.114 V (FEM negativa), por lo que de manera teórica se tendría que aplicar un potencial externo de por lo menos 0.114 V para poder producir hidrógeno[13]. Si en la cámara anódica ocurriera una acumulación de protones (disminución de pH), el potencial del ánodo aumentaría, afectando directamente la FEM de la celda convirtiéndola más negativa, por lo que significaría un requerimiento energético mayor para producir hidrógeno. Es importante mencionar que todos los estudios en CEM reportados se han realizado con pH neutro en ánodo y cátodo debido a lo mencionado anteriormente [3, 31, 38, 41, 52, 53, 69].

#### **4.1.2 Análisis electroquímico**

Todas las pruebas electroquímicas que se muestran fueron referenciadas con respecto al Electrodo Estándar de Hidrógeno (EEH) y se llevaron a cabo durante la Fase III.

##### ***a) Voltamperometría Cíclica***

En la Figura 4.3 se muestra una serie de voltamperometrías cíclicas del ánodo bajo diferentes condiciones. La primer prueba se realizó en la CEM Pt recién alimentada con 12.14 mM de acetato (línea azul) y posteriormente se llevaron a cabo voltamperogramas de la celda 24 h después de alimentar (línea verde) y sin fuente de carbono (línea roja). Se pudieron observar principalmente 4 reacciones redox, 2 de oxidación y 2 de reducción en la celda recién alimentada.

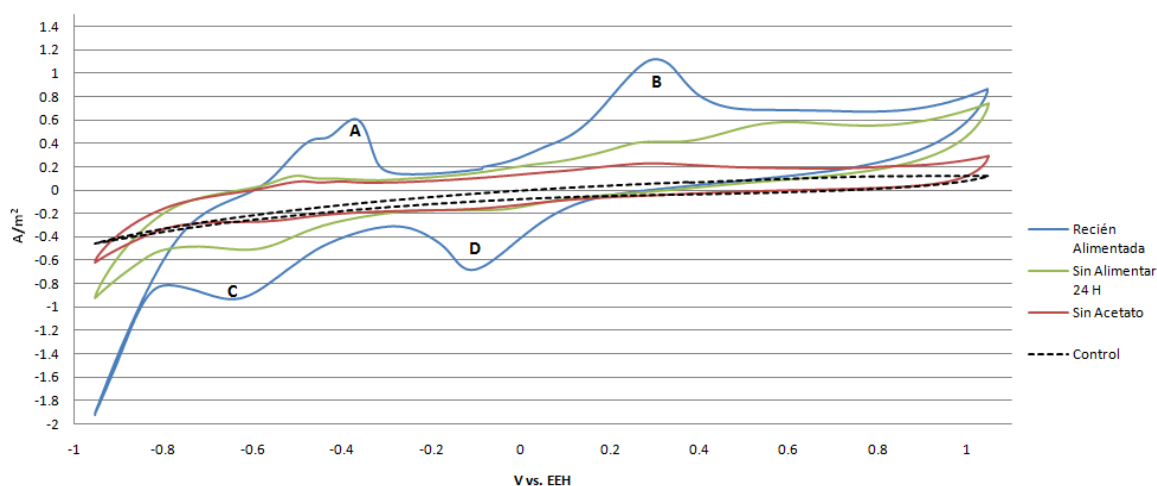


Figura 4.3. Voltamperogramas cíclicos del ánodo de CEM Pt. Barridos de +1V a -1V (vs. EEH) a 10 mV/s. (A) Oxidación de acetato. (B) Posible actividad del citocromo C. (C) No identificado. (D) potencial redox del Humus.

En la Figura 4.3A inició un punto de oxidación a partir de -0.35 V, el cual se aproxima al potencial redox del acetato [3, 70].

El punto de oxidación en +0.30 V (4.3B) podría deberse a la actividad del citocromo C [66, 71]. El citocromo C es una proteína con actividad redox involucrada en la cadena respiratoria [71]. Se ha demostrado en estudios con bacterias reductoras de metales, tales como en cepas de *Shewanella* y *Geobacter*, que los citocromos C pueden actuar como conductores directos para el flujo de electrones hacia la fase sólida del aceptor de electrones, que en el caso de la CEM Pt sería el ánodo de tela de carbón.

En el punto 4.3C se observó un potencial de reducción de -0.62 V el cual no pudo ser identificado. Sin embargo, podría corresponder a algún mediador redox generado por los microorganismos presentes en el bioánodo, aunque sería necesario realizar un barrido a menor velocidad ( $< 10$  mV/s) para encontrar posibles pares redox. En estudios previos se ha mencionado que muchos de los microorganismos electroquímicamente activos tienen la capacidad de excretar mediadores redox al medio, tal como la piocianina, que es generada

por la bacteria *Pseudomonas aeruginosa* y participa en la transferencia de electrones hacia el ánodo [44, 72].

Finalmente se observó un potencial de reducción a  $-0.1$  V (4.3D) que se aproxima al potencial redox de Antraquinona-2,6-disulfonato (AQDS) [73]. El AQDS es considerado como compuesto modelo del humus, que es la materia orgánica recalcitrante transformada y estabilizada que se acumula en el suelo y en los sedimentos acuáticos y que constituye la fracción orgánica más abundante de la biosfera [74]. Debido a su naturaleza, es probable que el compuesto provino de los lodos empleados como inóculo en este estudio, ya que contuvo fracciones tomadas del suelo [60]. La presencia de humus en el anolito de CEM Pt pudo ser benéfico para el sistema de transferencia de electrones, ya que Lovley *et al.* (1996) demostró que algunos microorganismos electroquímicamente activos como *Geobacter metallireducens* tienen la capacidad de utilizar las sustancias húmicas como aceptores de electrones para la oxidación de compuestos orgánicos como el acetato [73, 74].

Con respecto a los siguientes voltamperogramas de la Figura 4.3, después de 24 horas se realizó una segunda prueba antes de ser alimentada (línea verde), notándose una disminución en el pico de oxidación del acetato y también en los puntos redox mencionados. Posteriormente, se reemplazó por completo el anolito, pero esta vez sin fuente de carbono (línea roja). Con estas condiciones se puede apreciar la ausencia total del pico de oxidación del acetato. Finalmente se obtuvo un voltamperograma de la celda control sin biopelícula (línea punteada). Por tratarse de una prueba control no se detectaron puntos redox, indicando que no hay sustancias electroquímicamente activas ni actividad electroquímica microbiana.

### ***b) Curva de polarización***

La curva de polarización en las CEM es una herramienta útil para detectar los potenciales en los que se generan mayores densidades de corriente. Se realizaron curvas de polarización

de celda completa con potenciales aplicados de 0.1 a 1 V la cual se muestra en la Figura 4.4.

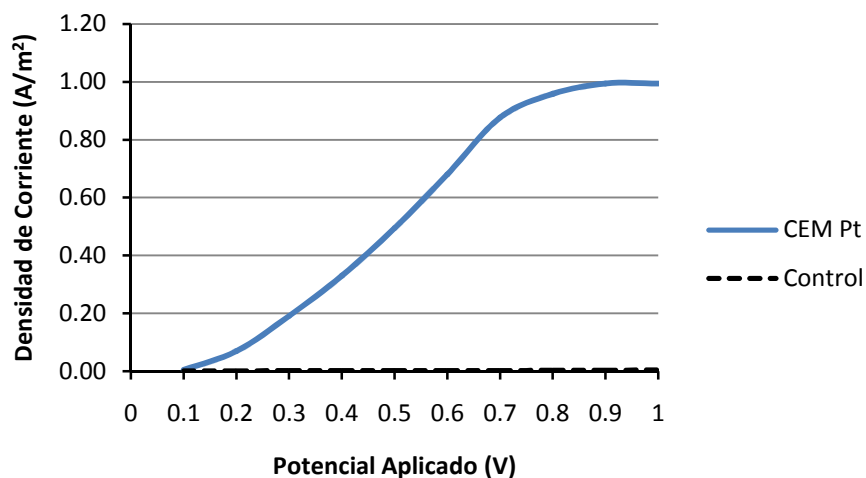


Figura 4.4. Curva de polarización de la CEM Pt.

La generación de corriente significativa empezó a partir de un potencial de 0.6 V ( $0.7 \text{ A/m}^2$ ). Entre 0.1 V y 0.7 V las densidades de corriente incrementaron en proporción al potencial aplicado. Sin embargo, a partir de 0.8 V la densidad de corriente se mantuvo constante mientras se aumentaba en potencial. A los 0.9 V se obtuvo una densidad de corriente de  $0.99 \text{ A/m}^2$ , mientras que a 1 V se generó exactamente lo mismo, por lo que se decidió tomar el valor de 0.9 V como potencial final para aplicar en la CEM Pt. Sin embargo, se hicieron pruebas previas aplicando a CEM Pt un potencial de 0.6 V. La efectividad de una CEM por lo general está relacionada directamente a la densidad de corriente, por lo que a mayores densidades habrá mejor desempeño en la celda [75].

### c) *Potencial del bioánodo*

El potencial en reposo del bioánodo de este estudio fue en promedio de  $-0.23 \text{ V}$  vs. EEH, el cual se mantuvo cercano a lo publicado en la literatura. Liu *et al.* (2004, 2005) y Rozendal *et al.* (2006) citaron que de manera experimental el potencial de un bioánodo funcional a pH 7 se encuentra alrededor de  $-0.2 \text{ V}$  (vs. EEH) [3, 32, 76]. De igual manera, Aelterman *et*

*al.* (2008) y Wang *et al.* (2010) mencionaron que mientras menor sea el potencial del bioánodo habrá mejor desempeño durante la operación del sistema, esto debido a que bajos potenciales indican más energía para los microorganismos cuando esta cerca del potencial de reacción del NADH (-0.32V vs. EEH), que es un valor considerado por Rebaey *et al.* (2005) como potencial óptimo para un bioánodo [63, 66, 77]. Wang *et al.* (2010) obtuvieron potenciales de un bioánodo en promedio de -0.2 V a pH entre 6.8 y 7. Con lo anterior demostraron que se mejoraba las densidades de corriente y se generaba mas volumen de hidrógeno conforme el potencial del bioánodo se acercaba a este valor. De igual manera, Chae *et al.* (2008) utilizó el potencial de un bioánodo como indicador para saber si la solución de alimentación necesitaba ser reemplazada cuando el valor se volvía menos negativo [16].

#### **4.1.3 Generación de H<sub>2</sub> y otros gases**

La producción de hidrógeno obtenida se expresó en  $m^3/m^3/d$ , que corresponde a  $m^3$  de H<sub>2</sub> generado /  $m^3$  del volumen del líquido del reactor / día [13].

##### ***a) Pruebas preliminares durante la Fase II***

En la Fase II (3.16 mM acetato) se realizó una prueba de generación de H<sub>2</sub> por 8 días a un potencial de 0.6 V. Durante la prueba se notó un ligero burbujeo sobre el cátodo (Figura 4.5), tal como mencionó Rozendal *et al.* (2006) en sus primeros trabajos en CEM [3]. Lo anterior se corroboró tomando una muestra para cromatografía de gases, indicando finalmente la presencia de hidrógeno (Figura 4.6).

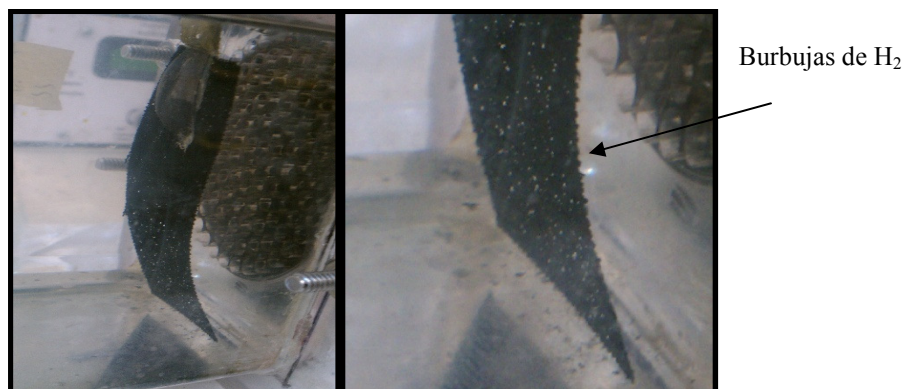


Figura 4.5. Generación de  $H_2$  en el cátodo de CEM Pt.

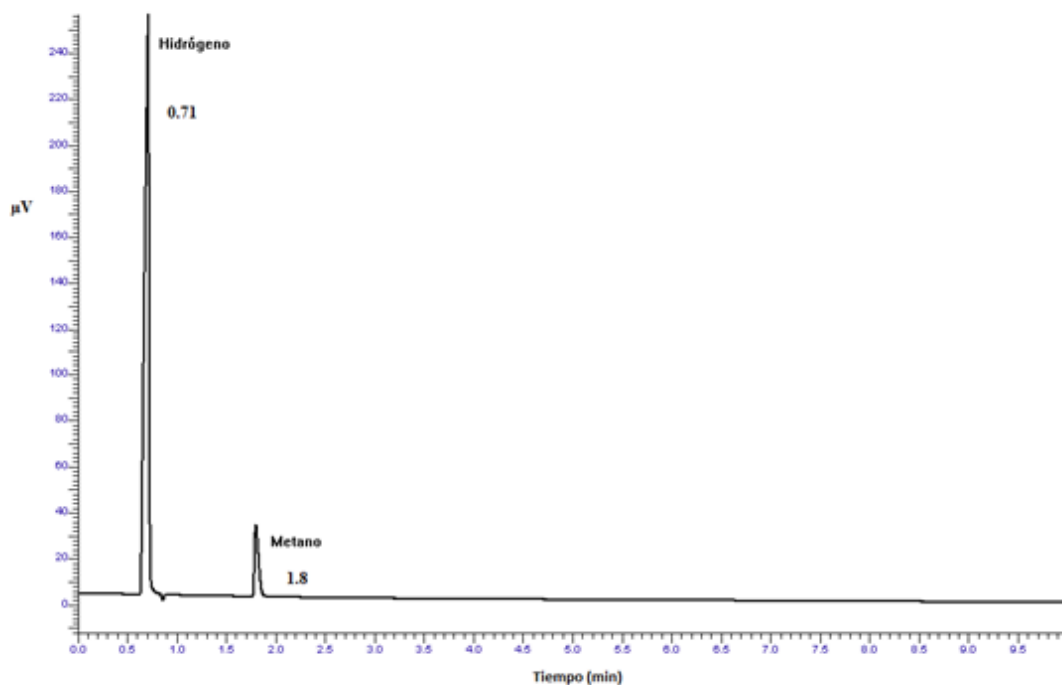


Figura 4.6. Cromatograma de la cámara catódica en CEM Pt durante la Fase II.

En la literatura se menciona que el hidrógeno puede producirse al aplicar un potencial teórico alrededor de los 0.11 V, pero de manera experimental se necesita mayores potenciales debido a los sobrepotenciales del cátodo [17, 75], además de que los microorganismos electroquímicamente activos consumen parte de esa energía para su crecimiento y mantenimiento metabólico [3].

El volumen total de hidrógeno producido en los 8 días de prueba fue de 13.6 mL, que corresponden a 1.7mL H<sub>2</sub>/día a 0.6 V.

### ***b) Pruebas finales durante la Fase III***

En la Fase III (12.14 mM y 0.9 V) la generación de H<sub>2</sub> se inició en un día, notándose el característico burbujeo de H<sub>2</sub> en el cátodo, mientras que en la Fase II demoró alrededor de una semana para que se generara hidrógeno. En 24 horas de operación con un potencial aplicado de 0.9 V, la CEM Pt generó una densidad de corriente de 2 A/m<sup>2</sup>, produciendo 27 mL H<sub>2</sub>/ día (0.032 m<sup>3</sup>/m<sup>3</sup>/d). La concentración de H<sub>2</sub> en el cátodo fue de 38%, mientras que el metano representó menos del 1%.

Para calcular el volumen de H<sub>2</sub> que se podría formar en la CEM Pt (volumen esperado de hidrógeno), se realizó una cronoamperometría durante 24 horas (Figura 4.7) y a partir de la gráfica se determinó la carga generada integrando la corriente sobre el tiempo (Figura 4.8), calculando finalmente el H<sub>2</sub> esperado de acuerdo a Hu *et al.* (2008).

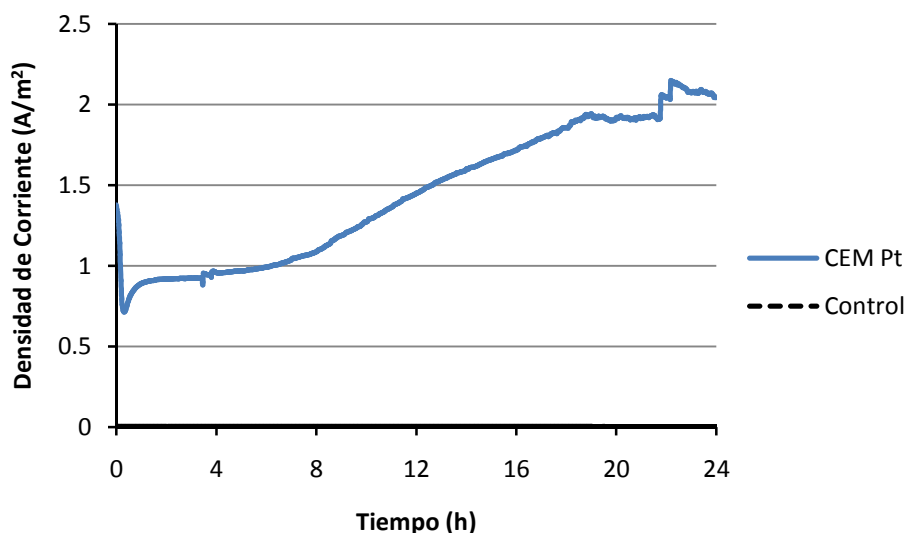


Figura 4.7. Cronoamperometría durante 24 h y a un potencial de 0.9V



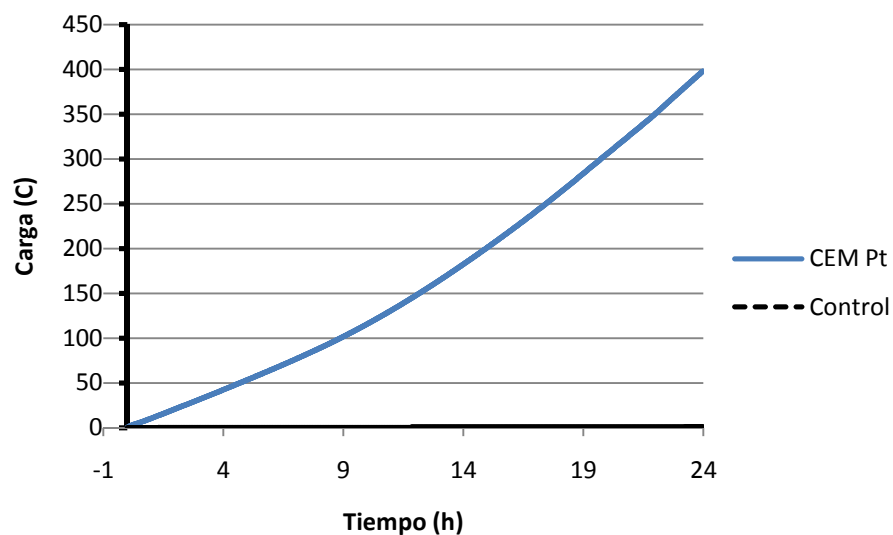


Figura 4.8. Carga generada durante 24 h y a un potencial de 0.9V

En la Figura 4.8 se muestra que CEM Pt generó una carga de 398 C, por lo que pudo generar hasta 52 mL H<sub>2</sub>/ día. Este valor indica que el hidrógeno generado experimentalmente durante la Fase III representó el 52% del total que se podría formar en la CEM por día (recuperación catódica de hidrógeno), mientras que el resto (48%) probablemente se perdió debido a fugas en el sistema o bien por difusión hacia el ánodo a través de la membrana [3].

Tabla 2. CEM catalizadas con Pt y alimentadas con acetato.

Cátodo/Pt (mg/cm <sup>2</sup> )	Sistema	Potencial Aplicado (V)	Densidad de Corriente (A/m <sup>2</sup> )	r <sub>Cat</sub> (%)	Q (m <sup>3</sup> /m <sup>3</sup> /d)	Referencia
Malla de Ti/5	Doble Cámara/PEM	0.5	0.5	57	0.02	[3]
Malla de Ti/5	Doble Cámara/PEM	1	2.4	95	0.33	[52]
Placa de Ti/0.5	Doble Cámara/PEM	0.8	2.8	85	0.052	[16]
Tela de carbón/0.5	Doble Cámara/AEM	0.6	-	95	1.1	[58]
Tela de carbón/0.5	Doble Cámara	1	4.7	100	6.32	[54]
Tela de carbón/0.5	Doble Cámara/PEM	0.9	2	52	0.032	Presente estudio.

En la Tabla 2 se muestra que en el presente estudio se obtuvo una producción baja comparada con otros trabajos como Cheng *et al.* (2007) con 1.1 m<sup>3</sup>/m<sup>3</sup>/d a 0.6 V [58] o Tartakovsky *et al.* (2009) con 6.32 m<sup>3</sup>/m<sup>3</sup>/d a 1 V [54]. Es probable que esto se haya debido por fugas del gas o la conversión del mismo a otros gases indeseables como el CH<sub>4</sub> por acción de microorganismos metanogénicos [3]. Lo anterior se ve reflejado en el porcentaje de recuperación catódica de hidrógeno en las CEM. Por ejemplo, en el trabajo de Tartakovsky *et al.* (2009), se tuvo un porcentaje de recuperación catódica de 100%, mientras que en este estudio fue de 52 % (Tabla 2) [54]. Cabe resaltar que en el trabajo de Tartakovsky *et al.* (2009) la CEM no tuvo membrana, que puede ser otro factor influyente en los bajos desempeños. El uso de la membrana en CEM reduce el cruce de especies y bacterias de ánodo a cátodo, ayuda a mantener la pureza del hidrógeno generado en el cátodo y funciona como un separador para evitar cualquier corto circuito entre los electrodos [6]. El problema de utilizar membrana en una CEM es que puede afectar la transferencia de protones a pH neutro, por lo que provoca que aumente la resistencia interna y disminuya el desempeño de la celda [6]. Dentro de este contexto, se ha reportado que la membrana Nafion® puede representar hasta el 86% de la resistencia interna de la celda [78]. Por otra parte el uso de CEM sin membrana también tiene desventajas, si la

CEM no está diseñada correctamente para recuperar el H<sub>2</sub> generado, todo el gas puede ser convertido rápidamente a CH<sub>4</sub> [59]. También puede suceder la reoxidación de H<sub>2</sub> por microorganismos electroquímicamente activos, lo cual incrementa las pérdidas energéticas de la CEM [79, 80]. Además, los productos metabólicos gaseosos generados por el ánodo como el CO<sub>2</sub> y el H<sub>2</sub>S pueden reducir la pureza del hidrógeno generado por el cátodo [12].

La CEM Pt tuvo resultados cercanos a los obtenidos por Chae *et al.* (2008), que generaron 0.05 m<sup>3</sup>/m<sup>3</sup>/d con un potencial de 0.8V [16]. Es importante mencionar que de igual manera los diseños fueron similares (forma de cubo), pero CEM Pt fue de mayor tamaño (1.28 L vs. 0.36 L).

### ***c) Cámara Anódica***

La cámara anódica generó metano con una concentración del 30%, que pudo ocurrir por medio de metanogénesis hidrogenotrófica [3, 81] a consecuencia de la alimentación semicontinua empleada (100 mL/día), lo que originó un tiempo de retención hidráulico elevado y por lo tanto se dieron las condiciones favorables para el desarrollo de los microorganismos generadores de metano. En el presente estudio se tuvo un TRH de 5.7 días, mientras que en otros trabajos con alimentación semicontinua han tenido TRH de 1 día, debido a que reemplazan completamente el anólito al final de cada ciclo [31, 36]. Según Lee *et al.* (2009) [82], los microorganismos metanogénicos hidrogenotróficos no necesitan un ánodo como aceptor final de electrones para su respiración, puesto que utilizan solo el bicarbonato disuelto para este fin (generado por el metabolismo de los microorganismos electroquímicamente activos) y el H<sub>2</sub> como donador de electrones; así que no necesitan sujetarse en el ánodo. Esta habilidad metabólica sugiere que a TRH cortos se podría disminuir la generación de metano en la cámara anódica, inclusive también en el cátodo debido a la difusión del gas a través de la membrana [16]. Además de la disminución del TRH, se han propuesto otras alternativas para minimizar la formación del CH<sub>4</sub>, tal como la exposición temporal al aire de la cámara anódica en determinado tiempo o al final de cada ciclo batch [31, 35, 36, 41, 57], o bien el uso de químicos que inhiban el

desarrollo de microorganismos metanogénicos como el ácido 2-bromoetano sulfónico [64, 83].

Al final de cada prueba de generación de hidrógeno, se detectó un olor similar a sulfuro de hidrógeno en la cámara anódica, lo cual sugiere que ocurrieron reacciones de reducción de sulfatos en el sistema. Probablemente se haya debido a la composición del medio de nutrientes, que contuvo sulfato de magnesio (véase “sustrato e inóculo” en la sección 3.2). También es posible que sulfuro de hidrógeno haya logrado pasar hacia la cámara catódica, ya que también se percibió el olor en esa cámara [15, 84]. Sin embargo, en este trabajo no se estudió la presencia de sulfatos.

#### 4.1.4 Comunidad microbiana

Durante la Fase III, el anolito de CEM Pt cambió su color de café oscuro a color rojo después de un mes de operación (Figura 4.9).

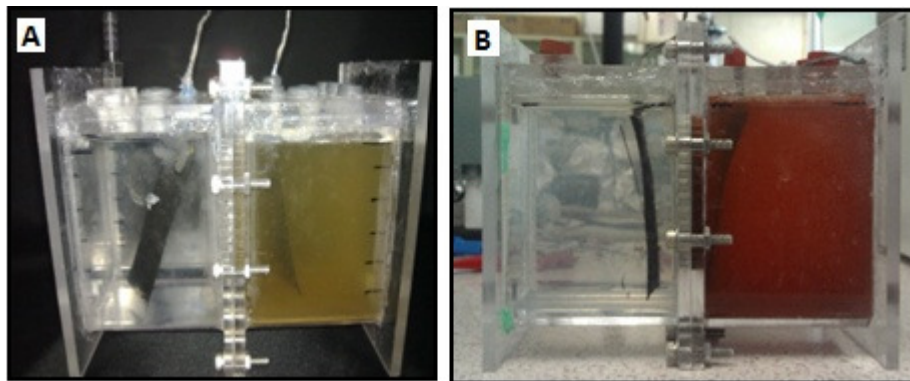


Figura 4.9. Cambio en el color del anolito. (A) CEM Pt recién inoculada y (B) después de un mes en operación.

De acuerdo a estudios realizados por Logan *et al.* (2007) y Xing *et al.* (2008) [85, 86], es probable que la coloración del medio sea por el crecimiento de *Rhodospseudomonas palustris*, que son bacterias gram negativas púrpuras no sulfurosas fotoheterótrofas

presentes en aguas residuales. Sin embargo, se requiere su identificación molecular para confirmar la presencia de la especie bacteriana mencionada.

#### **4.1.5 Análisis de DQO**

La CEM Pt oxidó 0.51g/L de acetato de sodio en 24 horas, lo que corresponde a un porcentaje de remoción de 41%. Desde la perspectiva de tratamiento de aguas residuales, las CEM tienen la capacidad de reducir cargas orgánicas, por lo que puede ser utilizada como una opción de biorremediación. Comparado con sistemas convencionales de tratamiento de aguas residuales que generan metano, las CEM generalmente muestran menores cargas de DQO [12]. Sin embargo, en términos económicos, el hidrógeno (aprox. 6 USD/kg) tiene más valor que el metano (aprox. 0.43 USD/kg), por lo que las CEM tienen la ventaja de generar un producto de mayor valor con la misma cantidad de DQO [87].

## **4.2 CEM b**

En los puntos 4.2.1 y 4.2.2 la CEM b funcionó en media celda con suministro de hidrógeno y conectada un potenciostato para obtener el biocátodo. Una vez formado el biocátodo, en el punto 4.2.3 CEM b funcionó como celda completa con un bioánodo transferido de CEM Reserva y con un potencial aplicado por una fuente de poder.

### **4.2.1 Pruebas preliminares para la formación del biocátodo**

Como prueba preliminar se aplicó un potencial de +0.34 V (vs. EEH) sobre el bioelectrodo de CEM b durante 24 horas. A las 18 h se suministró hidrógeno (40 mL/min) e inmediatamente aumentó la densidad de corriente (Figura 4.10). Esto se debió a la oxidación de H<sub>2</sub> por parte de los microorganismos electroquímicamente activos [5, 64].

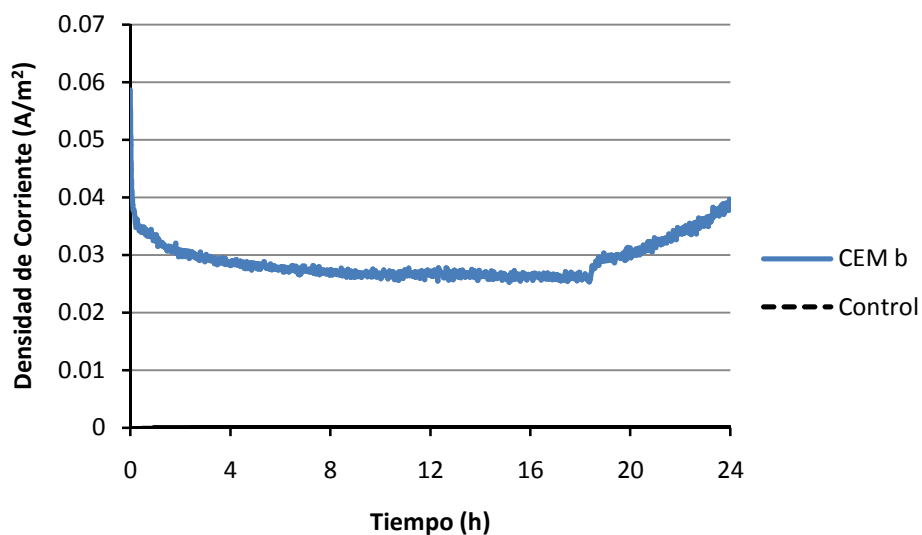


Figura 4.10. Pruebas preliminares para la formación del biocátodo a +0.34V (vs. EEH) durante 24 h.

Se decidió hacer pruebas con suministro de  $H_2$  intermitente para observar la respuesta de la densidad de corriente de manera similar a como lo hizo Parameswaran *et al.* (2011) (Figura 4.11). Lo anterior debido a que no se contó con un sistema que proporcionara un flujo continuo de  $H_2$  por largos periodos como lo sugiere Rozendal *et al.* (2008), por lo que en este estudio el flujo se llevó a cabo de manera intermitente con un tanque de hidruro metálico con capacidad de 20 L.

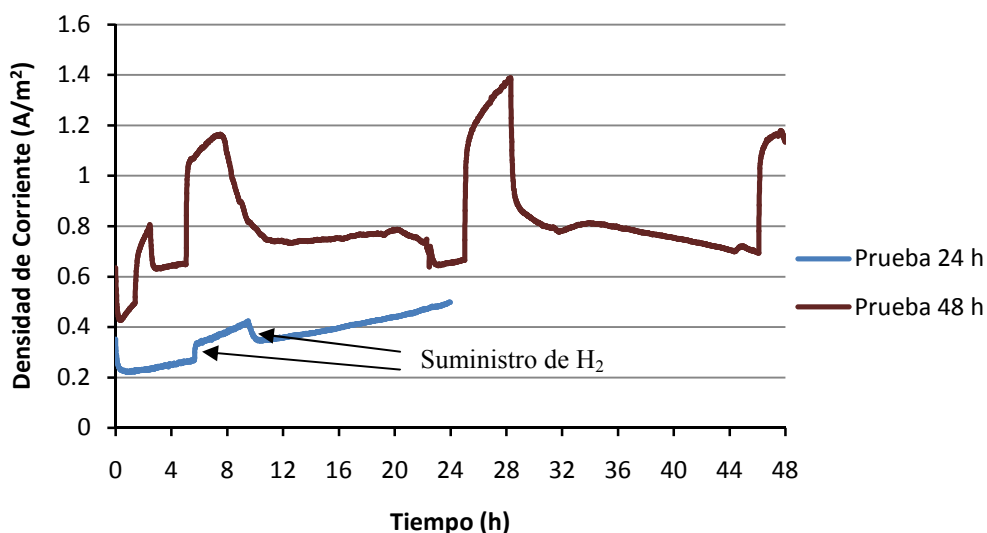


Figura 4.11. Pruebas preliminares para la formación del biocátodo. Oxidación de  $H_2$  a  $+0.34$  V (vs. EEH) durante 24 h (línea azul) y 48 h (línea café) con suministro intermitente de  $H_2$ .

En la Figura 4.11 se muestra una prueba de 24 h para la oxidación de  $H_2$  (Línea Azul) y otra de 48 h (línea café). En la primer prueba (línea azul) se suministró  $H_2$  a las 5.5 h durante 4 horas continuas. Se puede observar que durante este lapso hubo un aumento en la densidad de corriente de  $0.27$   $A/m^2$  a  $0.42$   $A/m^2$ . Al interrumpir el flujo de  $H_2$  (9.5 h), la corriente bajó hasta  $0.35$   $A/m^2$ , sin embargo, la tendencia continuó siendo positiva llegando hasta los  $0.5$   $A/m^2$  al final de la prueba.

La siguiente prueba fue de 48 horas (línea café) y se realizó inmediatamente después de la anterior. Nótese que el comportamiento fue el mismo que en la prueba de 24 horas, pero las densidades de corrientes fueron mayores, llegando a un máximo de  $1.4$   $A/m^2$  a las 28 h. Esto indicó que conforme se adaptaban los microorganismos a la oxidación del  $H_2$ , las densidades de corriente aumentaban gradualmente con cada prueba con el suministro de hidrógeno. Lo anterior se comprobó con la prueba de la Figura 4.10, en la que el bioánodo no había sido sometido al suministro de  $H_2$  con anterioridad, por lo que las densidades máximas generadas al momento de oxidar el gas fueron bajas ( $0.04$   $A/m^2$ ), mientras que en la prueba de 24 horas de la Figura 4.11 inició generando alrededor de  $0.20$   $A/m^2$  con una diferencia de 7 días entre ambas pruebas.

#### 4.2.2 Formación del biocátodo en CEM b

Después de observar el comportamiento del bioelectrodo ante la oxidación del  $H_2$  se decidió iniciar el proceso de formación del biocátodo. Para esto se llevó a cabo una cronoamperometría de 400 h en la que se aplicaron +0.1 V, -0.2 V y -0.7 V.

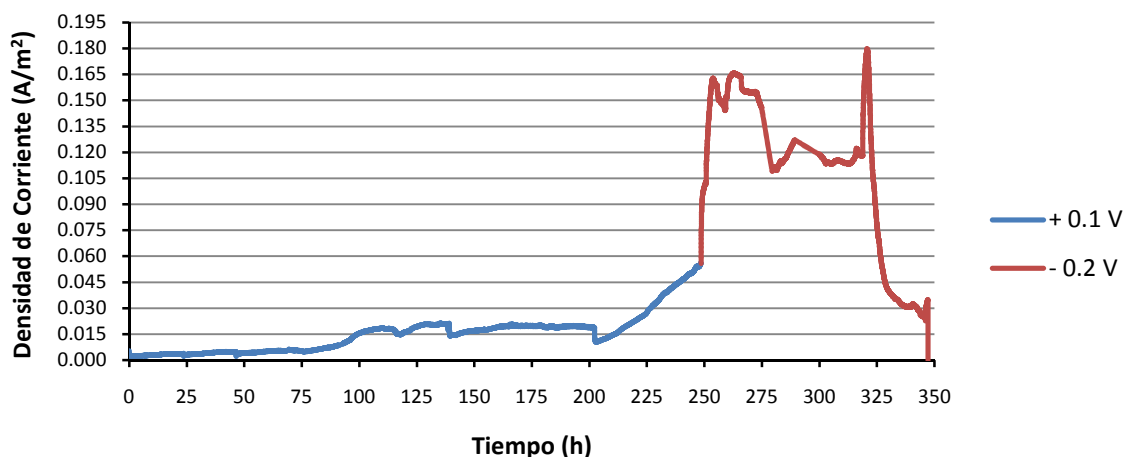


Figura 4.12. Desarrollo de la corriente durante la formación del biocátodo en CEM b.

Se inició con un potencial de +0.1 V (vs. EEH) durante 250 h (Figura 4.12, Línea Azul). En las primeras horas la corriente fue casi nula, notándose un ligero cambio a partir de las 75 h, sin embargo, fue a partir de las 200 h cuando la corriente aumentó hasta los 0.060 A/m<sup>2</sup>. Después se aplicó un potencial de -0.2 V (vs. EEH) a las 250 h durante 100 h, generando una corriente máxima de 0.18 A/m<sup>2</sup> (Figura 4.12, Línea Café). A las 325 h hubo un descenso en la corriente debido a la interrupción del suministro de  $H_2$ . Al aplicar potenciales negativos se esperaba que la corriente del sistema disminuyera con respecto a las corrientes generadas a +0.1 V, sin embargo en este caso sucedió lo contrario. Esto se debió a que las primeras 200 horas de oxidación sirvieron de adaptación para los microorganismos a un potencial ligeramente positivo (+0.1 V) mientras oxidaban  $H_2$ , por lo que hubiera sido deseable mantener este potencial durante un periodo más largo (>300 h) para que la corriente aumentara al doble o más de acuerdo al comportamiento de la grafica para la obtención de un biocátodo realizada por Rozendal *et al.* (2008) [5]. De esta manera,



al aplicar un potencial de -0.2 V, por tratarse de un potencial negativo, la corriente resultante debería ser más pequeña [5]. Lo anterior debido a que el potencial negativo obliga al microorganismo a que revierta su mecanismo de oxidación y lo convierta gradualmente a reducción (conforme se va disminuyendo el potencial), esto gracias a la reversibilidad de la hidrogenasa [5, 48].

A las 350 h se detuvo la prueba para llevar a cabo un barrido que permitió obtener el potencial de inversión de la polaridad del bioelectrodo, o bien la reversibilidad completa de la hidrogenasa (Figura 4.13) [5]. Con este barrido se pretendió observar que tan negativo tenía que ser el potencial para revertir el mecanismo de oxidación de  $H_2$  del microorganismo, por lo que se esperaba obtener un potencial con densidades de corrientes más negativas, las cuales serían indicadoras de reacciones de reducción.

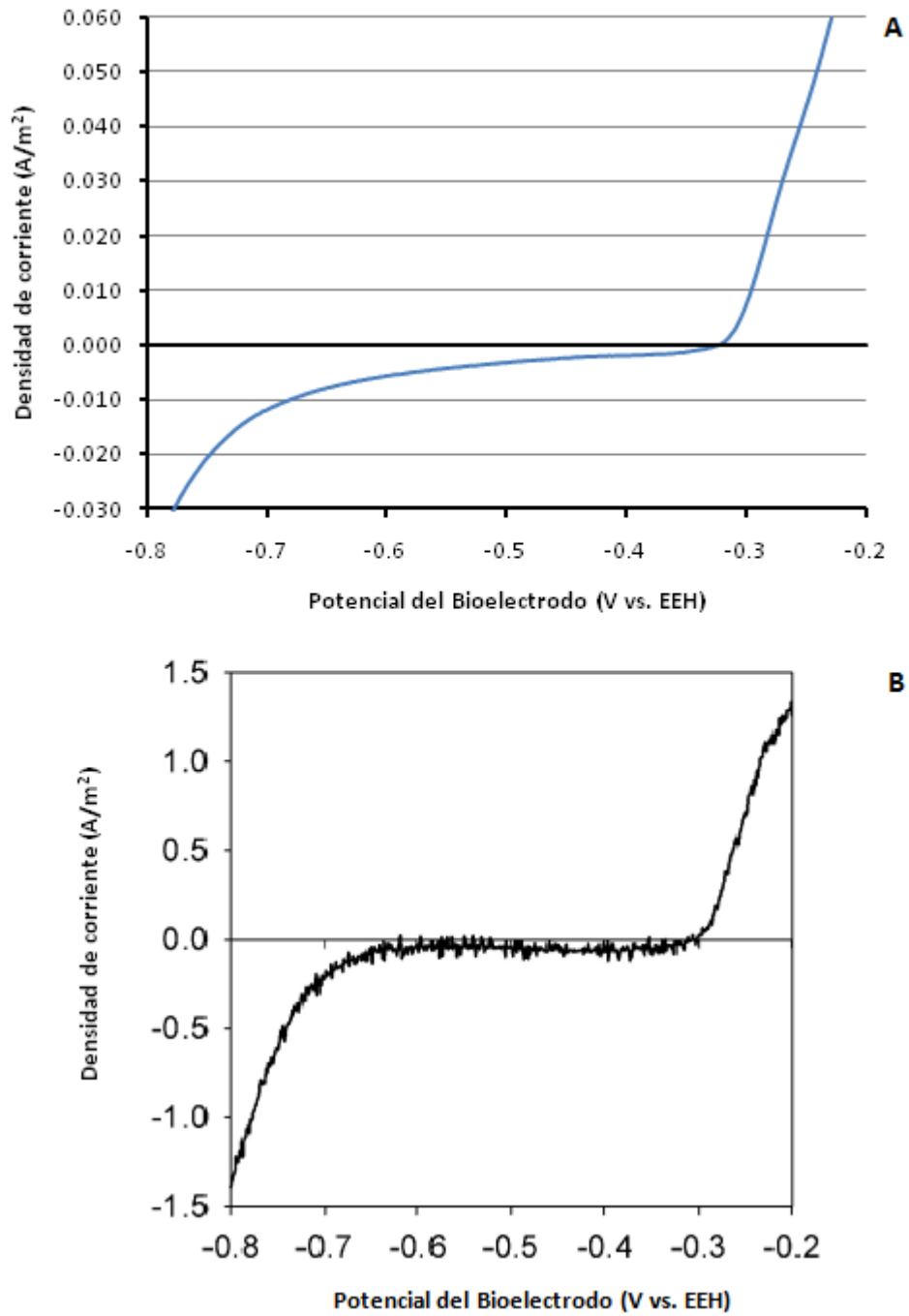


Figura 4.13. (A) Barrido para la inversión de la polaridad del bioelectrodo de -0.2 a -0.8V vs. EEH a 0.025 mV/S y (B) barrido obtenido por Rozendal *et al.*(2008) de iguales características de operación [5].

Durante el barrido se observó que a partir de -0.3 a -0.4 V (vs. EEH) hubo generación de corrientes catódicas aproximadamente de  $-0.002 \text{ A/m}^2$ , llegando a un máximo de  $-0.023 \text{ A/m}^2$  a -0.75 V (Figura 4.13A). El perfil de la gráfica es similar a la obtenida por Rozendal *et al.* (2008) (Figura 4.13B) [5], pero la magnitud de las densidades de corriente fueron 50 veces mayores que en el presente estudio. Esto se debió al tiempo de adaptación de los microorganismos al proceso de formación del biocátodo, ya que Rozendal *et al.* (2008) [5] empleó alrededor de 25 días para la obtención del biocátodo y con un flujo continuo de hidrógeno, que permitió que los microorganismos mejoren su mecanismo de oxidación por medio de la hidrogenasa, mientras que en este trabajo la formación del biocátodo duró 16 días y no se contó con flujo continuo del gas [5]. Sin embargo, la generación de corrientes catódicas en el barrido de la Figura 4.13A se aproxima al potencial teórico de formación de hidrógeno a pH 7 ( $-0.414\text{V}$  vs EEH) [12], lo cual indica que si se mejora el procedimiento aumentando en el tiempo en la formación del biocátodo, se podría obtener un biocátodo con bajos sobrepotenciales.

Al final del barrido se eliminó el suministro  $\text{H}_2$  y se cambió la alimentación del medio por 10 mM de bicarbonato de sodio para poder obtener el biocátodo. Por lo general, los microorganismos quimiolitautotrofos juegan un papel importante en este tipo de biocátodos, porque el cátodo actúa como donador de electrones para generación de ATP y por lo tanto, el mantenimiento metabólico del microorganismo. Como consecuencia, es necesario que estos microorganismos fijen carbono a partir del bicarbonato presente en el medio [75]. Un ejemplo de este caso podría ser la desnitrificación autotrofa, en la que quimiolitautotrofos respiran un donador de electrones inorgánico, como  $\text{H}_2$ , sulfuro reducido, especies de hierro o manganeso, mientras que usan nitrato, nitrito, óxido nítrico y nitroso como aceptor de electrones [75, 88].

Posteriormente se procedió a aplicar  $-0.7\text{ V}$  (vs. EEH) por 45 h (Figura 4.14), debido a que este potencial generó mayor densidad de corriente ( $0.011\text{ A/m}^2$ ) en el barrido de la Figura 4.13A. Aunque como se mencionó anteriormente, se hubiera deseado un potencial cercano  $-0.414\text{ V}$  [5], pero las densidades de corriente obtenidas en la Figura 4.13A a ese potencial fueron bajas ( $-0.002\text{ A/m}^2$  a  $-0.4\text{ V}$ ).

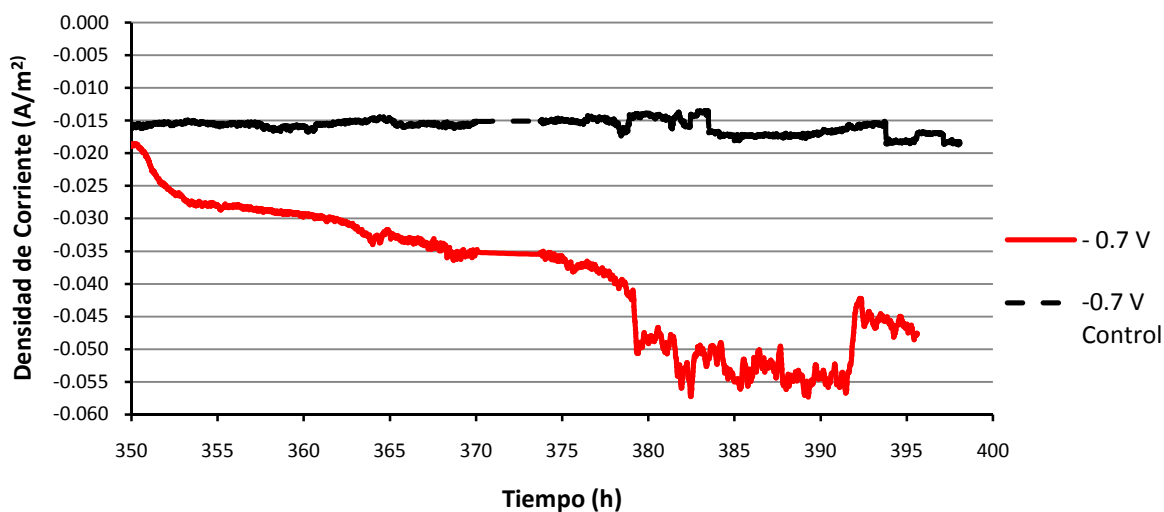


Figura 4.14. Corriente generada con un potencial aplicado de  $-0.7\text{ V}$ .

En la Figura 4.14 se puede observar que la densidad de corriente disminuyó a lo largo del tiempo, generando corrientes catódicas de  $-0.02\text{ A/m}^2$  hasta  $-0.50\text{ A/m}^2$  al final del experimento. Este comportamiento corresponde a lo mencionado por Rozendal *et al.* (2008) [5], aunque con valores de densidades de corriente menores. Varios factores pudieron influenciar en la baja generación de corrientes catódicas en la formación del biocátodo con respecto a Rozendal *et al.* (2008) [5]. Uno de ellos fue que no hubo alimentación continua de nutrientes y tampoco flujo continuo de  $\text{H}_2$ . Rozendal *et al.* (2008) [5] inició la formación del biocátodo alimentando la celda en modo por lotes durante 50 h, posteriormente inició la alimentación de la celda en modo continuo a  $1.3\text{ mL/min}$  hasta el final del experimento (600 h) y el suministro de  $\text{H}_2$  de igual manera se mantuvo continuo reciclándolo por medio de un bote lavador de gas cada  $250\text{ mL/min}$ . Esto maximizó la disponibilidad de nutrientes

y aporte de electrones para los microorganismos (oxidación de  $H_2$ ), obteniendo corrientes de hasta  $-1.2 A/m^2$  aplicando un potencial de  $-0.7 V$ . Por otra parte, Rozendal *et al.* (2008) [5] utilizó ferricianida como catolito químico en una de las cámaras mientras formaba el biocátodo para mantener una reducción de protones constante y finalmente oxidó ferrocianida como anolito químico cuando obtuvo su biocátodo para tener un aporte artificial de electrones de igual manera constante y evitar usar un bioánodo que realice esta función.

Al término de las 400 h en el presente estudio, el cátodo de platino que estaba presente en la otra cámara de la celda, fue reemplazado por un bioánodo estable (CEM Reserva) y esta cámara fue alimentada con 12.14 mM de acetato de sodio. De esta manera la celda fue convertida a una CEM totalmente biológica, catalizada por un bioánodo y un biocátodo, a diferencia de Rozendal *et al.* (2008) [5] que solo trabajó en media celda oxidando un anolito químico (ferrocianida).

#### **4.2.3 CEM b catalizada por un biocátodo y generación de $H_2$**

Al obtener la CEM b catalizada por un biocátodo se llevó a cabo una curva de polarización en la celda completa de 0.1 a 1 V (Figura 4.15), con la finalidad de obtener los potenciales adecuados para generar  $H_2$  [46].

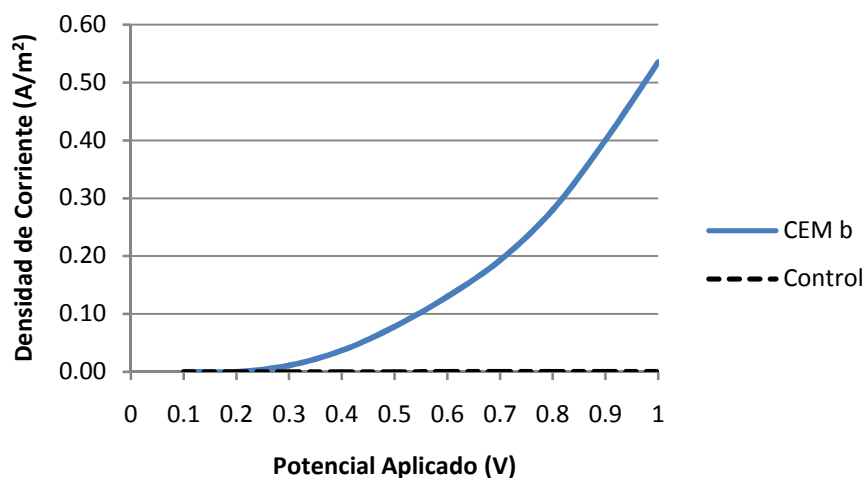


Figura 4.15. Curva de polarización de CEM b totalmente biológica.

En la Figura 4.15 se puede observar que las mejores densidades de corriente en CEM b se generaron entre 0.9 V y 1 V, por lo que se decidió hacer pruebas de generación de H<sub>2</sub> experimental y esperado (de acuerdo a la carga) aplicado un potencial de celda completa igual a estos dos valores.

Tabla 3. Resultados obtenidos en CEM b.

Celda	Densidad de Corriente (A/m <sup>2</sup> )	V <sub>t</sub> (mL/d)	V <sub>Et</sub> (mL/d)	r <sub>cat</sub> (%)	Q (m <sup>3</sup> /m <sup>3</sup> /d)
CEM b 0.9 V	0.032	0.07	10.1	0.7	0
CEM b 1 V	0.53	11.05	18.4	60	0.010
CEM Pt 0.9 V	2	27	52	52	0.032

En la Tabla 3 se puede observar que a un potencial 0.9 V durante 24 h se observó que la densidad de corriente de CEM b fue de 0.032 A/m<sup>2</sup>. Si se compara con CEM Pt este valor resulta ser 90% menor, ya que CEM Pt desarrolló 2 A/m<sup>2</sup> al final de la prueba de 24 h. Por otra parte, la densidad de corriente obtenida en CEM b a 1 V fue de 0.53 A/m<sup>2</sup>, mejorando con respecto a los 0.9 V aplicados (0.032 A/m<sup>2</sup>), pero se mantuvo por debajo de CEM Pt.

La CEM b a 1 V generó 11.05 mL de H<sub>2</sub>/día que corresponde aproximadamente al 50% generado en CEM Pt que obtuvo 27 mL de H<sub>2</sub>/día con una recuperación catódica de hidrógeno ( $r_{\text{Cat}}$ ) similar, contrario a lo que sucedió en CEM b a 0.9 V que solo generó 0.07 mL de H<sub>2</sub>/día, teniendo una recuperación catódica de hidrógeno menor al 1%.

En la Figura 4.16 se muestra un resumen del hidrógeno generado en este estudio en base a la tasa de producción (Q), comparado con los resultados obtenidos en biocátodos utilizados por Jeremiase *et al.*(2010) y Rozendal *et al.*(2008) [5, 46].

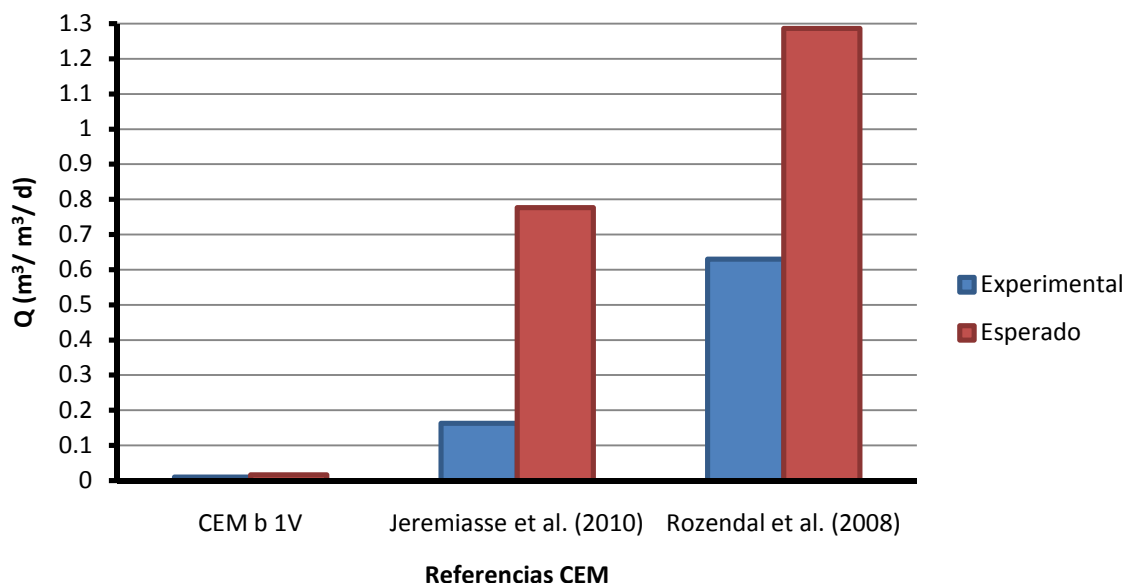


Figura 4.16. Comparativa de volúmenes de H<sub>2</sub> obtenidos entre Rozendal *et al.*(2008) [5], Jeremiase *et al.* (2010) [46] y en CEM b a 1 V.

En el 2010, Jeremiase *et al.* [46] generó 50 mL de H<sub>2</sub>/día (0.163 m<sup>3</sup>/m<sup>3</sup>/día) en una CEM catalizada con un biocátodo obtenido a partir del trabajo de Rozendal *et al.* (2008) [5]. Este valor representó una producción 94% mayor comparado con lo producido en la CEM b a 1 V (en base a Q, m<sup>3</sup>/ m<sup>3</sup>/ d). Sin embargo, hubo algunas diferencias en el modo de iniciar las celdas. En nuestro estudio se inició previamente una CEM (CEM Reserva) especialmente

para extraer su bioánodo y poderlo utilizar en la CEM b, mientras que Jeremiasse *et al.* (2010) [46] inoculó el ánodo esperando 600 horas para su estabilización y posteriormente inoculó el cátodo con la celda utilizada por Rozendal *et al.* (2008) [5]. Esta metodología atribuyó una mejor estabilidad de los microorganismos en su estudio, generando mayores densidades de corriente. Sin embargo, en nuestro estudio la decisión de tomar un bioánodo estable con microorganismos electroquímicamente activos de otra CEM hizo más rápido el inicio de la CEM b.



## CAPÍTULO 5: CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

### 5.1 Conclusiones

- CEM Pt generó un máximo de  $0.032 \text{ m}^3$  de  $\text{H}_2 / \text{m}^3$  del volumen del líquido del reactor / día a un potencial aplicado de  $0.9 \text{ V}$  y con un porcentaje de recuperación catódica de hidrógeno de 52% debido principalmente a fugas en la cámara catódica.
- La generación de  $\text{H}_2$  en CEM Pt se mostró baja con respecto a otros trabajos publicados debido al envenenamiento por  $\text{CO}_2$  y sulfuro de hidrógeno. Por otra parte, la técnica empleada para la deposición de la tinta catalítica no fue la adecuada para este estudio.
- CEM Pt generó  $\text{CH}_4$  al 30% en la cámara anódica debido a un TRH elevado (5.7 días) y a la actividad de microorganismos metanogénicos hidrogenotróficos. El  $\text{CH}_4$  presente en la cámara catódica tuvo una concentración menor al 1%.
- CEM b produjo  $0.010 \text{ m}^3$  de  $\text{H}_2 / \text{m}^3$  del volumen del líquido del reactor / día a  $1 \text{ V}$  aplicado con un porcentaje de recuperación catódica de 60%.
- CEM b generó corrientes catódicas a partir de  $-0.4 \text{ V}$  vs. EEH durante el barrido para la inversión de la polaridad del bioelectrodo, que se aproxima al potencial de generación de hidrógeno a pH 7 ( $-0.414 \text{ V}$  vs EEH). Sin embargo, las densidades de corriente fueron 50 veces menores a lo reportado en la literatura, por lo que el desempeño del biocátodo obtenido se reflejó en la baja generación de hidrógeno en CEM b al trabajar como una celda completa.

## 5.2 Perspectivas

El volumen generado de hidrógeno en CEM b no superó a CEM Pt, por lo que se recomienda evaluar durante la formación del biocátodo el desempeño del bioelectrodo a la oxidación del  $H_2$  durante periodos más largos y disminuir gradualmente el potencial a niveles más negativos que permitirían obtener una mejor reversibilidad de la enzima hidrogenasa y por lo tanto, mejores densidades de corriente. Con lo anterior se reduciría los sobrepotenciales al inicio de la CEM b catalizada con un biocátodo, mejorando la generación de  $H_2$  en la cámara catódica.

## BIBLIOGRAFÍA

1. C. Song. Overview of Hydrogen Production Options for Hydrogen Energy Development, Fuel-Cell Fuel Processing and Mitigation of CO<sub>2</sub> Emissions. in Proc. 20th International Pittsburgh Coal Conference. 2003.
2. K. Rabaey; G. Lissens; S. Siliciano and W. Verstraete, A microbial fuel cell capable of converting glucose to electricity at high rate and efficiency, *Biotechnol. Lett.* , 1531-1535, 2003
3. R. Rozendal; H. V. M. Hamelers; G. J. W. Euverink; S. J. Metz and C. J. N. Buisman, Principle and perspectives of hydrogen production through biocatalyzed electrolysis *International Journal of Hydrogen Energy* 1632-1640, 2006
4. E. Rasten; G. Hagen and T. R., Electrocatalysis in water electrolysis with solid polymer electrolyte, *Electrochim. Acta*, 3945-52, 2003
5. R. Rozendal; A. W. Jeremiasse; H. V. M. Hamelers and C. J. N. Buisman, Hydrogen production with a microbial biocathode, *Environ. Sci. Technol.*, 629-634, 2008
6. H. Liu; H. Hu; J. Chignell and Y. Fan, Microbial electrolysis: novel technology for hydrogen production from biomass, *Biofuels*, 129-142, 2010
7. S. V. Morozov; P. M. Vignais; V. L. Cournac; N. A. Zorin; E. E. Karyakina; A. A. Karyakin and S. Cosnier, Bioelectrocatalytic hydrogen production by hydrogenase electrodes, *Int. J. Hydrogen Energy*, 1501–1505, 2002
8. H. R. Pershad; J. L. C. Duff; H. A. Heering; E. C. Duin; S. P. J. Albracht and F. A. Armstrong, Catalytic electron transport in *Chromatium vinosum* [NiFe] hydrogenase: Application of voltammetry in detecting redox-active centers and establishing that hydrogen oxidation is very fast even at potentials close to the reversible H<sup>+</sup>/H<sub>2</sub> value, *Biochemistry*, 8992–8999, 1999
9. E. Lojou and P. Bianco, Electrocatalytic reactions at hydrogenase modified electrodes and their applications to biosensors: From the isolated enzymes to the whole cells, *Electroanalysis*, 1093–1100, 2004
10. C. Li and H. H. Fang, Fermentative hydrogen production from wastewater and solid wastes by mixed cultures, *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 1, 1-39, 2007

11. D. Liu, *Bio-hydrogen Production by Dark Fermentation from Organic Wastes and Residues in Department of Environmental Engineering*. 2008, Technical University of Denmark: Lyngby. p. 60.
12. R. Rozendal, *Hydrogen production through biocatalyzed electrolysis (Ph. D Thesis)*. 2007, Wageningen University: Wageningen, the Netherlands.
13. B. E. Logan, *Microbial Fuel Cells*. 1 ed. 2008: Wiley-Interscience. 216.
14. U. Schröder, From Wastewater to Hydrogen: Biorefineries Based on Microbial Fuel-Cell Technology, *ChemSusChem*, 4, 281-282, 2008
15. J. Ditzig; H. Liu and B. E. Logan, Production of hydrogen from domestic wastewater using a bioelectrochemically assisted microbial reactor (BEAMR), *Int. J. Hydrogen Energy*, 13, 2296-2304, 2007
16. K.-J. Chae; M.-J. Choi; J. Lee; F. F. Ajayi and I. S. Kim, Biohydrogen production via biocatalyzed electrolysis in acetate-fed bioelectrochemical cells and microbial community analysis, *International Journal of Hydrogen Energy*, 19, 5184-5192, 2008
17. H. Liu; S. Grot and B. E. Logan, Electrochemically assisted microbial production of hydrogen from acetate, *Environ. Sci. Technol.*, 11, 4317-4320., 2005
18. J. F. Heidelberg; I. T. Paulsen; K. E. Nelson; E. J. Gaidos; W. C. Nelson; T. D. Read; J. A. Eisen; R. Seshadri; N. Ward; B. Methe; R. A. Clayton; T. Meyer; A. Tsapin; J. Scott; M. Beanan; L. Brinkac; S. Daugherty; R. T. DeBoy; R. J. Dodson; A. S. Durkin; D. H. Haft; J. F. Kolonay; R. Madupu; J. D. Peterson; L. A. Umayam; O. White; A. M. Wolf; J. Vamathevan; J. Weidman; M. Impraim; K. Lee; K. Berry; C. Lee; J. Mueller; H. Khouri; J. Gill; T. R. Utterback; L. A. McDonald; T. V. Feldblyum; H. O. Smith; J. C. Venter; K. H. Neelson and C. M. Fraser, Genome sequence of the dissimilatory metal ion-reducing bacterium *Shewanella oneidensis*, *Nat Biotech*, 11, 1118-1123, 2002
19. B. A. Methé; K. E. Nelson; J. A. Eisen; I. T. Paulsen; W. Nelson; J. F. Heidelberg; D. Wu; M. Wu; N. Ward; M. J. Beanan; R. J. Dodson; R. Madupu; L. M. Brinkac; S. C. Daugherty; R. T. DeBoy; A. S. Durkin; M. Gwinn; J. F. Kolonay; S. A. Sullivan; D. H. Haft; J. Selengut; T. M. Davidsen; N. Zafar; O. White; B. Tran; C. Romero; H. A. Forberger; J. Weidman; H. Khouri; T. V. Feldblyum; T. R. Utterback; S. E. Van Aken; D. R. Lovley and C. M. Fraser, Genome of *Geobacter sulfurreducens*: Metal Reduction in Subsurface Environments, *Science*, 5652, 1967-1969, 2003
20. D. R. Lovley, Extracellular electron transfer: wires, capacitors, iron lungs, and more, *Geobiology*, 3, 225-231, 2008

21. A. Falcón; J. Lozano and K. Juárez, Bioelectricidad, *Revista de la Sociedad Mexicana de Biotecnología y Bioingeniería*, 3, 62-78, 2009
22. K. P. Nevin and D. R. Lovley, Mechanisms for Fe(III) Oxide Reduction in Sedimentary Environments, *Geomicrobiology Journal*, 2, 141-159, 2002
23. H. H. Hau and J. A. Gralnick, Ecology and biotechnology of the genus *Shewanella*, *Annu Rev Microbiol.*, 237-258, 2007
24. E. Marsili; D. B. Baron; I. D. Shikhare; D. Coursolle; J. A. Gralnick and D. R. Bond, *Shewanella* secretes flavins that mediate extracellular electron transfer, *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 10, 3968-3973, 2008
25. C. H. Von; J. Ogawa; S. Shimizu and J. R. Lloyd, Secretion of flavins by *Shewanella* species and their role in extracellular electron transfer., *Appl Environ Microbiol.*, 3, 615-623, 2008
26. Y. A. Gorby; S. Yanina; J. S. McLean; K. M. Rosso; D. Moyles; A. Dohnalkova; T. J. Beveridge; I. S. Chang; B. H. Kim; K. S. Kim; D. E. Culley; S. B. Reed; M. F. Romine; D. A. Saffarini; E. A. Hill; L. Shi; D. A. Elias; D. W. Kennedy; G. Pinchuk; K. Watanabe; S. Ishii; B. E. Logan; K. H. Nealson and J. K. Fredrickson, Electrically conductive bacterial nanowires produced by *Shewanella oneidensis* strain MR-1 and other microorganisms, *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 30, 11358-11363, 2006
27. G. Reguera; K. D. McCarthy; T. Mehta; J. S. Nicoll; M. T. Tuominen and D. R. Lovley, Extracellular electron transfer via microbial nanowires, *Nature*, 7045, 1098-1101, 2005
28. B. E. Rittmann; R. Krajmalnik-Brown and R. U. Halden, Pre-genomic, genomic and post-genomic study of microbial communities involved in bioenergy, *Nat Rev Micro*, 8, 604-612, 2008
29. C. Torres; A. Kato Marcus and B. Rittmann, Kinetics of consumption of fermentation products by anode-respiring bacteria, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 3, 689-697, 2007
30. S. Freguia; K. Rabaey; Z. Yuan and J. r. Keller, Syntrophic Processes Drive the Conversion of Glucose in Microbial Fuel Cell Anodes, *Environmental Science & Technology*, 21, 7937-7943, 2008
31. D. F. Call and B. E. Logan, Hydrogen production in a single chamber Microbial Electrolysis Cell lacking a membrane, *Environ. Sci. Technol*, 9, 3401-3406, 2008

32. H. Liu and B. E. Logan, Electricity generation using an air-cathode single chamber microbial fuel cell in the presence and absence of a proton exchange membrane, *Environ. Sci. Technol.*, 14, 4040-4046, 2004
33. E. Lalaurette; S. Thammannagowda; A. Mohagheghi; P.-C. Maness and B. E. Logan, Hydrogen production from cellulose in a two-stage process combining fermentation and electrohydrogenesis, *International Journal of Hydrogen Energy*, 15, 6201-6210, 2009
34. L. Lu; D. Xing; T. Xie; N. Ren and B. E. Logan, Hydrogen production from proteins via electrohydrogenesis in microbial electrolysis cells, *Biosensors and Bioelectronics*, 12, 2690-2695, 2010
35. P. A. Selembo; J. M. Perez; W. A. Lloyd and B. E. Logan, High hydrogen production from glycerol or glucose by electrohydrogenesis using microbial electrolysis cells, *International Journal of Hydrogen Energy*, 13, 5373-5381, 2009
36. L. Lu; N. Ren; D. Xing and B. E. Logan, Hydrogen production with effluent from an ethanol-H<sub>2</sub>-coproducing fermentation reactor using a single-chamber microbial electrolysis cell, *Biosensors and Bioelectronics*, 10, 3055-3060, 2009
37. J. J. Baschuk and X. Li, Carbon monoxide poisoning of proton exchange membrane fuel cells, *International Journal of Energy Research*, 8, 695-713, 2001
38. B. E. Logan; D. Call; S. Cheng; H. V. M. Hamelers; T. H. J. A. Sleutels; A. W. Jeremiase and R. A. Rozendal, Microbial Electrolysis Cells for High Yield Hydrogen Gas Production from Organic Matter, *Environmental Science & Technology*, 23, 8630-8640, 2008
39. H. Rismani-Yazdi; S. M. Carver; A. D. Christy and O. H. Tuovinen, Cathodic limitations in microbial fuel cells: An overview, *Journal of Power Sources*, 2, 683-694, 2008
40. S. Freguia; K. Rabaey; Z. Yuan and J. Keller, Non-catalyzed cathodic oxygen reduction at graphite granules in microbial fuel cells, *Electrochimica Acta*, 2, 598-603, 2007
41. D. F. Call; M. D. Merrill and B. E. Logan, High Surface Area Stainless Steel Brushes as Cathodes in Microbial Electrolysis Cells, *Environ. Sci. Technol.*, 6, 2179-2183, 2009
42. P. A. Selembo; M. D. Merrill and B. E. Logan, The use of stainless steel and nickel alloys as low-cost cathodes in microbial electrolysis cells, *Journal of Power Sources*, 2, 271-278, 2009

43. F. Aulenta; P. Reale; A. Canosa; S. Rossetti; S. Panero and M. Majone, Characterization of an electro-active biocathode capable of dechlorinating trichloroethene and cis-dichloroethene to ethene, *Biosensors and Bioelectronics*, 7, 1796-1802, 2010
44. G.-W. Chen; S.-J. Choi; J.-H. Cha; T.-H. Lee and C.-W. Kim, Microbial community dynamics and electron transfer of a biocathode in microbial fuel cells, *Korean Journal of Chemical Engineering*, 5, 1513-1520, 2010
45. L. Huang; X. Chai; G. Chen and B. E. Logan, Effect of Set Potential on Hexavalent Chromium Reduction and Electricity Generation from Biocathode Microbial Fuel Cells, *Environmental Science & Technology*, 11, 5025-5031, 2011
46. A. W. Jeremiasse; H. V. M. Hamelers and C. J. N. Buisman, Microbial electrolysis cell with a microbial biocathode, *Bioelectrochemistry*, 1, 39-43, 2010
47. S. Oh; B. Min and B. E. Logan, Cathode performance as a factor in electricity generation in microbial fuel cells, *Environ. Sci. Technol.*, 8, 4900-4904, 2004
48. P. M. Vignais and A. Colbeau, Molecular biology of microbial hydrogenases, *Curr. Issues Mol. Biol.*, 2, 159-188, 2004
49. P. M. Vignais; J.-P. Magnin and J. C. Willison, Increasing biohydrogen production by metabolic engineering, *International Journal of Hydrogen Energy*, 11, 1478-1483, 2006
50. H. Tatsumi; K. Takagi; M. Fujita; K. Kano and T. Ikeda, Electrochemical study of reversible hydrogenase reaction of *Desulfovibrio vulgaris* cells with methyl viologen as an electron carrier, *Anal. Chem.*, 9, 1753-1759, 1999
51. F. Aulenta; A. Canosa; M. Majone; S. Panero; P. Reale and S. Rossetti, Trichloroethene dechlorination and H<sub>2</sub> evolution are alternative biological pathways of electric charge utilization by a dechlorinating culture in a bioelectrochemical system, *Environ. Sci. Technol.*, 16, 6185-6190, 2008
52. R. Rozendal; H. V. M. Hamelers; R. J. Molenkamp and C. J. N. Buisman, Performance of single chamber biocatalyzed electrolysis with different types of ion exchange membranes, *Water Res.*, 1984-1994, 2007
53. R. Rozendal; T. H. J. A. Sleutels; H. V. M. Hamelers and C. J. N. Buisman, Effect of the type of ion exchange membrane on performance, ion transport, and pH in biocatalyzed electrolysis of wastewater, *Water Science & Technology* 11, 1757-1762, 2008

54. B. Tartakovsky; M. F. Manuel; H. Wang and S. R. Guiot, High rate membrane-less microbial electrolysis cell for continuous hydrogen production, *International Journal of Hydrogen Energy*, 2, 672-677, 2009
55. H. Hu; Y. Fan and H. Liu, Hydrogen production using single-chamber membrane-free microbial electrolysis cells, *Water Research*, 15, 4172-4178, 2008
56. M. Sun; G.-P. Sheng; L. Zhang; C.-R. Xia; Z.-X. Mu; X.-W. Liu; H.-L. Wang; H.-Q. Yu; R. Qi; T. Yu and M. Yang, An MEC-MFC-Coupled System for Biohydrogen Production from Acetate, *Environmental Science & Technology*, 21, 8095-8100, 2008
57. R. C. Wagner; J. M. Regan; S.-E. Oh; Y. Zuo and B. E. Logan, Hydrogen and methane production from swine wastewater using microbial electrolysis cells, *Water Research*, 5, 1480-1488, 2009
58. S. Cheng and B. E. Logan, Sustainable and efficient biohydrogen production via electrohydrogenesis, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 47, 18871-18873, 2007
59. K. Guo; X. Tang; Z. Du and H. Li, Hydrogen production from acetate in a cathode-on-top single-chamber microbial electrolysis cell with a mipor cathode, *Biochemical Engineering Journal*, 1-2, 48-52, 2010
60. L. Alzate; K. González; I. Peraza; O. García; J. Domínguez; J. Vázquez; M. Tzec and B. Canto, Evaluación del desempeño e identificación de exoelectrónenos en dos tipos de celdas de combustible microbianas con diferente configuración en el ánodo, *Interciencia*, 1, 19-25, 2010
61. A. M. Jirka and M. J. Carter, *Analytical Chemistry*. 1975. p. 139.
62. USEPA, Federal Register, 78, 26811-26812., 1980
63. A. Wang; W. Liu; N. Ren; J. Zhou and S. Cheng, Key factors affecting microbial anode potential in a microbial electrolysis cell for H<sub>2</sub> production, *International Journal of Hydrogen Energy*, 24, 13481-13487, 2010
64. P. Parameswaran; C. I. Torres; H.-S. Lee; B. E. Rittmann and R. Krajmalnik-Brown, Hydrogen consumption in microbial electrochemical systems (MXCs): The role of homo-acetogenic bacteria, *Bioresource Technology*, 1, 263-271, 2011
65. B. E. Logan; B. Hamelers; R. Rozendal; U. Schröder; J. Keller; S. Freguia; P. Aelterman; W. Verstraete and K. Rabaey, Microbial Fuel Cells: Methodology and Technology, *Environmental Science & Technology*, 17, 5181-5192, 2006



66. K. Rabaey and W. Verstraete, Microbial fuel cells: novel biotechnology for energy generation, *Trends in Biotechnology*, 6, 291-298, 2005
67. H. Liu; R. Ramnarayanan and B. E. Logan, Production of Electricity during Wastewater Treatment Using a Single Chamber Microbial Fuel Cell, *Environmental Science & Technology*, 7, 2281-2285, 2004
68. R. A. Rozendal; H. V. M. Hamelers; K. Rabaey; J. Keller and C. J. N. Buisman, Towards practical implementation of bioelectrochemical wastewater treatment, *Trends in Biotechnology*, 8, 450-459, 2008
69. R. A. Rozendal; H. V. M. Hamelers and C. J. N. Buisman, Effects of Membrane Cation Transport on pH and Microbial Fuel Cell Performance†, *Environmental Science & Technology*, 17, 5206-5211, 2006
70. S. M. Strycharz; A. P. Malanoski; R. M. Snider; H. Yi; D. R. Lovley and L. M. Tender, Application of cyclic voltammetry to investigate enhanced catalytic current generation by biofilm-modified anodes of *Geobacter sulfurreducens* strain DL1 vs. variant strain KN400, *Energy & Environmental Science*, 3, 896-913, 2011
71. M. T. Madigan; J. M. Martinko; D. A. Stahl and D. P. Clark, *Brock Biology of Microorganism*. 13 ed. 2010: Benjamin Cummings. 1152.
72. K. Rabaey; N. Boon; S. D. Siciliano; M. Verhaege and W. Verstraete, Biofuel Cells Select for Microbial Consortia That Self-Mediate Electron Transfer, *Appl. Environ. Microbiol.*, 9, 5373-5382, 2004
73. K. Rabaey; L. Angenent; U. Schroder and J. Keller, *Bioelectrochemical systems: From extracellular electron transfer to biotechnological application*. 2010: IWA Publishing.
74. D. R. Lovley; J. D. Coates; E. L. Blunt-Harris; E. J. P. Phillips and J. C. Woodward, Humic substances as electron acceptors for microbial respiration, *Nature*, 6590, 445-448, 1996
75. P. Clauwaert, *Electrodes as electron donors for microbial reduction processes (Ph. D Thesis)*, in *Department of Biochemical and microbial technology*. 2009, Ghent University: Ghent, Belgium. p. 256.
76. H. Liu; S. Cheng and B. E. Logan, Production of Electricity from Acetate or Butyrate Using a Single-Chamber Microbial Fuel Cell, *Environmental Science & Technology*, 2, 658-662, 2004

77. P. Aelterman; S. Freguia; J. Keller; W. Verstraete and K. Rabaey, The anode potential regulates bacterial activity in microbial fuel cells, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 3, 409-418, 2008
78. Y. Fan; E. Sharbrough and H. Liu, Quantification of the Internal Resistance Distribution of Microbial Fuel Cells, *Environmental Science & Technology*, 21, 8101-8107, 2008
79. H.-S. Lee; C. s. I. Torres; P. Parameswaran and B. E. Rittmann, Fate of H<sub>2</sub> in an Upflow Single-Chamber Microbial Electrolysis Cell Using a Metal-Catalyst-Free Cathode, *Environmental Science & Technology*, 20, 7971-7976, 2009
80. A. Wang; W. Liu; S. Cheng; D. Xing; J. Zhou and B. E. Logan, Source of methane and methods to control its formation in single chamber microbial electrolysis cells, *International Journal of Hydrogen Energy*, 9, 3653-3658, 2009
81. P. Parameswaran; C. I. Torres; H.-S. Lee; R. Krajmalnik-Brown and B. E. Rittmann, Syntrophic interactions among anode respiring bacteria (ARB) and Non-ARB in a biofilm anode: electron balances, *Biotechnology and Bioengineering*, 3, 513-523, 2009
82. H.-S. Lee and B. E. Rittmann, Significance of Biological Hydrogen Oxidation in a Continuous Single-Chamber Microbial Electrolysis Cell, *Environmental Science & Technology*, 3, 948-954, 2009
83. P. Parameswaran; H. Zhang; C. I. Torres; B. E. Rittmann and R. Krajmalnik-Brown, Microbial community structure in a biofilm anode fed with a fermentable substrate: The significance of hydrogen scavengers, *Biotechnology and Bioengineering*, 1, 69-78, 2010
84. A. Herrera and H. L. Yeager, Halide and Sulfate Ion Diffusion in Nafion Membranes, *Journal of The Electrochemical Society*, 10, 2446-2451, 1987
85. B. Logan; S. Cheng; V. Watson and G. Estadt, Graphite Fiber Brush Anodes for Increased Power Production in Air-Cathode Microbial Fuel Cells, *Environmental Science & Technology*, 9, 3341-3346, 2007
86. D. Xing; Y. Zuo; S. Cheng; J. M. Regan and B. E. Logan, Electricity Generation by *Rhodospseudomonas palustris* DX-1, *Environmental Science & Technology*, 11, 4146-4151, 2008
87. B. E. Logan, Extracting hydrogen and electricity from renewable resources, *Environmental Science & Technology*, 9, 2004

88. J. Van Rijn; Y. Tal and H. J. Schreier, Denitrification in recirculating systems: Theory and applications, *Aquacultural Engineering*, 3, 364-376, 2006