

SEP

SES

TecNM

INSTITUTO TECNOLÓGICO DE TOLUCA

**CONSTRUCCIÓN Y OPERACIÓN DE UN SISTEMA
BIOELECTROQUÍMICO PARA LA DISMINUCIÓN DE DQO**

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRA EN CIENCIAS EN INGENIERÍA AMBIENTAL**

PRESENTA:

ING. JAQUELINE DORAZCO DELGADO

No. DE CONTROL: 1728M1181

DIRECTORA DE TESIS:

DRA. MARÍA DEL CARMEN CARREÑO DE LEÓN (ITT)

CO-DIRECTORA DE TESIS:

DRA. SUILMA MARISELA FERNÁNDEZ VALVERDE (ININ)

METEPEC, EDO. DE MÉXICO, ENERO DE 2020

OFICIO 1



TECNOLÓGICO NACIONAL DE MÉXICO

Instituto Tecnológico de Toluca

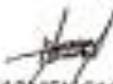
"2019, Año del Cuadrillo del Sur, Emiliano Zapata"

México, Edo. de México, 16 de diciembre/2019
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO
E INVESTIGACIÓN
DEPT-395-1142/2019

DR. JOSÉ LUIS GARCÍA RIVAS
JEFE DE LA DIVISIÓN DE ESTUDIOS
DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN
PRESENTE

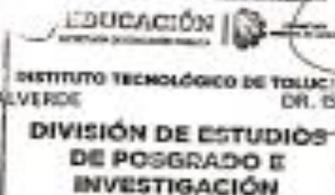
Por este medio comunicamos a usted que la comisión Revisora designada para analizar la tesis denominada "CONSTRUCCIÓN Y OPERACIÓN DE UN SISTEMA BIOELECTROQUÍMICO PARA LA DISMINUCIÓN DE DQD", que como parte de los requisitos para obtener el grado académico de Maestría en Ciencias en Ingeniería Ambiental presenta la C. JAQUELINE DORAZCO DELGADO con número de control 1728M1181 para sustentar el acto de Recepción Profesional, ha dictaminado que dicho trabajo reúne las características de contenido y calidad para proceder a la impresión del mismo.

ATENTAMENTE
Estudiante integrando proceso


DRA. MARIA DEL CARMEN CARREÑO DE LEÓN
DIRECTORA DE TESIS


DRA. GUILMA MARISELA FERNÁNDEZ VALVERDE
CO-DIRECTORA DE TESIS


DR. FRANCISCO JAVIER ILLESCAS MARTÍNEZ
REVISOR DE TESIS




DR. ISAIAS DE LA ROSA GÓMEZ
REVISOR DE TESIS

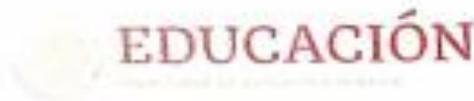

DR. JORGE HUMBERTO SERMENT
GUERRERO
REVISOR DE TESIS



Av. Tecnológico S/N, Cal. Agrícola Emiliano Zapata, C.P. 52149
México, Estado de México. Tels. Dirección (01722) 208 7201, Teléf. Académica 208 7202,
Teléf. de Atención al Cliente 208 7200, Teléf. Administrativa 208 7280, Correo: 208 72 00
e-mail: info@toluca.tecn.mx, www.toluca.tecn.mx



OFICIO 2



TECNOLOGICO NACIONAL DE MEXICO

Instituto Tecnológico de Toluca

"2009, Año del Caudillo del Sur, Emiliano Zapata"

Mexico, Edo. de México, **10 de diciembre 2019**

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO
E INVESTIGACIÓN
DEPI-395-1172/2019

C. JAQUELINE DORAZCO BELGADO
CANDIDATO AL GRADO DE MAESTRO
EN CIENCIAS EN INGENIERÍA AMBIENTAL
PRESENTE

De acuerdo con el Reglamento de Titulación del Sistema Nacional de Educación Superior Tecnológica dependiente de la Subsecretaría de Educación Superior de la Secretaría de Educación Pública y habiendo cumplido con todas las indicaciones que la Comisión Revisora realizó con respecto a su trabajo de Tesis titulado "CONSTRUCCIÓN Y OPERACIÓN DE UN SISTEMA BIOELECTROQUÍMICO PARA LA DISMINUCIÓN DE DQO", la División de Estudios de Posgrado e Investigación concede autorización para que proceda a la impresión del mismo

Sin más por el momento, quedo de usted.

ATENTAMENTE

" Educación, integridad y ciencia "


DR. JOSÉ LUIS GARCÍA RIVAS
JEFE DE LA DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO
E INVESTIGACIÓN



AJR/vmb



Av. Tecnológico S/N, Col. Agrícola Oriente, C.P. 52940
Mexico, Estado de México. Tels. Dirección 047221 208 7205, Téf. Académica 208 7201,
Subd. de Planeación 208 7204, Subd. Administrativa 208 7205, Correo: 208 72 00
e-mail: info@toluca.tecnm.mx, www.toluca.tecnm.mx



Registro de Instituciones de Educación Superior
Número de Institución: 2011-1-001-10
Fecha de inscripción: 05/11/2011

AGRADECIMIENTOS

Agradezco por la colaboración en este trabajo:

A Dios por permitirme terminar un logro más en la vida, a mis padres por todo su apoyo, especialmente por haber hecho de mí una persona responsable, trabajadora y constante, por sus consejos, motivación y la enseñanza que me han dejado a través de su ejemplo.

A mi esposo por sus consejos, tolerancia y apoyo en cada decisión y proyecto. A mi hijo porque fue un motor para no darme por vencida y seguir adelante. No ha sido sencillo el camino hasta ahora, pero gracias a su aporte, amor y comprensión este camino se ha hecho más ameno.

Al Instituto Tecnológico de Toluca (ITT) por abrirme las puertas para estudiar la maestría, al Laboratorio de Investigación en Ingeniería Ambiental (LIIA) y a los Departamentos de Radiobiología, Química y Materiales del ININ por brindar sus instalaciones para el desarrollo del presente trabajo y en especial al Depto. De sistemas por el apoyo para hacer funcionar el potencióstato.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada que permitió la culminación de este proyecto, al Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares (ININ) por haber facilitado los recursos para la realización de los estudios de posgrado, en particular al Dr. Jorge Humberto Serment, Dra. Suilma Marisela Fernández Valverde, a la Ing. Albina Gutiérrez Martínez y al personal de Sistemas por su absoluto apoyo.

A la directora del proyecto Dra. María del Carmen Carreño, sinodales y especialistas que permitieron incorporarme a su grupo de trabajo, así mismo por sus comentarios, sugerencias y observaciones oportunas para el mejoramiento de este proyecto.

RESUMEN

La contaminación de las aguas residuales ha incrementado la cantidad de desechos y compuestos que no son fácilmente degradables en el ambiente. En el presente trabajo se implementó un proceso para la eliminación de materia orgánica. Se caracterizaron aguas residuales municipales de la Planta SEDAGRO I de Metepec, Estado de México y se consideraron dos tipos de Sistemas Bioelectroquímicos; celdas de combustible microbiana (CCM), para la generación de electricidad y las celdas de electrólisis microbiana (CEM) para la producción de biohidrógeno, se probaron dos microorganismos electrogénicos: *Clostridium bifermentans* y *Clostridium sordelliis*, aislados de los sedimentos obtenidos de la PTAR del CIRA y del Río Lerma. Ambas bacterias fueron implementadas para la CCM y la *Clostridium bifermentans* para CEM. Se emplearon celdas compuestas de dos cubos de acrílico, y se utilizó tela de grafito como electrodo, acoplados con alambre de acero inoxidable y una membrana Ultrex CMI-7000. Se monitorearon 5 diferentes CCM, por duplicado durante 13 días, con un volumen de trabajo de 80 mL, se burbujearon con N₂ y se conectaron al potenciostato.

Se obtuvieron voltajes tanto en el agua residual esterilizada con y sin amortiguador inoculadas con las bacterias mencionadas, se observó que el amortiguador no beneficio el sistema, pues disminuye la generación de voltaje con ambas bacterias. La remoción de DQO en las aguas residuales esterilizadas con amortiguador e inoculada con la bacteria *C. sordelliis* alcanzó un 68.2%. Los experimentos se realizaron utilizando 4 CEM y cada uno por duplicado, se burbujearon con N₂, se inocularon con la bacteria *C. bifermentans*, se conectaron a una pila de 0.75 V y se incubaron a 30°C durante 15 días en los que se logró la obtención de H₂ (50 y 156 mmoles totales) en todos los medios, principalmente en agua residual esterilizada con amortiguador e inoculada con la bacteria *Clostridium bifermentans* (AREAB) se consiguió obtener 3.5 mL de H₂ y una remoción de DQO de un 27.9%.

ABSTRACT

Sewage pollution has increased the amount of waste and compounds that are not easily degradable for the environment. In the present work was implemented a process for organic matter removal. Municipal wastewater from SEDAGRO I Plant in Metepec, State of Mexico was characterized and two types of Bioelectrochemical Systems were considered; microbial fuel cells (MFC) for the generation of electricity and microbial electrolysis cells (MEC) for the production of biohydrogen, two electrogenic microorganisms were tested: *clostridium bifermentans* and *clostridium sordelliis*, isolated from sediments obtained from the CIRA WWTP and Lerma River. Both bacteria were implemented for MFC and the *Clostridium bifermentans* for MEC. Cells composed of two acrylic cubes were used, graphite fabric was used as electrode coupled with stainless steel wire and an Ultrex CMI-7000 membrane. Five different MFC were monitored, in duplicate for 13 days, with a volume of 80 mL, bubbled with N₂ and connected to the potentiostat .

Voltages were obtained using sterilized wastewater with and without a buffer inoculated with the mentioned bacteria, it was observed that the buffer does not benefit the system, since the generation of voltage with both bacteria decreases. The COD removal in wastewater sterilized with buffer and inoculated with *C. sordelliis* bacteria reached 68.2%. The experiments were performed using 4 MEC and each in duplicate, bubbled with N₂, inoculated with the *C. bifermentans* bacteria, connected to a 0.75 V battery and incubated at 30 ° C for 15 days in which it was achieved obtaining H₂ (50 and 156 total μmoles) in all media, mainly in waste water sterilized with buffer and inoculated with the *Clostridium bifermentans* bacteria (AREAB), obtained 3.5 mL of H₂ and a COD removal of 27.9%.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	1
1.FUNDAMENTOS.....	3
1.1 Antecedentes	3
1.2 La contaminación del agua	5
1.2.1 Fuentes de contaminación del agua.....	5
1.2.2 Parámetros generales indicadores de contaminación	7
1.3 Sistemas Bioelectroquímicos	11
1.3.1 Celda de Combustible Microbiana (CCM)	11
1.3.2 Celda de Electrólisis Microbiana (CEM)	15
1.4 Estructura de la celda de combustible microbiana y celda de electrólisis microbiana	17
1.4.1 Materiales del ánodo	17
1.4.2 Materiales del cátodo y catalizadores.....	18
1.4.3 Microorganismos utilizados en los Sistemas Bioelectroquímicos.....	19
1.5 Métodos para la obtención de biohidrógeno	25
1.5.1 Biofotólisis	25
1.5.2 Fotofermentación	26
1.5.3 Fermentación oscura.....	26
1.5.4 Electrólisis Microbiana.....	28
2. METODOLOGÍA.....	31
2.1 Obtención y caracterización de las aguas residuales	31
2.2 Preservación de las Bacterias en medio de Tlioglicolato con resazurina....	33
2.3 Cinética de la fase exponencial de la curva de crecimiento microbiano	33
2.4 Ensamblado y operación de las Celdas de Combustible Microbianas (CCM)	35

2.5 Ensamblado de las Celdas de Electrólisis Microbiana (CEM)	39
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	42
3.1 Caracterización de las aguas residuales municipales.....	42
3.2 Preservación y crecimiento de las bacterias	46
3.3 Crecimiento de las bacterias <i>C. sordellii</i> y <i>C. bifermentans</i> en el agua residual	46
3.4 Celdas de Combustible Microbiana.....	50
3.4.1 Monitoreo de voltaje en la CCM.....	51
3.5 Densidad de potencia y eficiencia coulombica en la CCM.....	56
3.6 Disminución de DQO en la CCM.....	57
3.7 Celda de Electólisis Microbiana	58
3.7.1 Monitoreo de biohidrógeno en la CEM	59
3.7.2 Disminución de DQO en la CEM.....	61
CONCLUSIONES.....	63
REFERENCIAS.....	64
ANEXOS	79
Anexo 1: Técnica de Hungate.....	79
Anexo 2: Composición del amortiguador de fosfato)	80
Anexo 3: Medio Ravot.....	80
Anexo 4: Solución de minerales traza.....	81
Anexo 5: Crecimiento de las bacterias <i>C. Bifermentans</i> y <i>C. Sordelliis</i> en los diferentes medios	81

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1	Representación esquemática de una CCM (Oh et al.,2004) ...	13
Figura 1.2	Esquema de una CEM (Wrana et al.,2010)	16
Figura 1.3	Morfología de la bacteria <i>Clostridium sordellii</i>	21
Figura 1.4	Morfología de la bacteria <i>Clostridium bifermentans</i>	22
Figura 1.5	Diagrama esquemático que describe el mecanismo de electrones (Kadier et al., 2015)	24
Figura 2.1	Metodología para la construcción y operación de un sistema bioelectroquímico	31
Figura 2.2	Curva de crecimiento entre el logaritmo del número de células y el tiempo Materiales del ánodo Morfología de la bacteria <i>Clostridium sordellii</i>	34
Figura 2.3	CCM de una cámara	37
Figura 2.4	CEM de una cámara	40
Figura 2.5	Cromatógrafo de gases Gow Mac 580	41
Figura 3.1	Medio de tioglicolato con resarzurina y a la derecha el medio anóxico para la preservación de las bacterias Fotofermentación	46
Figura 3.2	Viales para el crecimiento de las bacterias <i>C. sordellii</i> y <i>C. bifermentans</i> en los diferentes medios	47
Figura 3.3	Crecimiento de las bacterias <i>C. bifermentans</i> y <i>C. sordelliis</i> en el medio de Tioglicolato	47
Figura 3.4	Número de bacterias en función del tiempo de los diferentes medios utilizados	48
Figura 3.5	Ejemplos del análisis del crecimiento exponencial medio Ravot inoculada con <i>C. bifermentans</i> y agua residual esterilizada con amortiguador inoculada con <i>C. sordelliis</i> en el medio de Tioglicolato	49
Figura 3.6	CCM conectadas al potencióstato Keithly 2000 y registro de los voltajes con el software LabVIEW	51

Figura 3.7	Gráfica de la respuesta electroquímica del medio Ravot sin inóculo	51
Figura 3.8	Gráficas de voltaje generado en el medio Ravot (MR) inoculadas con las bacterias: a) <i>C. bifermentans</i> (MRB) y b) <i>C. sordelliis</i> (MRS)	52
Figura 3.9	Gráficas de la respuesta electroquímica del agua residual esterilizada en CCM inoculadas con: a) <i>C. bifermentans</i> (AREB) y b) <i>C. sordelliis</i> (ARES)	53
Figura 3.10	Gráficas de los voltajes medidos en el agua residual esterilizada con amortiguador inoculadas con las bacterias: a) <i>C. bifermentans</i> y b) <i>C. sordelliis</i>	54
Figura 3.11	Resultados de la respuesta electroquímica de las celdas en agua residual: a) sin esterilizar y b) agua residual sin esterilizar con medio Ravot	54
Figura 3.12	Resultados del potencióstato de las celdas inoculadas con las bacterias: a) <i>C. bifermentans</i> y b) <i>C. sordelliis</i>	55
Figura 3.13	Celda de Electrólisis Microbiana	59
Figura 3.14	Cromatogramas de la parte superior de la celda en los diferentes medios: a) MRB, b) AREB, c) AREAB, d) ARSE	60

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.2	Principales variables a considerar en la Celda de Combustible Microbiana.....	14
Tabla 1.2	Mecanismos de producción de H ₂ incluyendo microorganismos, enzimas. Ventajas y desventajas	28
Tabla 1.3	Sustratos, materiales utilizados en el ánodo y cátodo, potencial aplicado y eficiencias obtenidas en la CEM	29
Tabla 1.4	Ventajas y desventajas de fermentación oscura para la producción de biohidrógeno	30
Tabla 1.5	Ventajas y desventajas de la CEM para la producción de biohidrógeno	30

Tabla 2.1	Normas utilizadas para la caracterización de los diferentes parámetros del agua	32
Tabla 3.3	Caracterización de sólidos en agua residual municipal	43
Tabla 3.2	Caracterización de las aguas residuales y comparación con los límites establecidos: NOM 001- SEMARNAT-1996	45
Tabla 3.3	pH e intervalo establecido en la NOM 001- SEMARNAT-1996 y medida de conductividad	45
Tabla 3.4	Tiempo duplicación de las bacterias en tioglicolato y en los diferentes medios	50
Tabla 3.5	Resultados de la CCM	56
Tabla 3.6	DQO final de las Celdas de Combustible Microbiana	57
Tabla 3.7	Resultados de biohidrógeno en los diferentes medios en las CEM	61
Tabla 3.8	DQO final de las celdas de electrólisis microbiana	61

INTRODUCCIÓN

La sociedad genera residuos tanto líquidos como sólidos. La porción que corresponde a los líquidos está constituida por aguas residuales, que tienen una composición variada, ya que provienen de las descargas de usos municipales, comerciales, servicios agrícolas, domésticos, incluyendo fraccionamiento y en general de cualquier uso, así como la mezcla entre ellas (NOM- 001-SEMARNAT-1996). Es por ello que en la actualidad y durante los próximos años, las comunidades científicas se esfuerzan por utilizar estas aguas residuales e impulsar las energías renovables, encontrar nuevas fuentes de energías factibles y sustentables.

La depuración del agua se lleva a cabo mediante la combinación de diferentes procesos físicos, químicos y biológicos. En la última década, los Sistemas Bioelectroquímicos (SBE) han adquirido un papel muy importante debido a su gran potencial a la hora de tratar el agua residual los cuales se enfocan en la producción de electricidad, biogás, e hidrógeno a partir de la materia orgánica en efluentes y lixiviados (Corbella *et al.*, 2008).

Entre los SBE más destacados están las Celdas de Combustible Microbiana (CCM) y las Celdas de Electrólisis Microbiana (CEM), las primeras son una tecnología emergente que podrían contribuir a solucionar dos de los problemas más críticos que afronta la sociedad actual: la crisis energética y la disponibilidad de agua no contaminada. Este tipo de celda utiliza microorganismos para convertir la energía química en energía eléctrica, si bajo ciertas condiciones, dichos microorganismos transfieren los electrones producidos en su actividad metabólica a un electrodo. Este proceso contribuye a degradar la materia orgánica representada como sustrato o combustible (Pant *et al.*, 2010).

Por su parte en las CEM se produce hidrógeno en el cátodo y opera en forma totalmente anaerobia con las *bacterias Clostridium bifermentans* y *Clostridium sordellii*. No obstante, a diferencia de las celdas de combustible, las celdas de

electrólisis requieren un impulso de energía, que es costeable dado el valor agregado y las ventajas del hidrógeno como fuente de energía limpia.

El potencial de estos dispositivos es enorme (Rabaey *et al.*, 2004; Du *et al.*, 2007), lo que ha creado grandes expectativas en la comunidad científica ya que es posible producir energía limpia mediante el aprovechamiento de la materia orgánica que existe en las aguas residuales domésticas e industriales. Al utilizar la materia orgánica de las aguas residuales como combustible simultáneamente con la producción de bioenergéticos, se consigue una depuración de las aguas contaminadas (Huang *et al.*, 2011).

El principal objetivo en esta investigación fue operar un SBE de una cámara para disminuir la Demanda Química de Oxígeno (DQO) en aguas residuales municipales. Algunos de los objetivos particulares del presente trabajo fueron: caracterizar el agua residual doméstica proveniente de la Planta de tratamiento de aguas municipales de Metepec, Edo. de México, evaluar la DQO antes y después de los procesos del sistema bioelectroquímico (SBE); asimismo, evaluar la producción de electricidad en la CCM y la producción de biohidrógeno en una CEM utilizando agua residual municipal.

El presente trabajo se divide en tres capítulos principales. En el capítulo 1 se presentan los *fundamentos* en los que se basa la investigación, en él se abordó el problema de contaminación del agua, fundamentos teóricos de los SBE, así como los tipos de celda, materiales y los diferentes métodos de obtención de biohidrógeno. En el capítulo 2 se describe la *metodología*, en ella se mencionan las etapas experimentales, determinaciones analíticas utilizadas para la caracterización del agua residual y las condiciones de operación para los experimentos. En el capítulo 3 se analizan y discuten los *resultados* obtenidos, los cuales contemplan: la caracterización del agua residual, cinéticas de crecimiento, producción de voltaje y biohidrógeno en los diferentes SBE utilizados; además, la disminución de Demanda Química de Oxígeno (DQO) al final de los procesos.

1. FUNDAMENTOS

1.1 Antecedentes

La contaminación se ha incrementado con el paso de los años debido al crecimiento demográfico y al incremento en consumo de materia y energía, lo cual aumentan los desechos y compuestos que no son fácilmente degradables en el ambiente. La descarga de aguas residuales proviene de viviendas, edificios públicos y de la escorrentía que se colecta en el drenaje. Sus principales contaminantes son el nitrógeno, fósforo, compuestos orgánicos, bacterias coliformes fecales, entre otros. En México se descargan aproximadamente 229.73 m³/s de aguas residuales; el Estado de México y Cd. de México generan las mayores descargas de aguas municipales alcanzando respectivamente 24 y 21 m³/s, de los cuales no todos son tratados por la escasez de plantas tratadoras de agua.

Existe una necesidad urgente de investigación para mejorar el tratamiento de las aguas residuales, es por ello que, ante la problemática de la contaminación de agua por materia orgánica, la implementación de los Sistemas Bioelectroquímicos (SBE) resulta una alternativa muy atractiva para disminuir la carga orgánica en las aguas contaminadas y además obtener productos de valor agregado.

La investigación en SBE se ha incrementado en la última década debido a la tendencia mundial en la producción de energía sustentable; además, estos sistemas permiten degradar materia orgánica para la obtención de biohidrógeno o de energía. Se tiene conocimiento que los primeros experimentos de la celda microbiana de biocombustible fueron hace más de cien años; Michael Potter, en 1911 publicó un artículo denominado “Efectos eléctricos que acompañan a la descomposición de compuestos orgánicos”, informó y concluyó que el material orgánico produce cierta cantidad de electricidad que se genera al descomponerse la materia orgánica, también realizó otros experimentos con celdas galvánicas, hidrólisis y algunas enzimas. Potter logró generar electricidad a partir de la bacteria *Escherichia coli*

demostrando un flujo de corriente entre dos electrodos en un medio estéril. Más adelante Barnett Cohen., apoyándose en los conocimientos previos del tema, construyó las primeras celdas microbianas (haciendo referencia a la cámara anódica), que conectadas en serie fueron capaces de generar un voltaje de 35 V con una corriente muy pequeña de 2 mA (Aelterman *et al.*, 2006).

Alrededor de los años 1950 y 1960 algunos programas espaciales patrocinados por los Estados Unidos dieron cabida a una fase de desarrollo de las celdas microbianas de biocombustible, como un posible sistema de gestión de residuos orgánicos (Bullen *et al.*, 2006). El primer prototipo de la celda microbiana de biocombustible semejante al de la actualidad fue instaurado por S. Suzuki en la década de 1970 y realizó el primer modelo de la celda de combustible biológico (Di Salvo *et al.*, 1979).

Durante la época de 1980, la idea fue retomada y estudiada a detalle por M.J. Allen y más tarde por H. Peter Bennetto con la intención de implementar la celda de combustible microbiana como un posible método para la generación de energía eléctrica en países en desarrollo (Allen *et al.*, 1993).

Durante los años noventa, aumentó la eficiencia de estudios experimentales con diversos tipos de sustrato como fuente de carbono. En esta etapa se identificaron algunos microorganismos capaces de transferir electrones al electrodo como aceptor final sin necesidad de mediadores.

Se exploraron diferentes aplicaciones de las celdas microbianas de biocombustible y se generaron nuevos modelos del proceso, donde el trabajo de Allen y Bennetto en 1993, fue especialmente notable, ya que ellos empezaron a concebir estos sistemas como una opción complementaria para la generación de electricidad.

Los SBE necesitan de microorganismos para oxidar combustible y a su vez por medio de un proceso químico genera tanto electricidad como hidrógeno, es decir, se basan en la actividad microbiana que transmiten electrones a un ánodo y digiere la materia orgánica (Logan, 2006) como las aguas residuales para la producción de

la energía eléctrica (Harnisch y Schröder, 2010; Logan y Rabaey, 2012; Rozendal *et al.*, 2008).

Actualmente se trabajan diversos grupos de investigación interdisciplinarios en el mundo profundizando en el análisis y desarrollo de esta tecnología (Reith *et al.*, 2003).

1.2 La contaminación del agua

La contaminación del agua se define como la adición de sustancias a un cuerpo de agua que deteriora su calidad, de forma tal que deja de ser apto, para el uso que fue designado. La materia contaminante puede ser inerte como los compuestos de plomo, mercurio, o viva como los microorganismos (Gogate *et al.*, 2004).

La acción y el efecto de introducir materia o energía, de modo directo o indirecto, que impliquen una alteración perjudicial para usos (humanos) posteriores o su función en el ecosistema y calidad en relación con su función ecológica (Rodríguez, 2012).

1.2.1 Fuentes de contaminación del agua

Las fuentes contaminantes de las aguas residuales representan el mayor origen mundial de contaminación de los desechos domésticos e industriales que se vierten sobre la superficie de las aguas a través de los alcantarillados. La calidad de las aguas residuales depende de los contaminantes que están presentes en el agua: papel, jabón, orina, heces, detergentes, etc. Los desechos industriales, en cambio, son variados y dependen de los procesos específicos de las plantas de las que proceden en su origen (Reynolds, 2002).

a) Contaminación del agua de forma natural:

Los ríos, lagos, mares y estuarios tienen la capacidad de limpiarse a sí mismos sin ayuda del hombre. Esta capacidad es limitada debido a que los niveles de autopurificación son determinados por el volumen de los cuerpos de agua, la cantidad de bacterias, organismos en aguas y las cantidades de contaminantes que llegan a éstas. Un cuerpo de agua de gran tamaño puede diluir un contaminante hasta el límite de que no le haga daño a los organismos que habitan en el agua, ya que estos cuerpos contienen grandes cantidades de oxígeno, el cual es necesario para que las bacterias descompongan los contaminantes (Rossner *et al.*, 2009) y puedan convertirlos en forma química para ser utilizados por las plantas y por los animales. No obstante, si la cantidad de contaminantes vertidos en el agua no pueden ser descompuestos por los microorganismos que habitan en ella, estos permanecerán y evitarán el crecimiento de la flora y la fauna natural (Henríquez *et al.*, 2010).

Casi todas las aguas naturales mantienen una flora compuesta por diversos microorganismos, tales como los protozoarios y bacterias aeróbicas que consumen oxígeno durante su respiración y reproducción, y en grandes cantidades una vez consumido el oxígeno, éstas mueren y se desarrollan en el cuerpo de agua otras bacterias conocidas como bacterias anaeróbicas que no necesitan del oxígeno para su alimentación y reproducción utilizando nitratos y sulfatos en lugar de oxígeno (Dana, 2002).

Tanto las bacterias aeróbicas como las anaeróbicas degradan la materia orgánica, lo que permite el desarrollo de fauna en los cuerpos de agua. Otro componente de la flora acuática son las algas que convierten el CO₂ y los bicarbonatos en materia orgánica y oxígeno con la presencia de la luz solar (fotosíntesis) (Gogate *et al.*, 2004).

La materia orgánica producida por las algas es utilizada por estas mismas para nutrirse y reproducirse invirtiendo el proceso. Cuando el crecimiento de las algas no es excesivo, resulta benéfico, ya que la fauna del cuerpo de agua se nutre de ellas. Cuando el crecimiento de algas es excesivo, suprimirá otras formas de vida de las plantas acuáticas y bloqueará la luz solar necesaria para su adecuado crecimiento (Bolong, 2009).

b) Contaminación antropogénica del agua

La contaminación antropogénica es producida por actividades humanas, donde los contaminantes que se emiten causan problemas a la salud y se clasifican por actividades industriales, minerales, agropecuarias, artesanales y doméstica, siendo estas fijas o móviles.

1.2.2 Parámetros generales indicadores de contaminación

- Parámetros físicos

Temperatura: en las aguas residuales es mayor que en las aguas no contaminadas, debido a la energía liberada en las reacciones bioquímicas, por la degradación de la materia orgánica (Catalán y Ríos, 1987).

Turbidez: es la propiedad de transmisión de la luz en el agua que indica la calidad de aguas residuales con respecto a la materia suspendida (Rossner *et al.*, 2009).

Color: indicativo de la edad y calidad de las aguas residuales, donde los compuestos orgánicos descompuestos por bacterias provocan que el oxígeno disuelto en el agua se reduzca y el color cambie a negro (Gogate *et al.*, 2004).

Olor: gas producidos en la descomposición de la materia orgánica, sobre todo, a la presencia de ácido sulfhídrico y otras sustancias volátiles (Metcalf *et al.*, 1995).

Sólidos Disueltos Totales (SDT), son el material soluble constituido por materia inorgánica y orgánica que permanece como residuo después de evaporar y secar una muestra previamente filtrada a través de un filtro de fibra de vidrio con poro de 1,5 μm a una temperatura de $105\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Sólidos Totales (ST): Es el residuo que permanece en una cápsula después de evaporar y secar una muestra de agua residual a una temperatura de $105\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Sólidos Suspendidos Totales (SST) es el material constituido por los sólidos sedimentables, los sólidos suspendidos y los coloidales que son retenidos por un filtro de fibra de vidrio con poro de 1,5 μm secado y llevado a masa constante a una temperatura de $105\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Sólidos Suspendidos Volátiles (SSV) son aquellos sólidos suspendidos que se volatilizan en la calcinación a $550\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 50\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Sólidos Totales Volátiles (STV): Cantidad de materia orgánica e inorgánica que se volatiliza por el efecto de la calcinación a $550\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 50\text{ }^{\circ}\text{C}$. A la temperatura de $550 \pm 50^{\circ}\text{C}$ la fracción orgánica se oxida y desaparece en forma de gas, quedando la fracción inorgánica en forma de cenizas (Garzón, 2012), que aquí se reportan como RST (cenizas de los SST) y RSD (Cenizas de SDT).

- Parámetros químicos: Las características químicas están dadas, principalmente, en función de los desechos que ingresan al agua residual.

Contaminantes biodegradables: El agua residual contiene pequeñas cantidades de moléculas orgánicas sintéticas como agentes tensoactivos, fenoles y pesticidas usados en la agricultura (Petrovic *et al.*, 2003).

Demanda química de oxígeno (DQO): Es la cantidad de oxígeno requerida para oxidar químicamente los materiales orgánicos presentes en una muestra de agua (Petrovic *et al.*, 2003). La DQO de un agua residual es mayor que su correspondiente DBO, debido al mayor número de compuestos cuya oxidación tiene

lugar por vía química frente a los que se oxidan por vía biológica (Sawyer *et al.*, 2001), esto se atribuye a que algunos contaminantes xenofóbicos persistentes en el agua alteran e inhiben las rutas metabólicas de los microorganismos, degradando la materia orgánica que es transportada en el agua residual (Sleutels *et al.*, 2009). Cerca del 75% de los sólidos en suspensión y del 40% de los sólidos filtrables de un agua residual de concentración media son de naturaleza orgánica. Son sólidos que provienen del reino animal y vegetal, así como de las actividades humanas relacionadas con la síntesis de compuestos orgánicos, es por ello que la determinación de DQO debe realizarse rápidamente después de la toma de muestras, para evitar la oxidación natural (Orozco *et al.*, 2003). En caso contrario, la muestra podría conservarse un cierto tiempo si se acidifica con ácido sulfúrico a un pH = 2-3. Sin embargo, esta opción deja de ser fiable en presencia de cloruros (APHA-AWWA-WPCF, 1975).

Demanda bioquímica de oxígeno (DBO): El parámetro de contaminación orgánica más utilizada y aplicable a las aguas residuales y superficiales es la DBO a los 5 días (DBO₅). Supone esta determinación la medida del oxígeno disuelto utilizado por los microorganismos en la oxidación bioquímica de materia orgánica biodegradable. Es importante en el tratamiento de aguas residuales y para la gestión técnica de la calidad de agua para determinar la cantidad aproximada de oxígeno que se requerirá para estabilizar biológicamente la materia orgánica (Gogate *et al.*, 2004).

Materia inorgánica: Son moléculas pequeñas y simples, como las sales minerales, cloruros, el hidrógeno, nitrógeno, fósforo y azufre (Catalán y Ríos, 1987)

Gases: El oxígeno disuelto es el más importante y es un gas que va siendo consumido por la actividad química y biológica, su presencia en el agua residual evita la formación de olores desagradables; sin embargo, la cantidad de oxígeno disuelto depende de muchos factores, como temperatura, altitud, actividad biológica, actividad química, etc. El ácido sulfhídrico se forma por la descomposición de la materia orgánica que contiene azufre o por la reducción de sulfitos y sulfatos minerales, el anhídrido carbónico se produce en la fermentación de los compuestos

orgánicos de las aguas residuales negras y el metano se forma en la descomposición anaerobia de la materia orgánica por la reducción bacteriana del CO₂ (Dana, 2002).

- Parámetros Biológicos: Estas características están definidas por la clase de microorganismos presentes en el agua, entre los cuales tenemos:

Bacterias: realizan la descomposición y estabilización de la materia orgánica. Pueden clasificarse, en base a su metabolismo, en: heterótrofas (compuestos orgánicos para el carbono celular) y autótrofas (se nutren de compuestos inorgánicos, tomando la energía necesaria para su biosíntesis a partir de la luz) (Jhonson *et al.*, 2001). Las bacterias autótrofas y heterótrofas pueden dividirse, a su vez, en aerobias (necesitan oxígeno procedente del agua para su nutriente y respiración) o anaerobias (no requieren oxígeno, pero sí de citocromos) y estas últimas pueden ser facultativas u obligadas (algunas bacterias aerobias y anaerobias pueden llegar a adaptarse al medio opuesto), según su necesidad de oxígeno (Rossner *et al.*, 2009).

Por ello las bacterias coliformes sirven como indicadores de contaminantes y patógenos. Usualmente se encuentran en el tracto intestinal de los seres humanos y otros animales de sangre caliente (Jhonson *et al.*, 2001).

Algas: requieren de compuestos inorgánicos para reproducirse y pueden presentar el inconveniente de reproducirse rápidamente, debido al enriquecimiento de nutrientes en el agua residual (eutrofización) y crear grandes colonias flotantes originando problemas a las instalaciones y al equilibrio del sistema (Vollenweider, 1976).

1.3 Sistemas Bioelectroquímicos

Esta tecnología utiliza bacterias que oxidan la materia orgánica sobre un electrodo llamado ánodo. Las fuentes de materia orgánica son sustratos tales como acetato, celulosa, almidón, aguas residuales de diversos orígenes, entre otras (Sleutels *et al.*, 2012). Los Sistemas Bioelectroquímicos (SBE) son dispositivos que permiten utilizar un electrodo como aceptor de electrones, proceso que permite obtener energía para sus procesos vitales, los aspectos más importantes son los materiales y las configuraciones de cátodos utilizados, ya que éstos juegan un papel principal en el funcionamiento electroquímico de estos sistemas. Para ello se considerarán dos; la celda de combustible microbiana (CCM) y la celda de electrólisis microbiana (CEM) debido a que ambas producen un valor agregado. En la CCM se genera corriente eléctrica de manera espontánea, mediante reacciones de oxidación-reducción y la segunda, en ella se consume energía eléctrica para llevar a cabo reacciones químicas no espontáneas de oxidación-reducción dirigidas a la producción de biohidrógeno (Pant *et al.*, 2010).

1.3.1 Celda de Combustible Microbiana (CCM)

La CCM busca condiciones de operación y componentes que han sido objeto de intensa investigación tales como el tipo de biocatalizadores, la membrana, temperatura, pH, sustratos, el tipo, materiales y catalizadores de los electrodos, configuración de las celdas y arquitectura (Jeremy *et al.*, 2006).

Por ello, la diversidad de capacidades catalíticas con diseño de alta eficiencia permite utilizar compuestos orgánicos, a partir de hidratos de carbono simples a los residuos de Materia Orgánica (MO), para ser convertida en electricidad (Santoro *et al.*, 2017), utilizando microorganismos presentes en un sustrato como lodos activados (Wang *et al.*, 2003), aguas residuales domésticas (Min and Logan *et al.*, 2005), aguas residuales industriales (Barcélo *et al.*, 2007), entre otros. Esto es posible bajo ciertas condiciones de algunos microorganismos que transfieren los

electrones producidos en su actividad metabólica a un electrodo (ánodo) en lugar de un aceptor natural de electrones (como oxígeno). Por ello los materiales del ánodo deben ser conductores, biocompatibles, respetuosos con el medio ambiente, de bajo costo y químicamente estables en la solución de la celda (Jeremy *et al.*, 2006).

La elección del material del cátodo afecta de manera importante el desempeño y su variedad de aplicación (Cheng *et al.*, 2006), así el material de electrodo más versátil es el carbono, ya que es relativamente barato, fácil de manejar y tiene un área de contacto definido.

Para incrementar la velocidad de reducción de oxígeno, los catalizadores de platino ($0.1\text{mg}\cdot\text{cm}^2$) son utilizados generalmente para oxígeno disuelto o cátodos de difusión de gas. Recientemente, se han propuesto algunos metales nobles como cátodos para este tipo de celdas (Logan *et al.*, 2006); sin embargo, los materiales del ánodo también se pueden utilizar como colector de corriente y contribuye a degradar el sustrato (Pant *et al.*, 2010).

- Celda de Combustible Microbiana de una cámara (CCM)

La CCM es un dispositivo que convierte la energía bioquímica en electricidad (Figura 1.1), propicia una reacción redox entre los hidratos de carbono y los microorganismos o enzimas; estos últimos se utilizan como catalizadores.

El flujo de electrones se produce con la ayuda de microorganismos y la corriente eléctrica se transporta a través de un circuito externo del ánodo de carga negativa de tela de grafito que fue tratada previamente con HCl y NaOH 1 M, hacia el cátodo con carga positiva de fibra de carbono, unidos con un filamento de acero inoxidable que permite la alimentación de la corriente eléctrica, mientras que los protones (H^+) generados en la cámara anódica permean hacia la cámara catódica (Pant *et al.*, 2010) mediante una membrana Ultrex CMI 7000.

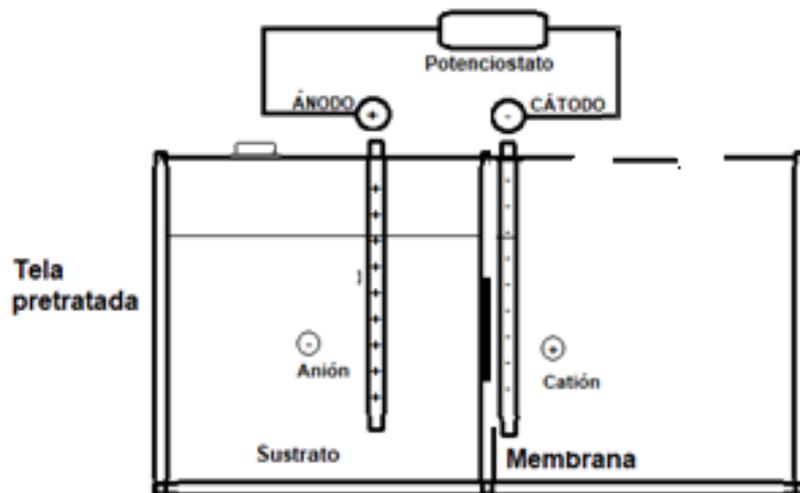


Figura 1.1 Representación esquemática de una CCM (Oh *et al.*, 2004)

Como se muestra en la Tabla 1.1, podemos observar que las CCM son de gran importancia ya que en ella se describe un progreso relevante en la interacción, función y desempeño de estos sistemas (Rosenbaum *et al.*, 2011).

Tabla 1. 1 Principales variables a considerar en la Celda de Combustible Microbiana

Características	Bacterias	Sustrato	Ánodo	Cátodo	DP (mW/m ²)	Voltaje (mV)	pH	EC (%)	Referencia
Cámara doble con agitación (c, anódica), membrana Nafión	<i>Geobacter sulfurreducens</i> Anaeróbicos, acetato	Acetato	Grafito	Grafito	1143	450	-	30-60	Bond <i>et al.</i> , 2003
Cámara doble MIP Ultrex	Lodo granulado y metanogénico (<i>Firmicutes</i> , - <i>proteobacteria</i>)	Glucosa	Varilla de grafito (placa)	Varilla de grafito (5mm diámetro)	4310	750- 798	7.0	-	Rabaey <i>et al.</i> , 2004
Cámara doble MIP Ultrex	(<i>E.Coli</i> , <i>Shewanella</i> , <i>Geobacter</i> , <i>Klebsiella</i>)	Glucosa	Filtro de grafito	Filtro de grafito	3600		-	89±4	Rabaey and Verstraete, 2005
Cámara doble, MIP Nafión 117	Lodo anaeróbico	Agua residual/ Acetato	Papel Carbón	Carbón con Platino (0.5mg/cm ²)	8177	290 en 5 h.	6.0	27.1-40.5	Oh <i>et al.</i> , 2005
Cámara doble, membrana MIP	<i>G. sulfurreducens</i> , <i>proteobacteria</i> ,	Agua residual, Ferrocianuro	Tela de carbono	Fibra de carbono con Fe o Co	1540	110- 250	7.0	-	Logan and Regan, 2006
Cámara doble, membrana Nafión	<i>Geobacter</i>	Agua residual, Glucosa y acetato	Papel carbón	Tela de carbón	-	1210	-	80±9	Du <i>et al.</i> , 2007
Cámara sencilla, sin membrana	Mezcla de bacterias	Acetato, aguas residuales		Tela de carbón con platino (0.5mg/cm ²)	6860	200- 450	7.0	78.2	Fan <i>et al.</i> , 2008
Cámara doble, MIP Nafión 117	<i>Geobacter sulfurreducens</i>	Acetato	Varilla de grafito,	Tela de grafito	3900	-	-	-	Yi <i>et al.</i> , 2009
Cámara sencilla, MIP Nafión 115	Lodo de digestor anaeróbico	Glucosa y acetato	Filtro de carbono suspendido en varilla de grafito	Filtro de carbono suspendido en varilla de grafito	3650	-	7.0	88±5.7	Borole <i>et al.</i> , 2009
MIP batch	-	Acetato de sodio, lixiviados de un relleno sanitario	Carbono	Carbono	11000	480	7.0	-	Hernández, 2008.
Cámara sencilla con membrana	<i>Enterobacter</i>	Agua residual con acetato como materia orgánica	Tela de carbono dopado con platino	Tela de carbono	4000	400	-	.	Santoro <i>et al.</i> , 2017
Cámara sencilla	<i>Geobacter</i>	Lodo del digestor alimentado con acetato	Tela de carbono	Tela de carbono	-	500	7.0	-	Jeremy <i>et al.</i> , 2006

*EC: eficiencia coulombica; DP: diferencia de potencia

1.3.2 Celda de Electrólisis Microbiana (CEM)

En la CCM las bacterias rompen compuestos orgánicos para generar electricidad directamente. Si los electrones que portan la carga eléctrica se combinan con los protones, que los microorganismos generan durante la producción de hidrógeno gaseoso, este proceso se conoce como “electrólisis microbiana” (Logan *et al.*, 2006). Para que el proceso tenga lugar, se introduce una pequeña corriente eléctrica desde el exterior del sistema a la CEM.

Adaptando mejor su diseño, mejorando las condiciones para las bacterias y agregando una pequeña cantidad de electricidad, se consigue incrementar la producción de hidrógeno en el sistema (He *et al.*, 2013). Los investigadores han logrado los mayores niveles de producción obtenidos hasta el momento con este método a partir de diferentes fuentes de materia orgánica. En ciertas configuraciones, casi todo el hidrógeno contenido en las moléculas del material inicial se convierte en gas hidrógeno utilizable, eficiencia que en el futuro puede abrir las puertas a la producción bacteriana de hidrógeno a una mayor escala.

- Celda de Electrólisis Microbiana de una cámara

La CEM es un método relativamente nuevo para generar H₂ a partir de acetato de sodio y otros productos de fermentación, donde las bacterias electrogénicas oxidan al sustrato y liberan electrones al ánodo. El cátodo al ser anaerobio no permite la generación espontánea de corriente eléctrica (Pant *et al.*, 2010) debido al valor de la energía libre de Gibbs de la reacción (Logan *et al.*, 2008). Por ello, al generar la espontaneidad en la reacción de la cámara catódica en la superficie porosa del cátodo produce la reacción de los protones.

En la Figura 1.2 se muestra los componentes físicos esenciales de una CEM de una cámara, los cuales consisten de un ánodo, un cátodo, microbios activos y una fuente de alimentación externa (Min *et al.*, 2005). En una CEM, los microorganismos descomponen la materia orgánica en CO₂, electrones y protones como parte de su

metabolismo. Las bacterias transfieren los electrones hasta el ánodo, mientras que los protones se liberan directamente.

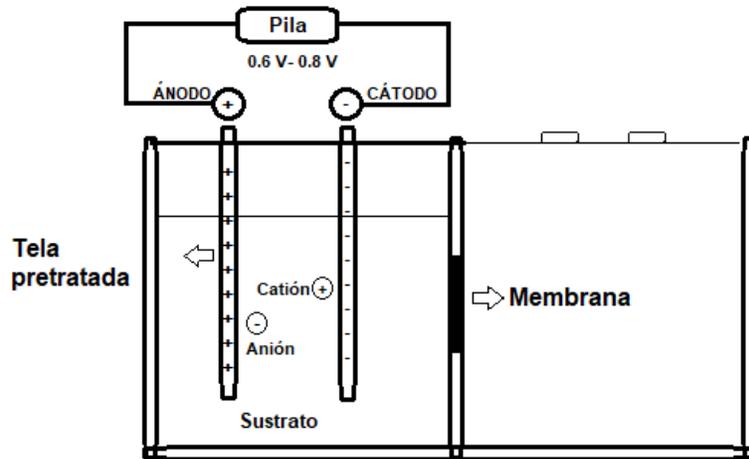
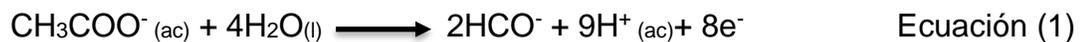


Figura 1.2 Esquema de una CEM

En la ecuación 1 se muestra la reacción que se lleva a cabo en la cámara anódica usando acetato de sodio como única fuente de carbono, se muestra en la ecuación (1).



Los electrones viajan a través de un electrodo con ayuda de la fuente de alimentación externa al cátodo, donde se combinan los protones libres en la solución para generar H_2 (cátodo reacción) como se muestra en la ecuación 2 (Abudukeremu *et al.*, 2016).



La reacción mostrada en la ecuación 3 no se produce espontáneamente para producir H_2 en el cátodo del CEM. Un cátodo con un potencial mayor a -0.414 V es necesario bajo condiciones normales de $\text{pH}=7$, $T=25 \text{ }^\circ\text{C}$.

1.4 Estructura de la celda de combustible microbiana y celda de electrólisis microbiana

La eficiencia en las celdas es de gran importancia, por ello, es decisivo seleccionar adecuadamente los materiales para su construcción (Kim *et al.*, 2005) ya que pueden afectar la producción de la corriente eléctrica y el biohidrógeno.

1.4.1 Materiales del ánodo

El ánodo es un componente indispensable porque las bacterias exoelectrógenas “exo-” fuera de, y “electrógeno” transfieren electrones directamente a un producto químico o material al ánodo (Logan y Regan, 2006), por ello el material ideal debe tener: una buena conductividad eléctrica, una baja resistencia, presentar una fuerte biocompatibilidad, estabilidad química, anticorrosión de gran superficie, versatilidad en morfologías y son químicamente estables en el proceso anaeróbico.

Entre ellos están los materiales carbonosos, como: la tela, las escobillas, la varilla, malla, velo, papel carbón, emisiones de carbono, carbón activado granular, grafito granular, cartón carbonizado y placa de grafito, se utilizan como material del electrodo del ánodo disponible comercialmente, ya que son relativamente baratos, fáciles de manejar y tienen un área de contacto definido (Hernández, 2008).

Los nanotubos de carbono (CNT) son conocidos por sus propiedades eléctricas y estructurales, la facilidad de funcionalización con diferentes grupos que reaccionen, el peso ligero, la dureza, la extraordinaria conductividad electrónica. Un estudio llevado a cabo por Qiao *et al.* (2013) ilustra que los nanotubos de carbono podrían amplificar la viabilidad de transferencia de electrones al electrodo con el uso de nanospolianilina, el cual es un compuesto nanoestructurado a partir del monómero de alguna sal de anillo mediante una polimerización oxidativa, puede ser electroquímica en el ánodo de una celda electroquímica o química en un agente

oxidante de una solución acuosa. Para mejorar el rendimiento de los materiales del ánodo, teniendo como base el carbón, son pretratados en el proceso.

Otros de los materiales son con base en metales, placa de acero inoxidable, malla de acero inoxidable, depurador de acero inoxidable, hoja de plata, hoja de níquel, lámina de cobre y hoja de oro que son conectados a los electrodos, donde la energía eléctrica es generada por una población de bacterias que se adhieren al electrodo y son capaces de transportar electrones a los electrodos.

Recientemente el tratamiento térmico de los materiales ha mejorado la utilidad del ánodo en la CCM y CEM (Wang *et al.*, 2009).

1.4.2 Materiales del cátodo y catalizadores

Al igual que en el ánodo, el cátodo es una de las partes más importantes de la CCM y CEM donde productos químicos de valor añadido se producen. Para la CEM la reacción de desprendimiento de hidrógeno, el electrodo de carbono puro es muy lento y un alto sobrepotencial es necesario para generar H₂. Una ventaja del uso del platino es que se considera un metal dúctil, maleable y pesado con alta capacidad catalítica que favorece la producción de hidrógeno; sin embargo, su inconveniente principal es su alto costo (Conway and Jerkiewicz, 2002).

Base de los electrodos en el cátodo.

Los materiales más prometedores son acero inoxidable y aleaciones de níquel, en tres tipos diferentes de acero con diferente composición de metal. Acero 304, acero 316 y 430 que contiene 9.25, 12 y 0.75% de níquel, respectivamente, se utilizan en electro-hidrólisis alcalina (NaOH y KOH) (Ramírez *et al.*, 2009).

El acero 304 de mallas tejidas y expandido tiene composición de 0.08% C, 2% Mn, 1% Si, 18-20% Cr y 8-11% de Ni y fue evaluado como cátodo (Selembo *et al.*, 2009). Recientemente se ha demostrado que la presencia de fosfato y algunos ácidos débiles tienen un efecto benéfico, debido a que las especies cargadas aumentan la conductividad del electrolito y también reducen el exceso de potencial sobre los cátodos de Pt-carbono (Conway and Jerkiewicz, 2002).

1.4.3 Microorganismos utilizados en los Sistemas Bioelectroquímicos

El uso de microorganismos tiene la capacidad de catalizar alguna de las reacciones en una celda; según sea el caso. La sensibilidad a los cambios de temperatura ambiente depende del grado de adaptación del cultivo, modo de operación (Angenent *et al.*, 2004; Kapdani y Kargi, 2006), que permiten explorar diseños de celdas que aprovechen las aguas residuales, para generar bioenergéticos. Dentro del uso de materia orgánica residual, la idea es usar microorganismos en condiciones anaeróbicas capaces de oxidar compuestos orgánicos para transferir, directa o indirectamente, los electrones de la oxidación al ánodo. Se ha estudiado el funcionamiento de cultivos puros sobre el mecanismo de transferencia de electrones al ánodo, pero la producción de corriente eléctrica siempre es menor con cultivos puros que con mezclas de bacterias (Liu *et al.*, 2012). Kiely (2011) hace una revisión sobre la manera en que distintos sustratos son degradados en los sistemas bioelectroquímicos (incluyendo CEM y CCM) por microorganismos exoelectrogénos mediante la identificación de las comunidades microbianas específicas de cada sustrato en el ánodo. Al tomar el ánodo de una CCM y cambiarla a modo CEM, se encontró que la biopelícula tiene una menor diversidad de poblaciones y un aumento de bacterias, con respecto a la CCM. Esto se atribuye a la falta de oxígeno en el sistema CEM, que provoca una ventaja competitiva para las bacterias anaerobias.

a) Microorganismos en la cámara anódica

La generación de electricidad bacteriana en la cámara anódica determina algunos de los factores que influyen en la generación de energía como las vías metabólicas que gobiernan el flujo de electrones y protones, la influencia del sustrato y el potencial del ánodo (Rabaey and Verstraete, 2005). Con altos potenciales anódicos, las bacterias pueden usar la cadena respiratoria en un metabolismo oxidativo y transferir electrones al ánodo, pero, si el potencial del ánodo disminuye los electrones se depositan sobre aceptores de electrones alternativos y ocurre la fermentación.

Kiely (2011) caracterizó la comunidad microbiana de los SBE, al destacar procesos para la generación de corriente eléctrica a partir de un sustrato; dentro de la cámara anódica ciertos microorganismos hidrolizan y fermentan compuestos orgánicos complejos y otros utilizan los subproductos para la generación de corriente, estableciendo una estructura jerárquica con microorganismos dominantes llamado sintrofia.

La corriente eléctrica sobre el electrodo mejora la producción de energía (Watanabe, 2008), por lo tanto, conocer los procesos de colonización, invasión y sucesión de las poblaciones microbianas que producen electricidad, permitirá explorar nuevos métodos para la producción de energía sustentable y renovable (Logan, 2006).

En los consorcios anódicos, las bacterias más comunes pertenecen a los géneros *Shewanella*, *Geobacter*, *Rhodospirillum rubrum*, *Proteobacter* y *Pseudomonas*, se destacan las especies *S. putrefaciens*, *P. aeruginosa*, *G. sulfurreducens*, *G. metallireducens* (Sharma *et al.*, 2010) y *Clostridium*. Para ello se consideran dos tipos de bacterias de *Clostridium* que son el *C. bifermentans* y *C. sordellii*, ya que por sus particularidades principales es que son bacterias esporuladas, electrogénicas y permiten degradar la materia orgánica, sus características generales son:

Las *Clostridium* llevan a cabo sus actividades metabólicas en una atmósfera ausente de oxígeno, su hábitat natural es el suelo, crece a temperatura de 32 °C y a un pH de 7 (Tadahiro *et al.*, 2002). Las características propias de cada uno se presentan a continuación:

- *Clostridium sordellii*: bacteria anaerobia, gram positiva, descubierta en 1922 por el microbiólogo argentino Alfredo Sordellii, la denominó *Bacillus oedematis sporogenes* (Carter, 2010). En la Figura 1.3 se muestra la morfología de la bacteria, bacilo esporulado, inmóvil, crece en forma fácil y abundante en medios tales como carne cocida, medio Ravot y agar de tlioglicolato sódico, produce una toxina muy potente y moderada que se inactiva a 70 °C durante 20 min (DSMZ, 2014).

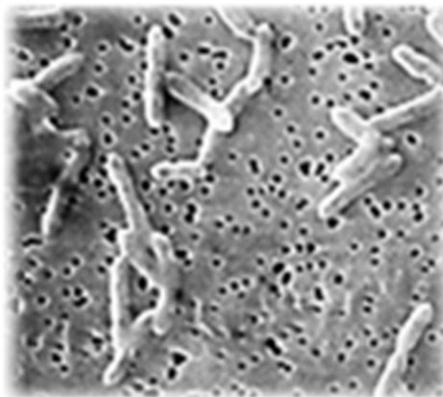


Figura 1.3 Morfología de la bacteria *Clostridium sordellii*

- *Clostridium bifermentans*: bacteria anaerobia, gram positiva (Tadahiro *et al.*, 2002), se encuentra en las heces, las aguas residuales y los sedimentos marinos, es un bacilo esporulado, crece fácil y abundante en medios tales como agar de tlioglicolato de acetato (Brewer, 1940), medio Ravot en condiciones anaeróbicas (Zhang and Angelidaki, 2012) y tiene la capacidad de producir metabolitos en presencia de oxígeno. En la Figura 1.4 se presenta la morfología de esta bacteria, donde su reproducción ocurre individualmente, en pares o cadenas cortas, se asemeja a *C. sordellii* de esporas ovals (Thorley y Wolf, 1960).

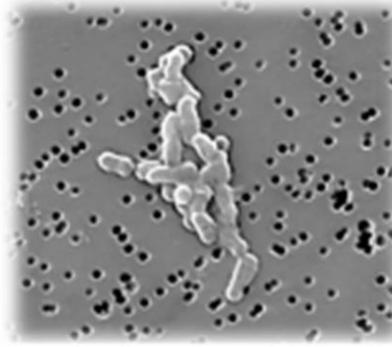


Figura 1.4 Morfología de la bacteria *Clostridium bif fermentans*

b) Mecanismos de los microorganismos

La transferencia extracelular de electrones se ha planteado de diferentes mecanismos para explicar cómo los microorganismos se definen en el proceso, en el cual los electrones derivados de la oxidación de compuestos orgánicos son transferidos a la superficie externa de la celda para reducir un aceptor terminal de electrones extracelulares (Lovley, 2008 a):

Existen varios mecanismos para la transferencia de los electrones:

- *Transferencia directa con la participación de citocromos (electrones al electrodo);*

Entre los organismos más estudiados de esta clase encontramos a *Geobacter sulfurreducens* y *rhodoferax*; los cuales poseen mecanismos de transporte de electrones internos y no requiere la ayuda de mediadores para liberar los electrones (Bond y Lovley, 2003), estos microorganismos conservan la energía permitiendo el crecimiento por la oxidación de compuestos orgánicos a CO₂ y con la transferencia directa de electrones a los ánodos de las CCM (Hau y Gralnick 2007). La manera en que esta bacteria transfiere electrones al electrodo es a través de una serie de citocromos tipo C, asociados a la membrana interna, periplasma y membrana externa (Methé *et al.*, 2003). *Transferencia con ayuda de mediadores externos o producidos por el mismo organismo.*

Un mediador es un compuesto que puede entrar en la célula, acepta los electrones que se encuentran dentro y sale de la célula en estado reducido para donar los electrones al ánodo. Estos mediadores juegan un papel fundamental en la transferencia de electrones en aquellos microorganismos que son incapaces de transferir electrones al ánodo directamente.

Existen especies que requieren de un mediador externo, pero este no es producido por el mismo microorganismo y requieren mediadores que transporten los electrones al ánodo. Sin embargo, la desventaja de estos mediadores es que son tóxicos para los seres humanos y por esta razón se debe evitar su uso; asimismo estos compuestos mediadores pueden producir ácidos, lo que disminuye la eficiencia y la potencia de la electricidad producida (Hau y Gralnick., 2007).

- *Transferencia por medio de los nanocables bacterianos (pili);*

Algunas bacterias pueden hacer crecer nanocables que son filamentos de proteínas producidos por microorganismos *in vivo*, estos conductores eléctricos permiten enlazarse y construir circuitos biológicos para comunicarse y compartir energía a través de cabellos de conducción eléctrica conocidos como nanocables bacterianos (pili).

En estudios recientes se ha descubierto la presencia de nanocables en microorganismos electrógenos. Estos pili se han identificado en bacterias como *Geobacter sulfurreducens*, *Shewanella*, una *cianobacteria fototrópica Synechocystis* y un microorganismo fermentador termofílico *Pelotomaculum thermopropionicum* (Gorby *et al.*, 2006), estos filamentos delgados son encargados de realizar la conexión eléctrica entre la celda y los óxidos de Fe (III) y deben estar en contacto directo con el ánodo formando una red entre las células para facilitar la transferencia de electrones a través de la biopelícula lo mejor posible, pues se sabe que crecen en monocapas y los nanocables proveen soporte estructural en la formación de dicha biopelícula (Lovley, 2008 b). En la Figura 1.5 se muestra el mecanismo que presenta la transferencia directa de electrones entre portadores eléctricos, portadores de bacterias y el selector de energía. El segundo mecanismo

ocurre en la presencia de microorganismos eléctricos, que son compuestos que transportan electrones entre las bacterias y el electrodo mediante transporte difusivo. El tercer mecanismo propone un componente sólido que forma parte de la matriz de biopelícula extracelular y es conductor de la transferencia de electrones desde las bacterias a la superficie sólida.

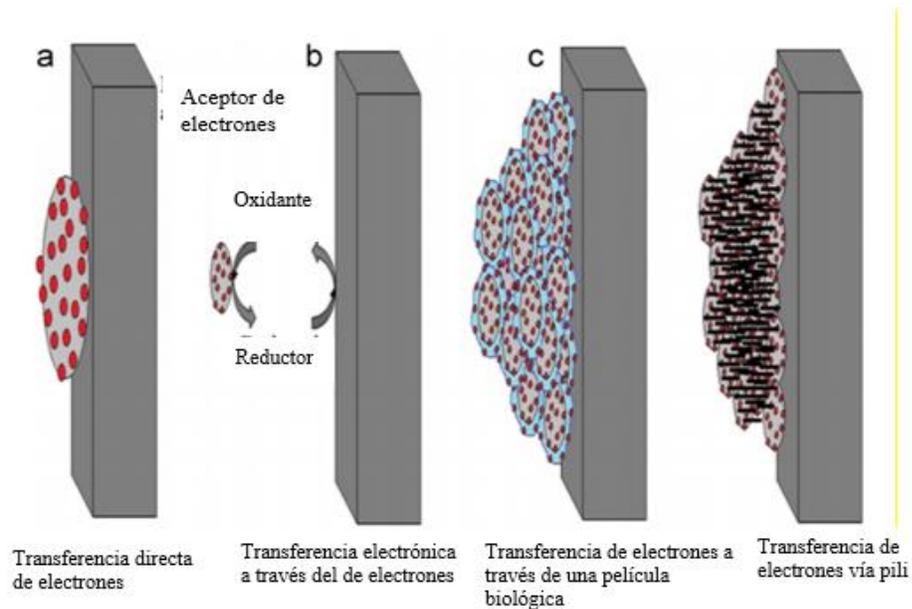


Figura 1.5 Diagrama esquemático que describe el mecanismo de transferencia de electrones (Kadier *et al.*, 2015)

c) Microorganismos en la cámara catódica

Entre los microorganismos electrótrofos que pueden aceptar electrones de la superficie del cátodo de manera directa o inmediata (Rittmann, 2006), sobresalen especies como *G. sulfurreducens* y *S. putrefaciens*, la mayoría de las bacterias utilizadas en los cátodos de Gram negativas, pero algunas Gram positivas tales como *Micrococcus luteus*, *Bacillus subtilis* y *Staphylococcus carnosus*, también hacen una transferencia directa de electrones. Otras como *Acinetobacter calcoaceticus* excretan compuestos activos redox para transferir electrones al

oxígeno catódico en la CCM y en cambio *Dechlorospirillum anomalous* acepta electrones del cátodo para reducir el perclorato (Huang *et al.*, 2011).

1.5 Métodos para la obtención de biohidrógeno

El hidrógeno se ha convertido en uno de los principales objetos de estudio, en la tierra no se encuentra en forma elemental, pero se le puede obtener a partir de ciertos procesos eléctricos, térmicos, químicos o bioquímicos. Existen cuatro mecanismos básicos para la producción biológica de hidrógeno: biofotólisis, biofotólisis indirecta, fotofermentación y fermentación oscura.

1.5.1 Biofotólisis

La biofotólisis es la disociación de agua en hidrógeno y oxígeno utilizando la energía solar y microorganismos fotosintéticos que generan hidrógeno para eliminar el exceso de equivalentes reducidos. Como bioproducto de la fijación del nitrógeno la biofotólisis directa se lleva a cabo bajo una radiación luminosa; en tanto que la indirecta, en la oscuridad (Aki *et al.*, 2006).

- Directa

Proceso de producción de hidrógeno y oxígeno fotosintéticamente a partir de agua y luz solar ver Ecuación 4. (Daday *et al.*, 1977; Melis and Happet, 2001), donde la hidrogenasa es parte de la genética y enzima para el transporte de electrones que genera hidrógeno y produce ATP durante la fotosíntesis. Éstas canalizan la producción de dos protones ($2H^+$) a hidrógeno gaseoso (H_2) mediante la siguiente reacción (Levind and Love, 2004).



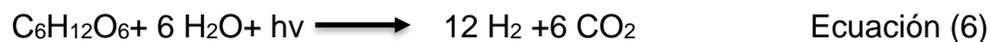
- Indirecta

La biofotólisis indirecta consiste en la primera etapa de fotosíntesis útil para la acumulación de carbohidratos, que son utilizados en una segunda etapa de fermentación oscura; en la que, se produce hidrógeno (Kapdan y Kargi, 2006). Se lleva a cabo por cianobacterias, donde a partir del proceso fotosintético el CO₂ (Ecuación 5) es fijado a sustratos ricos en hidrógeno endógeno generando luego hidrógeno molecular cuando estos microorganismos se incuban en condiciones anaerobias (Dutta *et al.*, 2005).



1.5.2 Fotofermentación

La fotofermentación tiene condiciones anaeróbicas y es realizada por un grupo de bacterias que realiza una fotosíntesis anoxigénica (Kovács *et al.*, 2000). Se llaman “púrpuras” porque son fototróficas y captan la energía de la luz (Ecuación 6) mediante bacterioclorofilas y carotenos que le dan ese color. Estas bacterias fototróficas utilizan una gran diversidad de compuestos orgánicos como fuente de carbono, tales como ácidos grasos, azúcares y aminoácidos) (Jeffries *et al.*, 1978).



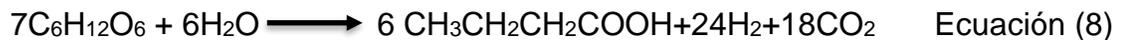
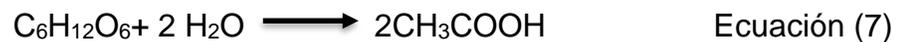
En este proceso interviene la hidrogenasa, la cual compite por el hidrógeno disponible en el medio, reduciendo la actividad de la nitrogenasa al quedar sin sustrato (Reith *et al.*, 2003).

1.5.3 Fermentación oscura

La fermentación oscura se lleva a cabo de forma independiente a la luz y los microorganismos necesitan como fuente de carbono glucosa (Ecuación 7 y 8),

xilosa, almidón, celulosa u otras fuentes que pueden ser generadas a partir de la hidrólisis de polisacáridos, proteínas y lípidos (Zhang and Angelidaki, 2012; Lin *et al.*, 2004).

La producción de hidrógeno por este método está dada por bacterias anaeróbicas que crecen en oscuridad y usan sustratos ricos en carbohidratos. Los subproductos de la fermentación lo constituyen los ácidos acético y butírico, con lo que los rendimientos prácticos de hidrógeno en la fermentación oscura es la glucosa consumida (Levin *et al.*, 2004), produciéndose biogás que contiene H₂, CO₂, CO, H₂S y, en algunos casos CH₄.



Las especies bacterianas que producen hidrógeno por este sistema y que son más conocidas, son las que corresponden a los géneros *Enterobacter*, *Bacillus* y *Clostridium* formadoras de esporas (Reith *et al.*, 2003).

La presencia de consumidoras de H₂ tales como las bacterias homoacetogénicas, metanogénicas y reductoras de nitratos y sulfatos son otro factor que reduce la producción de hidrógeno. Los factores que afectan el desempeño de la fermentación oscura están relacionados con las condiciones de operación tales como pH, tiempo de retención hidráulico, nutrientes, temperatura, concentración del sustrato, inóculo y tipo de sustrato.

El rendimiento se define como la cantidad de H₂ producido por cantidad de sustrato consumido y se expresa en unidades de mol H₂/mol de glucosa. La Tabla 1.2 menciona cada uno de los mecanismos incluyendo microorganismos, enzimas, así como sus ventajas y desventajas.

Tabla 1.2 Mecanismos de producción de H₂ incluyendo microorganismos, enzimas.

Ventajas y desventajas.

Mecanismos	Organismos	Enzimas	Ventajas	Desventajas
Biofotólisis	Algas cianobacterias	[FeFe]- Hidrogenasa	H ₂ producido a partir de luz solar y agua.	Sensibilidad al O ₂ , reactores con bajo aprovechamiento de la luz, baja eficiencia en la producción de H ₂ .
Biofotólisis indirecta	Cianobacterias	[NiFe]-Hidrogenasa	Heterocistos (células especializadas fijadoras de nitrógeno), separan la producción de H ₂ de la de O ₂ en los microorganismos.	Se requiere de mejores diseños de reactores para el aprovechamiento de la luz.
Fotofermentación	Bacterias púrpuras no sulfurosas	Nitrogenasa	Utiliza energía de la luz solar para convertir ácidos orgánicos de cadena corta a H ₂ y CO ₂ sin la generación de subproductos.	Baja eficiencia en el aprovechamiento de la luz
Fermentación oscura	Bacterias anaerobias	Hidrogenasa	Altas velocidades de producción de H ₂ , utiliza aguas residuales como sustrato, usa consorcios microbianos.	Muchos subproductos, se requiere de separación del biogás para recuperar el H ₂ , metabolización incompleta del sustrato/bajos rendimientos

(Brentner *et al.*, 2010).

1.5.4 Electrólisis Microbiana

Desarrollos tecnológicos para generar biogás se han inclinado hacia la producción de biohidrógeno en vez de otros gases como el metano, ya que el hidrógeno es más valioso en términos de contenido energético.

Algunos métodos que generan la fermentación anaerobia son mediante procesos químicos y biológicos; sin embargo, otro de los sistemas como el uso de CEM convierte la MO en protones y electrones mediante microorganismos adheridos a la superficie de un ánodo y fluyen hacia un cátodo, utilizado para reducir el CO₂ hasta la formación de carbohidratos y lípidos (usados para crecimiento celular y como reserva energética y de sustrato); como parte del metabolismo celular de los microorganismos. Por ello, los sistemas de CEM pueden ser utilizados de manera eficiente si se usa el efluente proveniente de un proceso anaerobio que genera hidrógeno por fermentación oscura como se muestra en la Tabla 1.3.

Tabla 1.3 Sustratos, materiales utilizados en el ánodo y cátodo, potencial aplicado y eficiencias obtenidas en la CEM.

Sustrato	Ánodo	Cátodo	Potencial Aplicado	Eficiencia	Referencia
Acetato de sodio	Papel carbón	Papel carbón con Pt	0.418V	14mLH ₂ /L/d	Benemann <i>et al.</i> , 1980.
Producto de fermentación real y sintético de lignocelulosa y celobiosa.	Cepillo de cerdas de grafito	Tela de carbón catalizada con platino.	0.5 V	-	Lalaurette <i>et al.</i> , 2009.
Producto de fermentación de etanol.	Cepillo de cerdas de grafito	Tela de carbón catalizada con platino	0.2-0.8 V	1.41m ³ H ₂ /m ³ /d	Lu <i>et al.</i> , 2009
Lodo activado fermentado. Lodo sin fermentar (crudo).	Cepillo de cerdas de grafito	Tela de carbón catalizada con platino	0.6V	0.91m ³ H ₂ /m ³ /d	Lu <i>et al.</i> , 2012
Ácido acético	Papel carbón	Papel carbón con Pt	0.4V	18mLH ₂ /L/d	Zhang and Angelidaki, 2012
Efluente sintético de fermentación oscura.	Filtro de grafito	Electrodo de difusión a base de níquel.	0.6-1.0V	-	Escapa <i>et al.</i> , 2012
Lodo activado fermentado. Acetato de sodio para celdas control.	Cepillo de cerdas de grafito	Tela de carbón catalizada con platino.	0.8 V	-	Liu <i>et al.</i> , 2012
Agua residual doméstica	Filtro de grafito	Papel carbón con Níquel	0.2-1.4 V	45mLH ₂ /L/d	Gil-Carrera <i>et al.</i> , 2013
Lodos activados fermentados/acetato de sodio.	Cepillo de cerdas de grafito	Tela de carbón catalizada con platino	0.8V	68mLH ₂ /L/d	Lu <i>et al.</i> , 2012
Agua residual doméstica	Filtro de grafito	Acero inoxidable	0.6 V	15mLH ₂ /L/d	Heidrich <i>et al.</i> , 2013

En las siguientes tablas (Tabla 1.4 y 1.5) se muestra las ventajas y desventajas de los principales procesos metabólicos que ocurren naturalmente en las bacterias para la producción de biohidrógeno.

Tabla 1.4 Ventajas y desventajas de fermentación oscura para la producción de biohidrógeno

	Ventajas	Desventajas
Fermentación Oscura	<ul style="list-style-type: none"> - Altas velocidades de producción de H₂. - Utiliza consorcios microbianos (Brentner <i>et al.</i>, 2010). - Produce un combustible limpio (Sinha y Pandey, 2011). - Se pueden utilizar una gran cantidad de sustratos como residuos sólidos orgánicos y aguas residuales, lo que provoca que la materia prima sea renovable. 	<ul style="list-style-type: none"> - Únicamente se pueden obtener 4 moles de H₂ por cada mol de glucosa convertida, en lugar de los 12 moles teóricos de H₂ esperados (Sinha y Pandey, 2011). - Genera subproductos conocidos como ácidos grasos volátiles, los cuales disminuyen la eficiencia del tratamiento global (Wang <i>et al.</i>, 2003). - Muchos subproductos, se requiere de separación del biogás para recuperar el H₂.

Tabla 1.5 Ventajas y desventajas de la CEM para la producción de biohidrógeno

	Ventajas	Desventajas
CEM	<ul style="list-style-type: none"> - Enfoca la producción de electricidad, biogás, e hidrógeno a partir de la materia orgánica en efluentes y lixiviados de residuos sólidos. - Remoción de contaminación del efluente y la producción de energía como fuente de energía limpia. - Utiliza consorcios microbianos (Brentner <i>et al.</i>, 2010). 	<ul style="list-style-type: none"> - Requiere de una energía externa (del orden de 0.5 a 0.8 V). - Genera otros contaminantes. - Puede generar pérdidas de resistencia de potencial y desactivación de electrodos.

2. METODOLOGÍA

La metodología para la “Construcción y operación de un sistema bioelectroquímico para la disminución de DQO” se resume en la Figura 2.1:

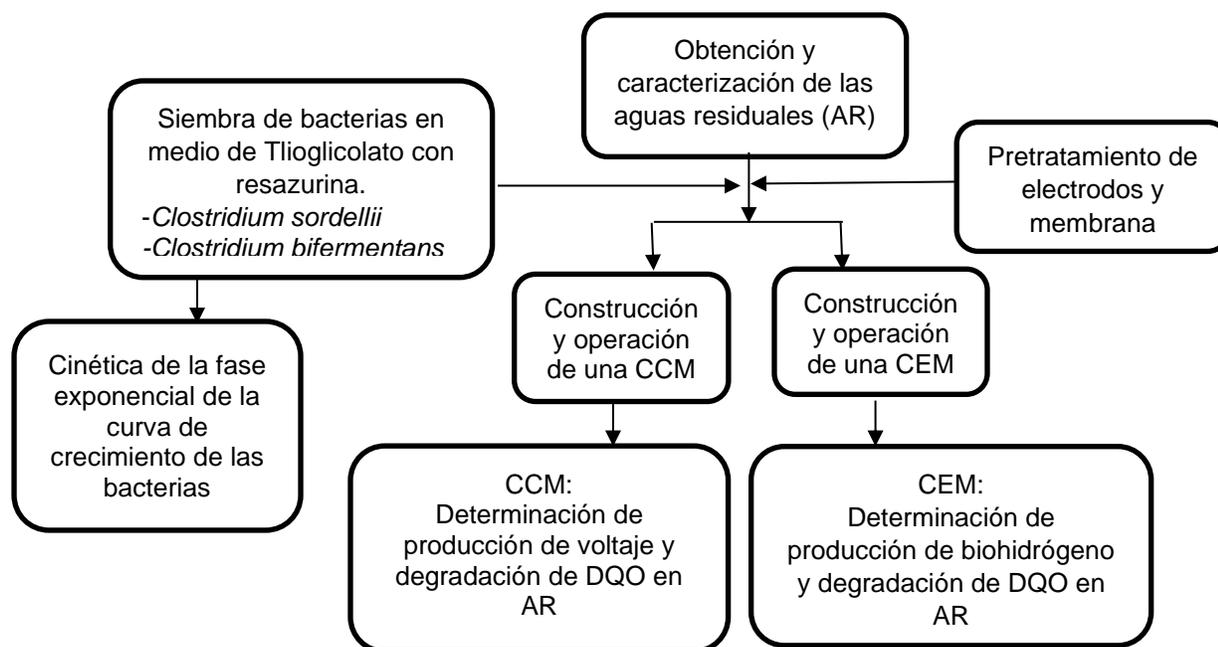


Figura 2.1 Metodología para la construcción y operación de un sistema bioelectroquímico

2.1 Obtención y caracterización del agua residual

El agua residual doméstica que fue utilizada como fuente de carbono para los microorganismos, con el fin de producir electricidad y biohidrógeno se obtuvo en la planta tratadora de aguas de la Secretaría de Desarrollo Agropecuario: SEDAGRO I, en Metepec, Edo. de México. El agua fue muestreada en la entrada de la planta tratadora después del cribado, para eliminar partículas gruesas. Se recolectaron 10 L del agua y fue trasladada al Laboratorio de Investigación en Ingeniería Ambiental (LIIA) del Instituto Tecnológico de Toluca (ITT) y se preservó en refrigeración a 4 °C, se tomaron las muestras para la determinación de: pH con un Potenciómetro (Hanna instruments HI2221, DBO con un medidor de oxígeno disuelto modelo YSI5100,

después de una hora del muestreo. La DQO se determinó con tubos Hanna, previamente preparados y cerrados herméticamente, se inyectaron 2 mL de la solución en cada una de las celdas y se dejaban 2 h en el equipo Hach, a una temperatura de 500 °C, se enfriaban hasta llegar a la temperatura ambiente, utilizando aluminio para evitar la entrada de luz y al final se colocaba en equipo Hanna Instruments Hi83099 COD.

Para sólidos totales, sólidos suspendidos y sólidos filtrables se utilizaron técnicas de filtración, evaporación y pesado, utilizando un horno de secado de circulación forzada modelo HCF- 478; una mufla: Linberg modelo 51894; una bomba de vacío vacuubrand y una balanza analítica Sartorius cp 2245. La conductividad eléctrica se determinó en un electrométrico Hanna Instruments Hi26011, el nitrógeno total se hizo por la técnica Kjeldahl en un equipo GEOLAT de 12 parillas y las grasas y aceites se determinaron por extracción en un equipo soxthel utilizando la misma bomba y balanza analítica mencionada. Todos los procedimientos se hicieron de acuerdo con las normas de SEMARNAT indicadas en la Tabla 2.1.

La determinación de los sólidos presentes en el agua residual se realizó de acuerdo a la norma SEMARNAT NMX-AA-034 SCFI-2001.

Tabla 2.1 Normas utilizadas para la caracterización de los diferentes parámetros del agua residual

Parámetros	SEMARNAT- Método o Técnica
pH (unidad)	NMX-AA-008-SCFI-2011
Conductividad Eléctrica ($\mu\text{S}/\text{cm}$)	NMX-AA-093- SCFI-2000
ST, SST, SDT (mg/L)	NMX-AA-034-SCFI-2001
DQO (mg/L)	NMX-AA-030-SCFI-2011
DBO (mg/L)	NMX-AA-028-SCFI-2001
Nitrógeno Total	NMX-AA-026-SCFI-2010
Grasas y aceites	NMX-AA-005-SCFI-2013

DBO: Demanda Bioquímica de Oxígeno; DQO: Demanda Química de Oxígeno; ST: Sólidos Totales; SST: Sólidos suspendidos totales; SDT: Sólidos disueltos totales

2.2 Preservación de las Bacterias en medio de Tioglicolato con resazurina

Las bacterias *Clostridium bifermentans* y *Clostridium sordelliis*, debido a su alta capacidad exoelectrogénica, se utilizaron para la generación de energía mediante la CCM, para la obtención de biohidrógeno solo se utilizó *Clostridium bifermentans* en la CEM. Para mantenerlas viables, dichas bacterias se resembraron en un medio de cultivo hecho a base de tioglicolato- resazurina mediante la técnica de Hungate modificada (Terry *et al.*, 1994) (Anexo1), esto se realizó una vez al mes durante toda la investigación. La temperatura y el tiempo de incubación fueron de 32 °C y 24 h respectivamente de acuerdo a las condiciones establecidas en la tesis de maestría realizada en el grupo del Dr. Jorge Humberto Serment del ININ (Lara, 2004). Después se mantuvieron en refrigeración a 4 °C.

2.3 Cinética de la fase exponencial de la curva de crecimiento microbiano

La curva del crecimiento microbiano representa la evolución del número de células presente en un cultivo microbiano líquido a lo largo del tiempo de estudio. Se estudia el número de células por mililitro de un cultivo de volumen y una cantidad de nutrientes limitada. En la curva de crecimiento se diferencian cuatro fases: la fase de retraso o de latencia, la fase de crecimiento exponencial o logarítmico, la fase estacionaria y la fase de muerte celular.

La fase de crecimiento exponencial o logarítmica es la que presenta mayor interés por ser la fase en la que el incremento del número de microorganismos es máximo. Durante esta fase el tiempo de generación de los microorganismos (el tiempo que la población de microorganismo necesita para duplicar su número), se mantiene constante.

Para realizar la representación gráfica de la bacteria *C. sordelliis* y *C. bifermentans* se realizó lo siguiente: el número de bacterias inicial del cultivo por mL, duplicará el número de células cada hora durante un periodo de estudio de 336 h.

En la Figura 2.2 se muestran 2 ejemplos donde permite observar la relación entre las abscisas (tiempo) y las ordenadas (logaritmos del número de células):

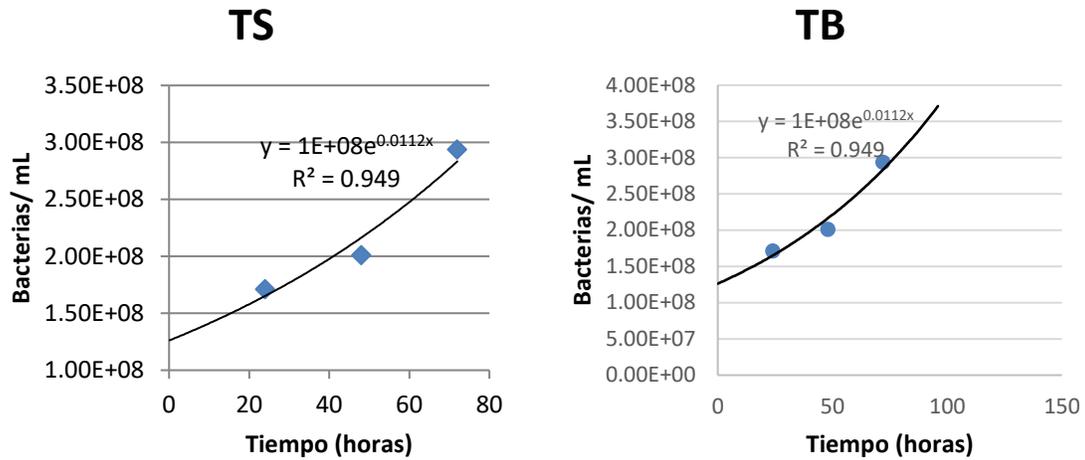


Figura 2.2 Curva de crecimiento entre el logaritmo del número de células y el tiempo.

La pendiente es el radio entre el incremento de y el incremento de x de la curva. La pendiente de la gráfica logarítmica natural descrita en la ecuación 9, permitirá relacionar el tiempo (t) con el número de bacterias en la muestra.

$$Pendiente = \frac{\Delta y}{\Delta x} = \frac{\ln(N_f) - \ln(N_o)}{(t_f - t_o)} \quad \text{Ecuación (9)}$$

Una vez calculada la pendiente, podemos relacionar los valores de X y de Y a través de una ecuación lineal (Ecuación 10) del tipo:

$$Y = ax + b \quad \text{Ecuación (10)}$$

Las variables de la ecuación lineal son los siguientes:

Y = ln del número de células (en función de la gráfica).

a= es la pendiente (que a su vez depende de la gráfica).

X =es el tiempo (t).

b =es igual a cero en nuestros ejemplos, pues las tres gráficas pasan por el punto (0,0)

Consecuentemente en la ecuación 11 se obtuvo las relaciones lineales para nuestras gráficas:

$$\ln(\text{células}) = \text{pendiente} * \text{tiempo} \quad \text{Ecuación (11)}$$

Como se ha indicado, el tiempo de generación de la fase exponencial de crecimiento es constante durante toda la fase, y también lo es la pendiente. Estos dos parámetros están estrechamente relacionados. Donde la pendiente depende de la gráfica, mientras que el tiempo de generación es un valor que no cambia con la representación gráfica.

En la ecuación 12 y para cada una de las gráficas, se han relacionado la pendiente y el tiempo de generación:

$$\text{Pendiente} = \frac{\Delta y}{\Delta x} = \frac{\ln(2N) - \ln(N)}{g} \quad \text{Ecuación (12)}$$

2.4 Ensamblado y operación de las Celdas de Combustible Microbianas (CCM)

Las CCM de una cámara, son de acrílico de un cm de grosor y con dimensiones de 4 X 4.5 X 6 cm. un volumen total de 108 cm³ y un volumen de trabajo de 80 cm³; constan además de 2 electrodos de trabajo y de una membrana de intercambio iónico.

- a) Electrodo de trabajo:** La tela de carbono de 3 X 3 cm Twill 2x2, para hacer los electrodos, tienen un tamaño de filamento 3 k y 0.25 mm de espesor, fueron tratadas para eliminar cualquier residuo orgánico, con una solución de HCl 1 M con agitación constante durante una hora, luego se transfirieron a una solución de NaOH 1 M, controlando la agitación el mismo tiempo (Lara, 2004); después se enjuagaron con agua desionizada y se esterizaron en autoclave a una temperatura de 120 °C durante 20 min y se dejaron secar.

- b) Membrana de intercambio iónico:** La membrana utilizada fue Ultrex CMI 7000 de 3.5 X 3.5 cm, esta membrana es estable tanto química como físicamente y tiene una alta eficiencia para permear cationes, sin embargo, requirió un pretratamiento para la activación y expansión de la misma, para ello se colocó en una solución de NaCl al 2% en peso a 37 °C por 2 h (Chang *et al.*, 2004).
- c) Ensamblado de las celdas:** se utilizaron los cubos de acrílico de 2 compartimentos, previamente utilizados por Lara, pero en este caso los substratos con o sin bacterias se colocaron sólo en uno de los cubos. Los electrodos de fibra de carbono se colocaron, uno en la parte media de las soluciones y el otro a un costado del cubo junto a la membrana. Ambos electrodos fueron acoplados con alambre de acero inoxidable. La membrana se acopló en la pared externa del cubo conteniendo la solución, el cual tiene un orificio de 3 cm y se unió con otro cubo con las mismas características para poder sellarla herméticamente con ayuda de tornillos de acero y tapones de goma, de esta forma se construyeron 10 celdas. Las pruebas de hermeticidad, para cada una de ellas se hicieron con 100 mL de agua y se dejaron reposar durante tres días.
- d) Preparación de las celdas:** Previo al inicio de los procesos, las CCM se esterilizaron con alcohol etílico al 70%, en la Figura 2.3 se presenta el ensamblado de la CCM, 10 experimentos se hicieron por duplicado en un ambiente estéril. Para trabajar con las bacterias *C. sordellii* y *C. bifermentans*, el agua residual se esterilizó en autoclave, para eliminar las bacterias nativas y obtener el voltaje proveniente solo de las bacterias electrogénicas.

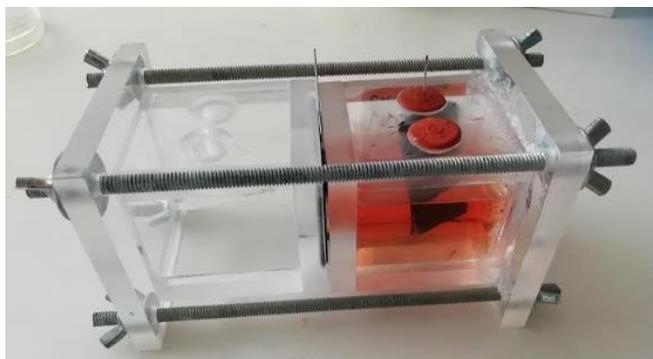


Figura 2.3 CCM de una cámara

En cada dos celdas se agregaron 80 mL de los siguientes sustratos: 1) medio Ravot sin inocular (indicador negativo); 2) agua residual sin esterilizar con medio Ravot (ARSE + MR); 3) agua residual esterilizada inoculada con la bacteria *C. bifermentans* (AREB) y 4) otra inoculada con la bacteria *C. sordellii* (ARES); 5) agua residual sin esterilizar con los microorganismos nativos (ARSE); 6) agua residual esterilizada con amortiguador de fosfatos inoculada con la bacteria *C. bifermentans* (AREAB) y 7) con la bacteria *C. sordelliis* (AREAS); 8) medio Ravot (Anexo 3) (indicador positivo de los sistemas, conexión, ensamblado y crecimiento de bacterias), inoculada con la bacteria *C. bifermentans* (MRB) y 9) el medio Ravot inoculada con la bacteria *C. sordelliis* (MRS). En todos los casos los sustratos se ajustaron a un pH de 7 y para eliminar el aire de las celdas, se burbujearon con nitrógeno y se sellaron con tapones de goma. La inoculación de las bacterias se hizo con 100 μ L de la solución refrigerada, dejándola alcanzar la temperatura ambiente.

- e) Medición de voltaje:** Las 9 celdas se conectaron al potenciómetro Keithley 2000 meter para la medición de voltajes, con ayuda del software de LabVIEW, este software permitió registrar los voltajes cada 3600 s para cada una de las celdas, en una computadora Acer ASPIRE one 533, durante 8 días de funcionamiento interrumpido de las celdas.

f) Cálculos para obtener la densidad de potencia (ED) y eficiencia coulombica (EC):

- Medición de la corriente eléctrica:

$$I = \frac{V}{R} \quad \text{Ecuación (13)}$$

Donde:

I= corriente en miliamperios

V= voltaje en milivolts

R= resistencia en miliohms

- Medición del poder

$$P = I * V \quad \text{Ecuación (14)}$$

P= potencia eléctrica que se mide en Watts

- Densidad de potencia (DP):

$$DP = P / \text{área de superficie del ánodo} \quad \text{Ecuación (15)}$$

P= potencia

- Eficiencia Coulombica

$$EC = \frac{M \int_{t_0}^t I dt}{F * b * v_{An} * \Delta DQO} \quad \text{Ecuación (16)}$$

donde:

M: peso molecular del oxígeno

$\int_{t_0}^t I dt$: integración de la corriente sobre el tiempo

F= constante de Faraday (96485 C mol e⁻)

b= número de electrones intercambiados por mol de oxígeno

v_{An} = volumen del líquido del ánodo

ΔDQO = cambio en DQO a lo largo del tiempo

g) Análisis de DQO: al final del proceso se tomaron dos muestras de 2 mL cada una para realizar el análisis de DQO que se hizo en la misma forma que para la muestra del agua residual recién obtenida de la planta y se calculó:

- DQO degradado:

$$DQO \text{ deg} = DQO_o - DQO_f \quad \text{Ecuación (17)}$$

DQO_o = Demanda química de oxígeno inicial.

DQO_f = Demanda química de oxígeno final.

- Porcentaje de DQO degradado:

$$\% DQO \text{ deg.} = \frac{DQO \text{ deg.}}{DQO_o} * 100 \quad \text{Ecuación (18)}$$

$DQO \text{ deg.}$ = Demanda química de oxígeno degradado.

DQO_o = Demanda química de oxígeno inicial.

2.5 Ensamblado de las Celdas de Electrólisis Microbiana (CEM).

a) Ensamblado de las celdas: las CEM, se ensamblaron dentro de una cámara de guantes para mantener las condiciones anaerobias. Las mismas cámaras de acrílico de las CCM se utilizaron para las CEM y tanto los electrodos como las membranas fueron de las mismas dimensiones y tratadas en la misma forma. La diferencia entre la CCM y la CEM es que en ésta última el cátodo también se colocó dentro de la misma cámara a una distancia de 1 cm en la Figura 2.4 se presenta el sistema utilizado.

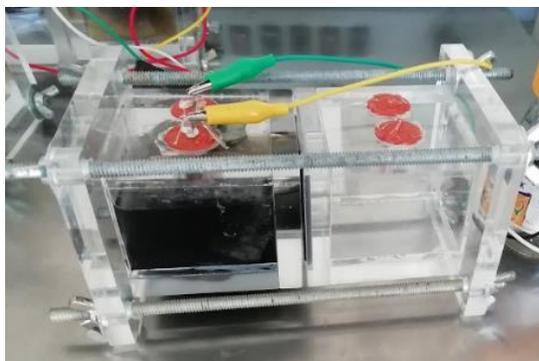


Figura 2.4 CEM de una cámara

- b) **Preparación de las celdas:** Para la obtención de hidrógeno, en cada dos celdas se agregaron los 80 mL de los siguientes sustratos: 1) medio Ravot (Anexo 3), inoculada con la bacteria *C. bifermentans* (MRB) 2) agua residual esterilizada inoculada con la bacteria *C. bifermentans* (AREB) 3) agua residual esterilizada con amortiguador de fosfatos inoculada con la bacteria *C. bifermentans* (AREAB); y 4) agua residual sin esterilizar con los microorganismos nativos (ARSE). Todos los sustratos se ajustaron a un pH de 7 y se incubaron durante 15 días en las mismas condiciones que para las CCM.
- c) **Cuantificación de Hidrógeno:** Para cuantificar el hidrógeno se trabajó en las condiciones establecidas previamente en el equipo del Departamento de Materiales del ININ. Se muestrearon con una jeringa 2 mL de gas, de la parte superior de las celdas, y se inyectaron en un cromatógrafo de gases, en un equipo Gow Mac 580b (Figura 2.5), calibrado previamente, esto se hizo para cada una de las celdas.



Figura 2.5 Cromatógrafo de gases Gow Mac 580

d) Los cálculos se realizaron de la siguiente manera:

Para la producción de bihidrógeno medido en 2 mL de muestra se calculó:

$$\mu\text{moles de H}_2 = 0.0039x \quad \text{Ecuación (19)}$$

donde:

0.0039 = calibración de H₂ del equipo

x= área

$$\text{H}_2 \mu\text{moles totales} = \frac{\text{H}_2 \text{ medido} * \text{vacío de las celdas}}{2} \quad \text{Ecuación (20)}$$

donde:

Biohidrógeno medido= 2 mL

Vacío de la celda: 138 mL

$$\text{H}_2 \text{ (mL)} = \text{H}_2 \mu\text{moles totales} * 22.4 \quad \text{Ecuación (21)}$$

Donde: 22.4 es la conversión de μmoles a mL

e) Determinación de DQO: Para el análisis de DQO, al final del proceso se tomaron dos muestras de 2 mL y la cuantificación y calculos se hizo en la misma forma que para las CCM.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En este apartado se presentan los resultados de los experimentos realizados durante este trabajo de tesis, su análisis y la discusión de los mismos.

3.1 Caracterización de las aguas residuales municipales

Se describen a continuación los resultados obtenidos de la caracterización del agua residual municipal de la planta tratadora de aguas de (SEDAGRO I), muestreada en septiembre de 2018. Todos los límites máximos permisibles utilizados en la discusión corresponden a la norma NOM 001-SEMARNAT-1996.

- a) **pH:** el valor del pH obtenido fue de 7.2 ± 0.08 este valor es inferior a los límites establecidos por la norma NOM 001-SEMARNAT-1996.

- b) **Conductividad:** la conductividad fue medida in situ, debido a que si se expone la muestra a la atmósfera puede causarle cambios y alcanzó un valor de $740 \mu\text{S}/\text{cm}$ a una temperatura de 19.5°C , esta conductividad se debe a los iones presentes en el agua, que conducen la corriente. Para la conductividad no existe una norma vigente para aguas residuales, no hay un punto de comparación en aguas residuales municipales y no existe un límite máximo permisible.

- c) **DQO y DBO:** las concentraciones de DQO y DBO en la muestra de agua fueron: $345.32 \pm 7.34 \text{ mg}/\text{L}$ y $156.25 \pm 5.3 \text{ mg O}_2/\text{L}$, respectivamente. La DQO en el agua residual es mayor que su correspondiente DBO, según Sawyer y colaboradores, debido al mayor número de compuestos cuya oxidación tiene lugar por vía química frente a los que se oxidan por vía biológica (Sawyer *et al.*, 2001). En base al criterio que relaciona la concentración de DQO con la calidad del agua, el valor en la muestra fue mayor a $200 \text{ mg}/\text{L}$, por lo tanto, el agua residual puede ser clasificada como “fuertemente contaminada” (SEMARNAT, 2005).

- d) Sólidos:** La Tabla 3.1, muestra los resultados obtenidos de la caracterización de los sólidos presentes en el agua residual municipal, donde: SDT son los Sólidos Disueltos Totales; ST- Sólidos Totales; SST- Sólidos Suspendidos Totales; SSV- Sólidos Suspendidos Volátiles; STV- Sólidos Totales Volátiles; SDV- sólidos disueltos volátiles y SDF son las cenizas de los sólidos disueltos.

Tabla 3.1 Caracterización de sólidos en agua residual municipal

Agua sin filtrar (mg/L)	Agua filtrada (mg/L)
SST = 387.5 ± 5	SDT= 160 ± 2.5
SSV = 217.1 ± 3	SDV= 36 ± 1.8
RST = 330 ± 5	RSD= 124 ± 2.5
ST = 547.5 ± 2.5	
STV = 253.1 ± 3	

Los límites de la NOM -001- SEMARNAT- 1996 para SST es 200 mg/L., los resultados obtenidos rebasan ligeramente el límite establecido por la norma.

- e) Nitrógeno Total:** la proteína que hay en el agua residual, se determina de manera indirecta midiendo el nitrógeno presente en la muestra. De acuerdo con la norma NMX-AA-026- SCFI-2010, la concentración de nitrógeno total fue de 38.86 mg/L. Este valor es inferior al límite máximo permisible para nitrógeno que es de 60 mg/L.
- f) Grasas y aceites en aguas residuales:** la concentración obtenida por el método soxhlet fue de 85.57 mg/L, aceites y grasas son algunos de los contaminantes que más problemas causan en el tratamiento de aguas residuales, dando lugar a la contaminación del suelo y los cuerpos de agua

donde éstas son descargadas. El límite máximo permisible establecido por la NOM-001-SEMARNAT-1996 es de 15 mg/L. El valor obtenido es 5.6 veces superior a la norma, por lo que sería conveniente realizar una campaña entre la población para disminuir la cantidad de estos contaminantes en el agua, por ejemplo, solidificándolos y depositándolos en un recipiente para su posible reciclado.

g) Coliformes fecales y totales: la cantidad de bacterias coliformes provenientes del intestino humano y de otros animales de sangre caliente es un indicador de contaminación fecal; y los coliformes totales comprenden principalmente de *E. coli* y algunas cepas de *Enterobacter* y *Klebsiella*. El resultado obtenido fue de 390,000 UFC/mL. La gran cantidad de microorganismos en el agua residual permite tener altas expectativas de producción de voltaje en la CCM, debido a la gran diversidad de bacterias coliformes, y algunas bacterias electrogénicas presentes que permiten degradar la materia orgánica y producir voltaje, lo que admite convertir la materia orgánica en energía eléctrica y además degradar los contaminantes del agua residual.

Sin embargo, los resultados rebasan los límites máximos permisibles de 1000 UFC/100 mL de la NOM 003- SEMARNAT-1997 en cuanto a servicio público con contacto indirecto.

Tabla 3.2 Caracterización de las aguas residuales y comparación con los límites establecidos: NOM 001- SEMARNAT-1996.

Parámetros	Valor (mg/L)	NOM
DQO	345.32± 7.2	200
DBO ₅	156.25± 5.3	200
ST	547.5 ± 2.5	-
SST	387.5 ± 5	200
SDT	160 ± 2.5	-
Nitrógeno Total	38.86	60
Grasas y aceites	85.57	15

Los resultados reportados en la Tabla 3.2 muestra que el agua en estudio no cumple con los límites establecidos en la NOM 001- SEMARNAT- 1996, ya que todos los valores a los límites máximos permisibles, con excepción del nitrógeno total.

Tabla. 3.3 pH e intervalo establecido en la NOM 001- SEMARNAT-1996 y medida de conductividad.

Parámetros		NOM
pH	7.2 ± 0.08	7.5- 8.05
Conductividad	740 µS/cm	NA

Los parámetros importantes para el manejo de los SBE son pH, DBO₅ y DQO ya que son los determinantes en el proceso de degradación de materia orgánica y en la generación de energía en la CCM y de hidrógeno en la CEM. El valor reportado en la Tabla 3.3 de pH es inferior a los límites establecidos, como este parámetro es muy importante para el crecimiento de las bacterias, fue necesario ajustar su valor a 7, antes de iniciar el crecimiento de las bacterias en los viales y en las Celdas de Combustible Microbianas (CCM) y celda de electrolisis microbiana (CEM).

3.2 Preservación y crecimiento de las bacterias

Hay que recordar que todo se realizó bajo condiciones estériles y anóxicas según lo establecido por Ravot *et al.*, (1995) y Fernández (1981). Una parte medular en este tipo de investigaciones es la preservación de los microorganismos, éstos se sembraron de la manera descrita en la parte experimental, en la Figura 3.1 se muestra uno de los viales con el medio antes de la siembra, el color amarillo, dado por la rezarsurina, confirma que el medio es anóxico. Después del crecimiento de las bacterias, la turbidez del medio confirma el crecimiento de las mismas, aunque después se verificaron con el microscopio óptico, para confirmar que sólo estaban presentes la *C. sordelliis* o *C. bifermentans* y se cuantificaron con la cámara de Petroff Hausser.



Figura 3.1 Medio de tioglicolato con rezarsurina y a la derecha el medio anóxico para la preservación de las bacterias

3.3 Crecimiento de las bacterias *C. sordelliis* y *C. bifermentans* en los diferentes medios.

Ambas bacterias *C. sordelliis* (S) y *C. bifermentans* (B) crecieron en los diferentes cultivos: tioglicolato (T), medio Ravot (MR), Aguas residuales esterilizadas (ARE) y Aguas residuales esterilizadas con amortiguador (AREA), los viales en las que se llevaron a cabo los experimentos se muestran en la Figura 3.2.



Figura 3.2. Viales para el crecimiento de las bacterias *C. sordellii* y *C. bifermentans* en los diferentes medios.

Los datos experimentales del crecimiento de las bacterias en tioglicolato de sodio, que es el medio de conservación de ambas bacterias, se muestran en la Figura 3.3.

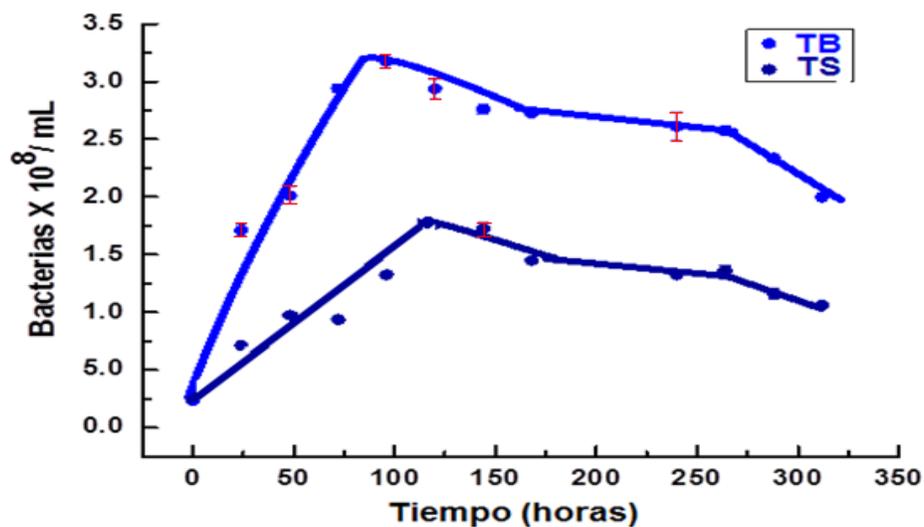


Figura 3. 3. Crecimiento de las bacterias *C. bifermentans* y *C. sordelliis* en el medio de Tioglicolato

La evaluación del crecimiento microbiano en tioglicolato se realizó aplicando logaritmo natural diariamente, durante 11 días. Se observó que el medio es más

favorable para la bacteria *C. bifermentans* obteniendo el mayor crecimiento de 3.25 bacterias X10⁸/ mL en un tiempo de 130 h, mientras que con la bacteria *C. sordelliis* hubo menos crecimiento siendo de 1.75 bacterias X10⁸/ mL en 120 h y en los medios restantes de control y de agua residual se presentan en la Figura 3.4. El pH inicial para todos los experimentos fue de 7 y se mantuvo estable durante todos los experimentos, con excepción del medio Ravot que pasó a 8 con *C. sordelliis* y a 8.5 con *C. bifermentans*. Las barras de error en la figura corresponden a tres experimentos con dos conteos en cada uno de ellos, para cada uno de los medios inoculados con las bacterias mencionadas. Las etiquetas de los diferentes experimentos corresponden a: TB: tlioglicolato inoculada con la bacteria *Clostridium bifermentans*; TS: tlioglicolato inoculada con la bacteria *Clostridium sordelliis*; MRB: medio Ravot inoculada con la bacteria *Clostridium bifermentans*; MRS: medio Ravot inoculada con la bacteria *Clostridium sordelliis*; AREB: agua residual esterilizada inoculada con la bacteria *Clostridium bifermentans* ARES: agua residual esterilizada inoculada con la bacteria *Clostridium sordelliis*; AREAB: agua residual esterilizada con amortiguador inoculada con la bacteria *Clostridium bifermentans* y AREAS: agua residual esterilizada con amortiguador inoculada con la bacteria *Clostridium sordelliis*.

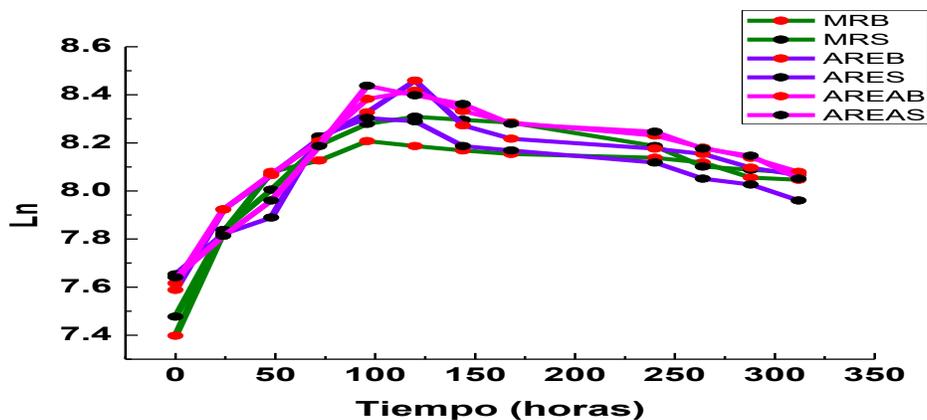


Figura 3.4 Número de bacterias en función del tiempo de los diferentes medios utilizados

En la Figura 3.5 se presentan dos ejemplos de los análisis realizados del crecimiento exponencial para cada una de las bacterias, *C. bifermentans* en medio Ravot y *C. sordelliis* en aguas residuales esterilizadas y con amortiguador.

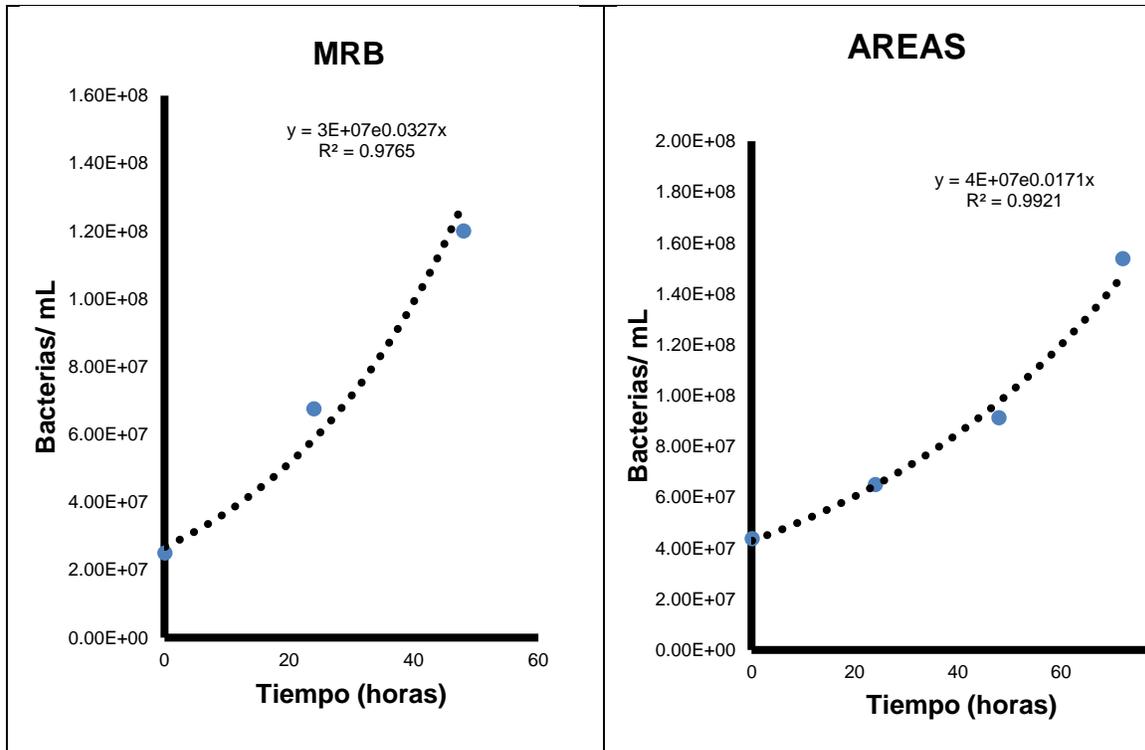


Figura 3.5. Ejemplos del análisis del crecimiento exponencial medio Ravot inoculada con *C. bifermentans* y agua residual esterilizada con amortiguador inoculada con *C. sordelliis*.

De acuerdo con los resultados mostrados en la Tabla 3.4, la velocidad de crecimiento en el medio de cultivo es más lento que en medio de control para la bacteria *C. bifermentans* de 61.9 h a 21.2 h respectivamente. En las aguas residuales con o sin amortiguador los valores son de 35.5 h. y 39.6 h, curiosamente el tiempo de crecimiento es más lento que en el medio de control. En cambio, el tiempo de duplicación para *C. sordelliis* es más lento en medio Ravot que en tioglicolato de sodio de 31.2 h 25.3 h, mientras que en las aguas residuales con y sin amortiguador mantiene un tiempo de duplicación similar de casi 40 h.

Tabla 3.4 Tiempo duplicación de las bacterias en tioglicolato y en los diferentes medios

Cultivo	Tiempo de duplicación de las bacterias (h)	Coficiente de Regresión (%)
TB	61.9	94.90
TS	25.3	91.61
MRB	21.2	97.65
MRS	31.2	96.39
AREB	35.5	95.16
ARES	40.7	95.19
AREAB	39.6	97.19
AREAS	40.5	99.21

3.4 Celdas de Combustible Microbiana

En la Figura 3.6 se muestra el equipo para la medición de los voltajes producidos en los diferentes medios. Las CCM ensambladas se presentan en Figura 3.6 a), cada una de ellas se sometió a las pruebas de hermeticidad, se mantuvieron durante 3 días 100 mL de agua dentro de la celda para verificar que no había fuga de líquidos. Posteriormente se colocó la membrana Ultrex CMI 7000 y los electrodos previamente pretratados y esterilizados. Las celdas se burbujearon con nitrógeno para eliminar el aire, se sellaron con tapones de goma y se conectaron al potencióstato (Figura 3.6 b), para medir los voltajes producidas por las bacterias en las CCM con los diferentes medios se utilizó el software LabVIEW, registrando el voltaje cada 60 minutos (Figura 3.6 c).



Figura 3.6 CCM conectadas al potencioestado Keithly 2000 y registro de los voltajes con el software LabVIEW

3.4.1 Monitoreo de voltaje en la CCM

Para determinar el voltaje producido en las celdas, se utilizaron 8 medios diferentes a un pH de 7. Las celdas se trabajaron durante una semana en el potencioestado. Tras el monitoreo de voltajes hay una estabilidad de iones en el medio o sustrato utilizado después de las 48 h, ya que los electrones se permean en el electrodo (ánodo) y los protones pasan por la membrana Ultrex CMI- 7000 hacia el cátodo. A continuación, se presentan las gráficas obtenidas en la cuantificación del voltaje en los diferentes medios.

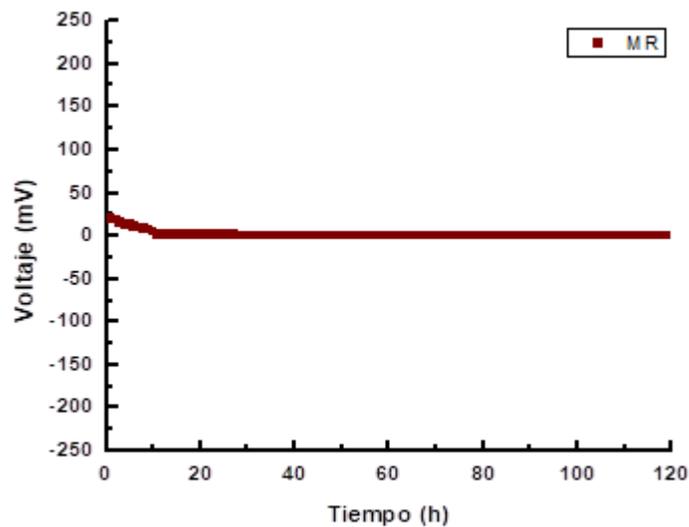


Figura 3.7 Gráfica de la respuesta electroquímica del Medio Ravot sin inóculo.

En la Figura 3.7 se presenta la respuesta de la celda testigo negativo en medio Ravot sin inocular, en el tiempo inicial presentó un incremento de 20 mV, esto se atribuye a la presencia de cargas en el medio, mismas que disminuyeron al no haber una reacción que liberara cargas en los sustratos del entorno.

El desempeño electrogénico de las bacterias *Clostridium bifermentans* y *C. sordelliis* en medio Ravot, funcionando en las CCM se presenta en la Figura 3.8.

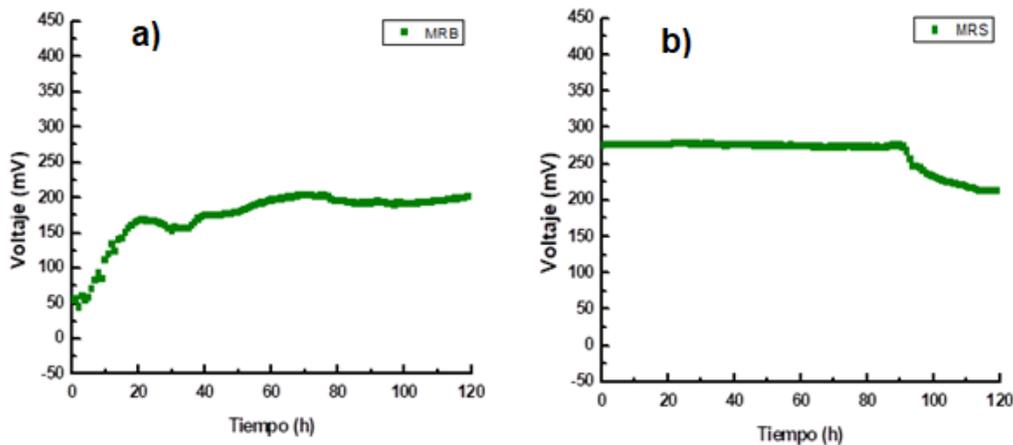


Figura 3.8 Gráficas de voltaje generado en el medio Ravot (MR) inoculadas con las bacterias: a) *C. bifermentans* (MRB) y b) *C. sordelliis* (MRS).

En la Figura 3.8 a) se observa que el voltaje en medio Ravot para *C. bifermentans* inició en 54.26 mV y el valor más alto fue de 203.64 mV a las 70 h. en cambio *C. sordelliis*, Figura 3.8 b) inicio con un voltaje de 275 mV que se mantuvo estable durante 90 h, descendiendo lentamente después y alcanzando un valor de 212 mV, después de 120 h. Este comportamiento no lo sabemos explicar, es como si *C. sordelliis* no hubiera requerido un periodo de adaptación al medio, lo que no se vio en las curvas de crecimiento, (Figura 3.4), o que la cantidad de bacterias inoculadas fue relativamente alta lo que permitió la saturación del medio.

Los resultados obtenidos en agua residual esterilizada inoculada con las bacterias ya mencionadas se muestran en la Figura 3.9.

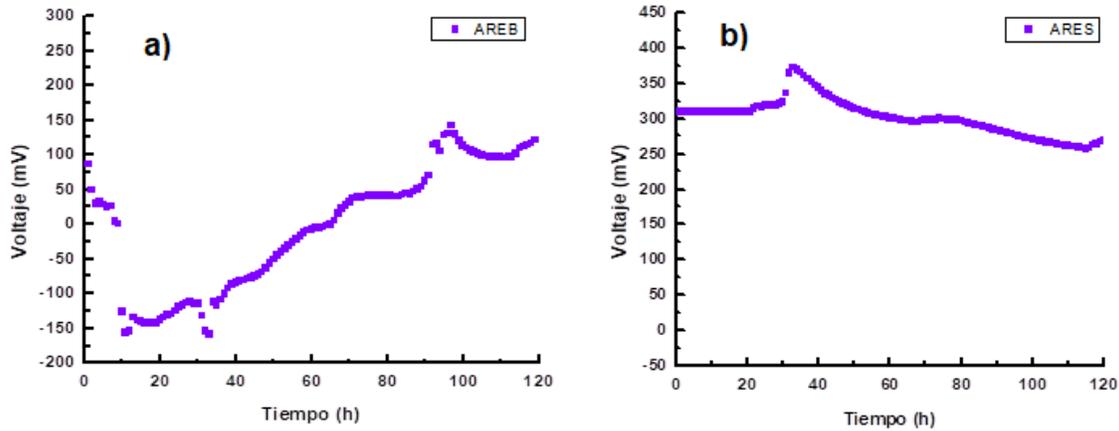


Figura 3.9 Gráficas de la respuesta electroquímica del agua residual esterilizada en CCM inoculadas con: a) *C. bifermentans* (AREB) y b) *C. sordelliis* (ARES)

Allí se observa que al inicio en el agua residual esterilizada *C. bifermentans* al inicio disminuye su voltaje y que hasta después de 20 h. inicia el proceso de transferencia electrónica que se incrementa hasta 150 mV a las 96 h. posteriormente disminuye a 100 mV a las 105 h y se incrementa de nuevo hasta 120 mV a las 120 h. En cambio *C. sordelliis* obtiene voltajes más altos de 371.6 mV a las 33 h, posteriormente estos disminuyen y se estabilizan a 300 mV durante 20 h, con respecto a a) su voltaje máximo fue, donde las bacterias tardan más en degradar la materia orgánica para producir voltaje. Es importante mencionar que no hay reportes a la generación de voltaje en agua residual esterilizada con *Clostridium bifermentans*, ni para las bacterias *C. sordelliis*, ambas bacterias fueron aislada en el ININ y solo se ha reportado su crecimiento en medio Ravot (Serment *et al.*, 2017).

De la misma manera se acondicionaron dos celdas donde se trabajó con agua residual esterilizada con amortiguador inoculada con las bacterias, los resultados se muestran en la Figura 3.10.

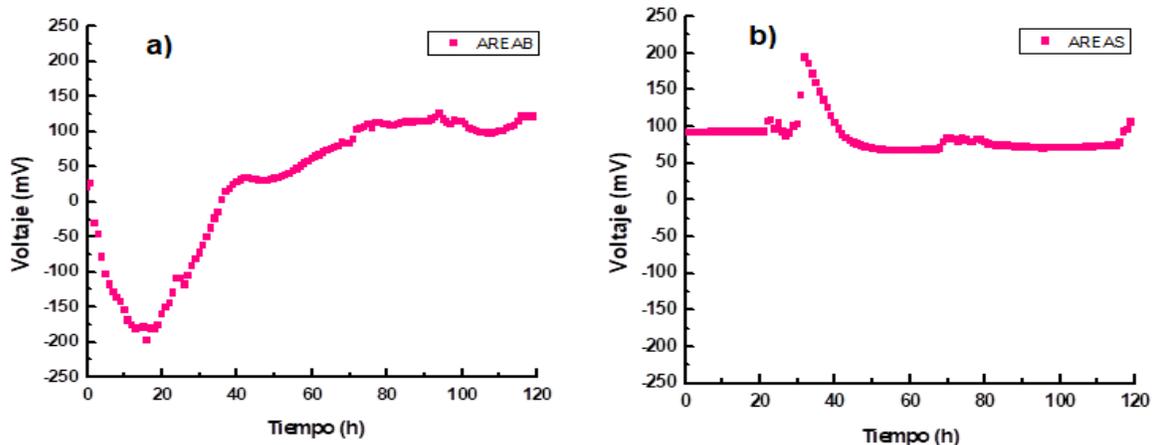


Figura 3.10 Gráficas de los voltajes medidos en el agua residual esterilizada con amortiguador inoculadas con las bacterias: a) *C. bifermentans* y b) *C. sordelliis*

En presencia del amortiguador las aguas residuales esterilizadas generaron un voltaje similar con una diferencia no mayor de 80 mV. La inoculada con la bacteria *C. bifermentans* Figura 3.10 a) generó un valor de 125 mV a las 94 h y con la que fue inoculada con la *C. sordelliis* a las 32 h obtuvo un valor de 194.13 mV. Por otra parte, los datos sugieren que la bacteria *C. sordelliis* se adapta más con amortiguador ya que obtiene mejores voltajes en menor tiempo y la *C. bifermentans* disminuye su producción con el amortiguador aumentando su tiempo para producir menor voltaje. Para este tipo de sustrato y bacterias no hay reportes de generación de voltaje.

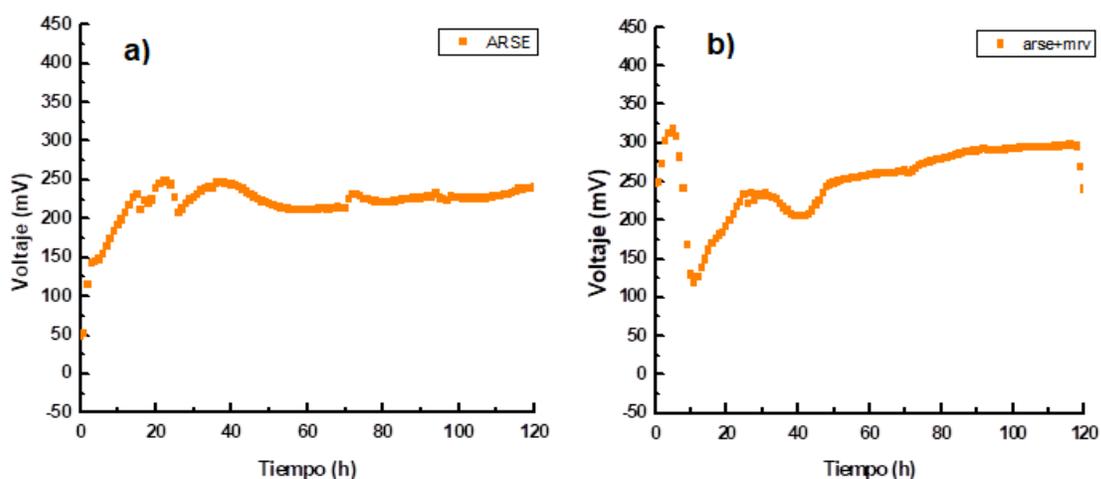


Figura 3.11 Resultados de la respuesta electroquímica de las celdas en agua residual: a) sin esterilizar y b) agua residual sin esterilizar con medio Ravot

La Figura 3.11 presenta los resultados obtenidos de las aguas residuales: a) sin esterilizar con los microorganismos nativos y b) igual que a) y con medio Ravot, en a) se observa un voltaje máximo de 248.37 mV a las 22 h, mientras que en b) se produce un mayor voltaje de 297.37 mV a las 116 h, esto se debe a que las bacterias además de la materia orgánica presente en el agua residual, también tienen carbón orgánico y nutrientes del medio Ravot para degradar, lo que aumenta en aproximadamente en 50 mV la respuesta del medio, con las bacterias electrogénicas presentes en el agua.

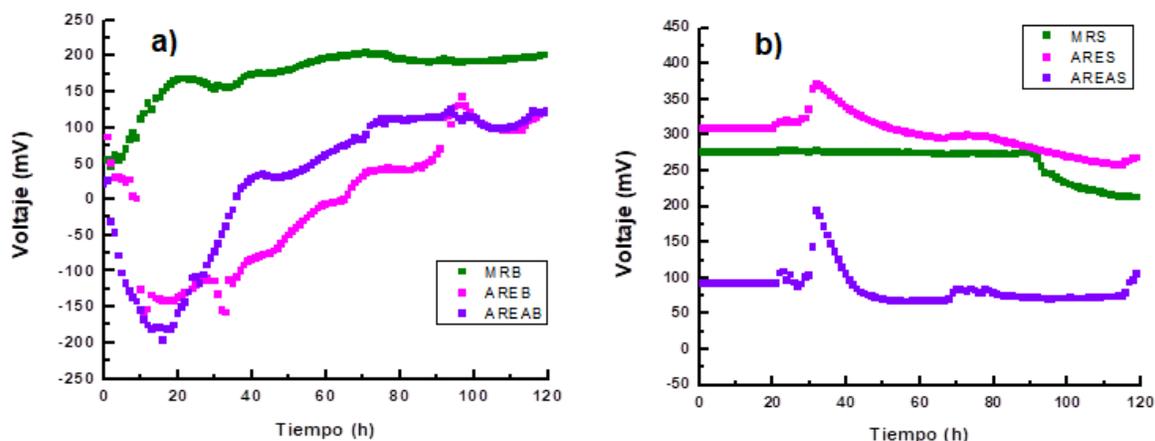


Figura 3.12 Resultados del potenciostato de las celdas inoculadas con las bacterias: a) *C. bifementans* y b) *C. sordelliis*

La Figura 3.12 se realiza una comparación de los voltajes generados en los diferentes medios inoculadas con las bacterias: a) *C. bifementans* y b) *C. sordelliis*, en a) se observa que las bacterias tardan más en crecer y adaptarse en el agua residual esterilizada con y sin amortiguador, esto puede ser debido a que el agua pueda inhibir el crecimiento de las bacterias *C. bifementans* debido a la presencia de elementos químicos, sin embargo, en el medio Ravot tiene los nutrientes necesarios para crecer y mantenerse durante 60 h., mientras que las que son inoculadas con *C. sordelliis*, Figura 3.12 b) actúan mejor en presencia de las aguas residuales con y sin amortiguador generando así mayores voltajes, en este caso el agua residual esterilizada sin amortiguador presentó un voltaje mayor que el del medio Ravot, y un desempeño superior al del agua residual esterilizada con el amortiguador, como si este inhibiera la transferencia electrónica.

El resumen de la cantidad de bacterias y los voltajes de los diferentes medios se reportan en la tabla 3.5

3.5 Densidad de potencia y eficiencia coulombica en la CCM

En la misma Tabla 3.5 se presentan la densidad de potencia obtenida con la ecuación 15 y la eficiencia coulombica calculada con la ecuación 16, ambas descritas la sección 2.4.

Tabla 3.5 Resultados de la CCM

Medios	mV/ Número de bacterias (X10 ⁻⁶)	Voltaje Máximo (mV)	Densidad de potencia (mW/cm ²)	EC (%) (X10 ⁻⁴)
MRB	1.26	203.64 ± 31.15	0.46± 0.01	
MRS	1.36	278.00 ± 12.00	0.85 ± 0.01	
AREB	0.46	130.25 ± 23.70	0.18 ± 0.03	3.88 ± 0.009
ARES	1.84	371.60 ± 17.00	1.53 ± 0.02	5.65 ± 0.005
AREAB	0.48	125.00 ± 81.00	0.17 ± 0.01	1.78 ± 0.007
AREAS	0.72	194.13 ± 81.50	0.41 ± 0.01	2.58 ± 0.046
ARSE	-	248.37 ± 43.23	0.68 ± 0.02	0.12 ± 0.025
ARSE+MR	-	297.37 ± 17.12	0.982 ± 0.05	

- EC: eficiencia coulombica

En general se observa que en todos los medios se obtiene un voltaje superior en relación al número de bacterias con *C. sordelliis*, que con *C. bifermentans*. En las aguas residuales esterilizadas con y sin amortiguador se alcanzó un voltaje mucho mayor en ARES que en AREB. Con el amortiguador no se beneficia el sistema ya que disminuye la producción de voltaje con ambas bacterias.

La densidad de potencia fue baja para todos los medios en especial las que fueron inoculadas con *C. bifermentans*, mientras que con la bacteria *C. sordelliis* presentó un mayor dato en ARES con una EC. de 5.65X 10⁻⁴ %, seguida del ARSE+MR y posteriormente de MRS. Sin embargo, se ha reportado en agua residual una

diferencia de potencia de 0.0408 mW/cm² mucho más elevada a la obtenida y una EC del 96%, durante esta investigación se trabajó una CCM de una cámara a temperatura ambiente sin membrana, sus electrodos fueron; en el ánodo papel grafito y el cátodo de carbón rígido con platino a una resistencia de 10 ohms (German y Jaime, 2011). Serment en colaboración han reportado una eficiencia coulombica en MRS y MRB del 64.3 y 71% con una densidad de potencia de 0.02118 mW/cm² a diferencia del ensamble manejado una celda de dos cámaras; en el ánodo se colocó el medio Ravot y en el cátodo agua desionizada. También se reporta en aguas residuales municipales con las bacterias nativas una EC de 0.0067% en un SBE secuencial de una CCM tipo H con un volumen de 12 L, acoplado 8 electrodos en su interior durante 72 h (Pérez *et al.*, 2017), estas variaciones se deben a que las condiciones en que se realizaron las celdas fueron diferentes, al igual que el tipo de sustrato y bacterias.

3.6 Disminución de DQO en la CCM

En la Tabla 3.6 se muestra los resultados de DQO después del monitoreo de voltaje en las celdas que se llevó a cabo durante 7 días, tomando en cuenta que en su inicio la DQO fue de 344.7 mg/L.

Tabla 3.6 DQO final de las Celdas de Combustible Microbiana.

Sustrato utilizado en la CCM	DQO final (mg/L)	DQO deg. (mg/L)	% DQO deg
ARSE	282.38 ± 3.40	61.62 ± 3.00	18.00
AREB	239.77 ± 4.90	104.93 ± 4.50	30.44
ARES	139.22 ± 21.00	205.47 ± 20.25	59.60
AREAB	126.29 ± 5.80	218.41 ± 5.50	63.36
AREAS	109.59 ± 1.70	235.11 ± 1.30	68.20

Después del tratamiento en la CCM durante 120 h, el ARSE degradó un 18% con las bacterias nativas y se ha reportado la disminución del 71% con una duración de

ciclo de 1.03 días con una CCM tubular (German y Pérez, 2011), así mismo del 91.8% en un SBE tipo H (Pérez *et al.*, 2017). Al esterilizar el agua residual e inocularla con las bacterias, se tiene mejores resultados con la bacteria *C. sordelliis* ya que trabaja mejor con la materia orgánica en aguas residuales alcanzando un 59.6% con agua residual esterilizada, y con amortiguador un 68.2% ya para la bacteria *C. bifermentans* los resultados fueron menores con una diferencia en agua residual esterilizada sin amortiguador del 29.16% y con amortiguador del 4.84%.

3.7 Celda de Electrólisis Microbiana

En la Figura 3.13, se observan las 4 celdas, que se emplearon por duplicado de la CEM, la celda se hizo utilizando una celda de 2 cubos, en una prueba de hermeticidad realizada durante 3 días mostró que no había fugas, posteriormente se manipularon en una cámara de guantes anóxica y de la misma manera que en la CCM se colocaron las CEM, la única diferencia es que ambos electrodos se conectaron en la cámara anódica. En cada dos celdas se agregaron 80 mL de los siguientes sustratos: 1) agua residual esterilizada inoculada con la bacteria *C. bifermentans*; 2) agua residual sin esterilizar con los microorganismos nativos; 3) agua residual esterilizada con amortiguador de fosfatos inoculada con la bacteria *C. bifermentans*; 4) medio Ravot (Anexo 3) (indicador positivo de los sistemas, conexión, ensamblado y crecimiento de bacterias) inoculada con la bacteria *C. bifermentans*. Las celdas se burbujearon con nitrógeno para eliminar el aire, se sellaron con tapones de goma, se conectaron a una pila de 0.75 V y se incubaron a una temperatura de $30 \pm 2^\circ$ C durante 15 días para que después se mida el biohidrógeno mediante el cromatógrafo de gases Gow Mac 580.



Figura 3.13 Celda de Electrólisis Microbiana

3.7.1 Monitoreo de biohidrógeno en la CEM

Para determinar el hidrogeno producido en las celdas, se utilizaron 4 medios diferentes a un pH de 7. Es importante mencionar que abajo de pH 4.7 el medio es altamente desfavorable para la producción de hidrógeno, puesto que inhibe la actividad de la hidrogenasa y otras enzimas involucradas en el proceso (Lay, 2000; Show *et al.*, 2012). Algunas investigaciones muestran que el pH óptimo para la producción de hidrógeno está en un rango de 5.0 a 7.5 (Soares *et al.*, 2010). Las celdas trabajaron durante 13 días a un voltaje de 0.75 V y al final se muestrearon 2 mL de biogás del cubo de la celda con el medio. Se colocó la muestra en el puerto de inyección del cromatógrafo de gases Gow Mac 580. La Figura 3.14 presenta cuatro cromatogramas (a), (b), (c) y (d), obtenidos para la cuantificación del hidrógeno.

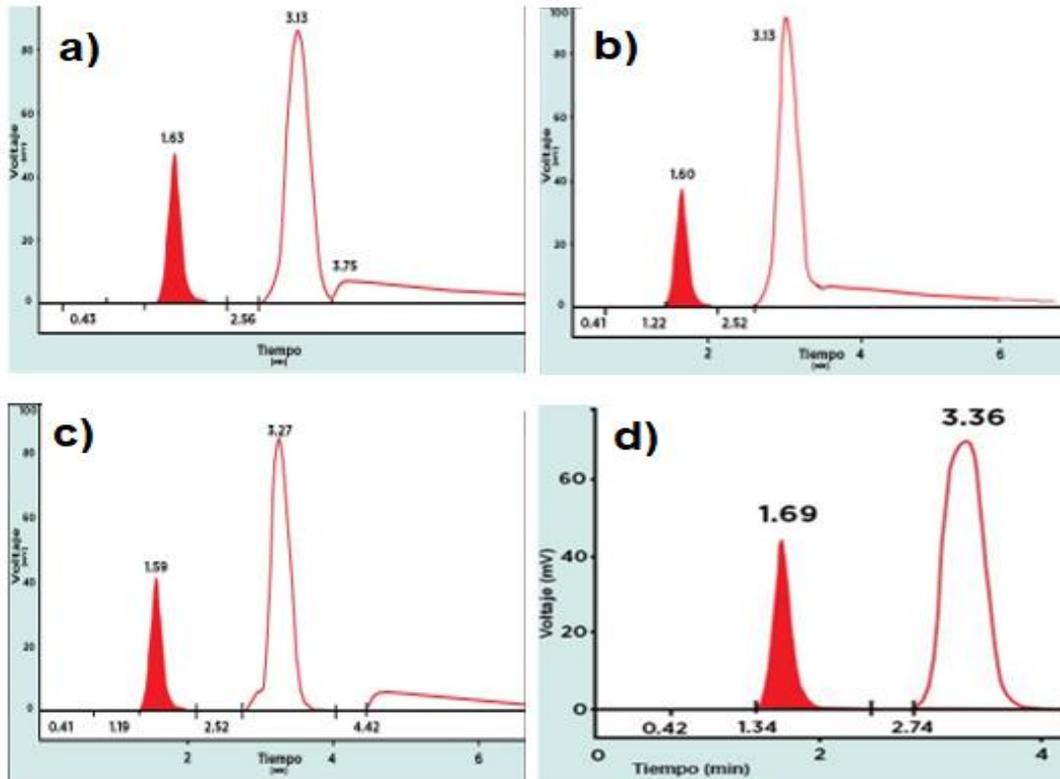


Figura 3.14 Cromatogramas de la parte superior de la celda en los diferentes medios: a) MRB, b) AREB, c) AREAB, d) ARSE

Los resultados obtenidos de los micromoles de hidrógeno encontrados en los 2 mL de la muestra se multiplicaron por el volumen total de la misma, de 138 mL, para calcular los micromoles totales y con esto los mililitros de hidrógeno obtenidos, el segundo pico (a, b, c y d) corresponde al nitrógeno y el pico a un tiempo de retención de 3.75 min, corresponde a dióxido de carbono, que se observa en el medio Ravot (a), agua residual esterilizada, con y sin amortiguador (b) y (c), aparentemente no existe en medio Ravot (a) ni en el agua residual sin esterilizar (d). Hay que remarcar que no se cuantificó el metano y que sería importante, para verificar que la bacteria *C. bifementans* sólo sigue la ruta metabólica para hidrógeno.

En la tabla 3.7 se presentan las áreas obtenidas en el cromatógrafo de gases para cada uno de los medios, la cantidad de hidrógeno en cada una de las muestras, los moles totales de hidrógeno presentes en la celda, teniendo en cuenta el volumen

total de nitrógeno inicial de 138 mL. Además, se calcularon los mL de hidrógeno producido en cada uno de los medios utilizados.

Tabla 3.7 Resultados de biohidrógeno en los diferentes medios en las CEM

Sustrato	Área (mV*s)	Biohidrógeno Medido (en 2 mL) (μmoles)	Biohidrógeno μmoles totales	Biohidrógeno (mL)
MRB	557.70	2.18	150.42	3.37
AREB	573.40	2.24	154.60	3.46
AREAB	580.80	2.27	156.60	3.50
ARSE	631.10	2.46	169.70	3.80

mV*s: milivolts por segundo; μmoles: micromoles

Es importante recordar que las *C. bifermentans* en el agua residual esterilizada, presentó valores ligeramente superiores que en medio Ravot y que el valor más alto se obtuvo en el agua residual sin esterilizar.

3.7.2 Disminución de DQO en la CEM

Jeremiase (2010) mencionan que diversos sistemas bioelectroquímicos utilizan microorganismos para la degradación de materia orgánica, siendo el objetivo principal la producción de hidrógeno, donde la materia orgánica es degradada mediante el metabolismo de microorganismos electroquímicamente activos en protones y electrones.

En la Tabla 3.8 se muestran los resultados de DQO después del monitoreo de hidrógeno en las celdas, se reporta además que en su inicio la DQO fue de 345.317 mg/L.

Tabla 3.8 DQO final de las celdas de electrólisis microbiana.

Sustrato utilizado en la CEM	DQO final (mg/L)	DQO deg. (mg/L)	DQO deg. (%)
ARSE	313.3 ± 1.4	32± 1.4	9.3
AREB	280.6 ± 6.5	64.7± 6.5	18.7
AREAB	248.8 ± 7.3	96.4± 7.3	27.9

El tratamiento de las aguas residuales en las CEM obtuvo una mejor eliminación de DQO en aguas residuales esterilizadas con amortiguador inoculadas con las bacterias *C. bifermentans* con un 96.4 mg/L, de la misma manera que en la CCM degrada mayor materia cuando hay presencia de un amortiguador en el medio.

CONCLUSIONES

Se llegó al objetivo por medio de un SBE utilizando aguas residuales municipales inoculadas con microorganismos, se degradó la materia orgánica y se obtuvieron valores agregados tanto en la CCM al producir voltaje, así mismo en la CEM al generar biohidrógeno.

Las bacterias anaerobias *C. bifermentans* y *C. sordelliis* en el medio de tioglicolato presentan un buen crecimiento, aunque el tiempo de duplicación es 3 veces más rápida para la segunda especie que para la primera.

En general en las CCM, se observa que en todos los medios se obtiene un voltaje superior en relación al número de bacterias con *C. sordelliis*, que con *C. bifermentans*. El amortiguador no beneficia el sistema, pues disminuye la generación de voltaje con ambas bacterias. Sin embargo, presentó una mayor disminución de DQO en aguas residuales esterilizadas con amortiguador e inoculada con la bacteria *C. sordelliis* de 68.2%.

En las CEM con *C. bifermentans*, se obtuvo biohidrógeno, que se midió después de 15 días, en todos los medios el valor se encontró entre 150 y 156 μ moles totales, alcanzando un mejor resultado en agua residual esterilizada con amortiguador y disminuyendo la DQO un 27.9%. Sin embargo, el mayor valor de 170 μ moles fue para el agua residual sin esterilizar, mostrando que hay bacterias generadoras de hidrógeno en dichas aguas, degradando sólo el 9.3% de DQO.

REFERENCIAS

Abudukeremu Kadier, Mohd Sahaid Kalil, Peyman Abdeshahian, K. Chandrasekhar, Azah Mohamed, Nadia Farhana Azman, Washington Logroño, Yibadatihan Simayi, Aidil Abdul Hamid. (2016). Recent advances and emerging challenges in microbial electrolysis cell (MECs) microbial production of hydrogen and value-added chemicals. *Review* 61,501-525.

Aki H., Yamamoto SH., Kondo J., Maeda T., Yamaguchi., Murata A., And Ishii I. (2006). Fuel cells and energy networks of electricity, heat, and hydrogen in residential areas. *International Journal of Hydrogen Energy*. Vol. 31, pp 967–980.

Allen R. y Bennetto H. (1993). Microbial fuel cells: electricity production from carbohydrates, *Appl. Biochem. Biotechnol.* 39:27-40.

Aelterman P., Rabaey K., Clauwaert P. and Verstraete W. (2006). 'Microbial fuel cells for wastewater treatment', in *Water Science and Technology*. Vol. 54 pp 9-15.

Angenent L., Karim K., Dahhan M., Wrenn B. Y. Domínguez R. (2004). Production of bioenergy and biochemicals from industrial and agricultural wastewater. *Trends in Biotechnology*, 22, 477-485.

APHA, AWWA, WPCF. (1975). Standard methods for the examination of water and wastewater. 14th edition. American public health association. Washington. 1193 P

Bagg A., J.B. Neilands. (1987). Molecular mechanism of regulation of siderophore-mediated iron assimilation. *Microbiol Rev.* 51: 509-518.

Barcélo, Damiá, y María J. (2007). Contaminación y calidad química del agua: el problema de los contaminantes emergentes. Panel Científico- Técnico de

seguimiento de la política de aguas. Instituto de Investigaciones Químicas y Ambientales-CSIC. Barcelona.

Bolong N. (2009). A review of the effects of emerging contaminants in wastewater and options for their removal. *Desalination*. Vol. 239. p. 229-246.

Bond D.R., Holmes D.E., Tender L.M., and Lovley D.R. (2002). Electrode-Reducing Microorganisms That Harvest Energy from Marine Sediments. *Science*, 295(5554), 483-485.

Bond D.R. and Lovley D.R. (2003). Electricity Production by *Geobacter sulfurreducens* Attached to Electrodes. *Applied and Environmental Microbiology*, 69, 1548-1555. <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.69.3.1548-1555.2003>.

Borole A. P., C. Y. Hamilton, T. Vishnivetskaya, D. Leak y C. Andras. (2009). Improving power production in acetate-fed microbial fuel cells via enrichment of exoelectrogenic organisms inflow-through systems, *Biochemical Engineering Journal*: 48 (1), 71-80.

Brentner LB, Peccia J, Zimmerman JB. (2010). Challenges in developing biohydrogen as a sustainable energy source: Implications for a research agenda. *Environ Sci Technol*. 44:2243-2254.

Brewer J. H. (1940). Clear liquid mediums for the aerobic cultivation of anaerobes. *J. Amer. Med. Ass.* pp 115- 598.

Bullen R. A., Arnot T. C., Lakeman J. B., Walsh F. C. (2006). Biofuel cells and their development. *Biosens. Bioelectron*. Vol. 21: 2015-2045.

Carter. (2010). The role of toxin A and toxin B in *Clostridium difficile*-associated disease: Past and present perspectives. 1(1):58-64

Catalán Lafuente y Ríos Catalán Alonso. (1987). Caracterización y calidad de sus aguas. Ed. Dihidro, Zamora. 264 pags.

Chang I. S., Jang J. K., Gil G. C., Kim M., Kim H. J., Cho B. W. and Kim B. H. (2004). Continuous determination of biochemical oxygen demand using microbial fuel cell type biosensor. *Biosens. Bioelectron.* 16: 163-177.

Cheng S., Liu H., Logan B. (2006). Increased Power generation in a continuous flow MFC with advective flow through the porous anode and reduced electrode spacing. *Env. Sci. Technol.* 40: 2426-2432.

Conway B. E. and Jerkiewicz G. (2002). Nature of electrosorbed H and its relation to metal dependence of catalysis in cathodic H₂ evolution. *Solid State Ionics.* 150(1-2):93-103

Corbella C., Marianna G., and Puigagut J. (2008). Vertical redox profiles in treatment wetlands as function of hydraulic regime and macrophytes presence: Surveying the optimal scenario for microbial fuel cell implementation. *Science of The Total Environment*, 473-474, 754-758.

Daday A., Platz R., and Smith G. (1977). Anaerobic and aerobic hydrogen gas formation by the blue-green alga *Anabaena cylindrica*. *Applied and Environmental Microbiology.* 34(5), 478-483.

Dana W. Kolpin. (2002). Pharmaceuticals, hormones, and other organic wastewater contaminants in US streams, 1999-2000: a national reconnaissance. *Environmental Science and Technology.* Vol. 36. p.1202-1211.

Di Salvo E. A. y Videla H. A. (1979). Relation between biological parameters and the bioelectrochemical fuel-cell response, *Journal of Electroanalytical Chemistry.* 104(C):185-195.

DSMZ. (2014). Leibniz Institute. German collection of microorganisms and cell cultures. Catalogue Human and Animal Cell Line.

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

Dutta D. DE D., Chauduri S. and Bhattacharyas S. (2005). Hydrogen production by Cyanobacteria. Review. *Microbial Cell Factories*. Vol 4. pp 36-44.

Escapa A., Lobato A., Garcia D.M., Moran A. (2012). Hydrogen Production and COD Elimination Rate in a Continuous Microbial Electrolysis Cell: The Influence of Hydraulic Retention Time and Applied Voltage. *Environ Prog Sustain Energy*. 00, 00, DOI 10.1002/ep.

Fan Y., E. Sharbrough y H. Liu. (2008). *Quantification of the internal resistance distribution of microbial fuel cells*, *Environmental Science & Technology*: 42 (21), 8101-8107.

Fernández Escartín, E. (1981). *Microbiología Sanitaria Agua y alimentos*. Vol. 1. Ed. Universidad de Guadalajara, México. Vol. 42(9) :724-728. 7.

Germán Buitrón y Jaime Pérez. (2017). Producción de electricidad en celdas de combustible microbianas utilizando agua residual: efecto de la distancia entre electrodos. *Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas*. 14(1):5-11.

Gil-Carrera L., Escapa A., Moreno R., Morán A. (2013). Reduced energy consumption during low strength domestic wastewater treatment in a semi-pilot tubular microbial electrolysis cell. *J. Environ. Manage*. 122. pp 1–7.

Gogate, Parag and Pandit, Aniruddha. (2004). A review of imperative technologies for wastewater treatment I: oxidation technologies at ambient conditions. En: *Advances in Environmental Research*. Vol. 8. p. 501–551.

Gorby Y. A., Yanina S., Mc Lean J. S., Rosso K. M., Moyles D., Dohnalkova A., Beveridge T. J., Chang I. S., Kim B. H., Kim K. S., Culley D. E., Reed S. B., Romine M. F., Saffarini D. A., Hill E. A., Shi L., Elias D. A., Kennedy D. W., Pinchuk G., Watanabe K., Ishii S., Logan B., Nealson K. H. and Fredrickson J. K. (2006). Electrically conductive bacterial nanowires produced by *Shewanella oneidensis* strain MR-1 and other microorganisms. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Vol 103. pp 11358-11363.

Harnisch F. and Schröder U. (2010). From MFC to MXC: chemical and biological cathodes and their potential for microbial bioelectrochemical systems. *Chem Soc Rev*. 39:4433–4448.

Hau H. H. and Gralnick J.A. (2007). Ecology and biotechnology of the genus *Shewanella*. *Annu. Rev. Microbiol*. Vol 61. pp 237-258.

Henríquez D. (2010). Presencia de contaminantes emergentes en aguas y su impacto en el ecosistema. Estudio de caso: productos farmacéuticos en la cuenca del río Biobío, región del Biobío, Chile. Tesis, Santiago de Chile.

He Z., Minteer S.D., Angenent L. (2013). "Electricity generation from artificial wastewater using an up flow microbial fuel cell". *Environmental Science and Technology* 39, 5262–5267.

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

Hernández D.C. (2008). Detection of *Salmonella* and fecal coliforms in water for agricultural use destined to melon "Cantaloupe". *Agricultura técnica en México*. 34(1). pp.75-84.

Huang L., J. M. Regan y X. Quan, (2011). Electron transfer mechanism, new applications, and performance of biocathode microbial fuel cells, *Bioresource Technology*. 102: 316–323.

Jeffries T., Timourian H. and Ward R. (1978). Hydrogen production by *Anabaena cylindrica*: Effects of varying ammonium and ferric ions, pH, and light. *Applied and Environmental Microbiology*. Vol. 35, N°4, pp 704-710.

Jeremiassen D. P. B. T. B. Strik, Hamelers H. V. M., A. Ter Heijne T. H. J. A. Sleutels A. W. and C. J. N. Buisman. (2010). New applications and performance of bioelectrochemical systems. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 85: 1673-1685.

Jeremy R., Clark, Marcus Ludwig, Oliver Lenz, Kylie A. Vincent, James A. Cracknell, Bärbel Friedrich and Fraser A. Armstrong. (2006). "Electricity from low-level H₂ in still air an ultimate test for an oxygen tolerant hydrogenase", *Chemical Communications*, 5033 – 5035.

Johnson, Andrew and Sumpter, John. (2001). Removal of endocrine-disrupting chemicals in activated sludge treatment works. *Environment Science Technology*. Vol. 35, N° 24, p. 4697-4703 136.

Kadier A., Abdeshahian P., Simayi Y., Ismail M., Hamid A., Kalil M. (2015). Grey relational analysis for comparative assessment of different cathode materials in microbial electrolysis cells. Vol 90, pp 1556–62.

Kapdani I. and Kargi F. (2006). Bio-hydrogen production from waste materials. Review. *Enzyme and Microbial Technology*. Vol. 38, 569-582.

Kiely P. D., J. M. Regan and B. E. Logan. (2011). The electric picnic: Synergistic requirements for exoelectrogenic microbial communities. 22(3):378-85.

Kim J., Min B. and Logan B. (2005). Evaluation of procedures to acclimate a microbial fuel cell for electricity production. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 68: 23-30.

Kovács K. L., Bagyinta Cs., Bodrossy L., Csaki R., Fodor B., Gyorfi K., Hanczar T., Kalman M., Osz, J., Perei K., Poliak B., Rakhely Takaks M., Toth A., Tuzs, J. (2000). Recent advances in biohydrogen research. *European Journal of Physiology.* 439: 81-83.

Lalaurette E., Thammannagowda S., Mohagheghi A., Maness P.C., Logan B.E. (2009). Hydrogen production from cellulose in a two-stage process combining fermentation and electrohydrogenesis. *Int. J. Hydrogen Ener.* 34, 6201-6210.

Lara C. L. (2017). Diseño de un ánodo modificado con nanopilares de óxido de zinc y nanopartículas de oro para su empleo en celdas fotoelectroquímicas. Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma del Estado de México, Toluca, México.

Lara R. E. A. (2004). Producción de electricidad a partir de microorganismos del río Lerma. Tesis de Maestría. Universidad Autónoma del Estado de México, Toluca, México.

Lay J. (2000). Modeling and optimization of anaerobic digested sludge converting starch to hydrogen. *Biotechnology and Bioengineering*, 68, 269-278

Levin, Pitt L., and Love M. (2004). Biohydrogen production: prospects and limitations to practical application. *International Journal of Hydrogen Energy.* Vol. 29, 173-185.

Lin, C. Y Lay, Chang. (2004). Effects of carbonate and phosphate concentrations on hydrogen production using anaerobic sewage sludge microflora. *International Journal of Hydrogen Energy*, 29, 275-281

Liu H., Ramnarayanan R., Logan B. (2004). Production of electricity during wastewater treatment using a single chamber microbial fuel cell. *Env. Sci. Technol.* 38: 2281-2285.

Liu W., Wang A., Sun D., Ren N., Zhang Y., Zhou J. (2012). Characterization of microbial communities during anode biofilm reformation in a two-chambered microbial electrolysis cell (CEM). *J. Biotechnol.* 157, 628-632.

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

Lovley D. R. (2008 b). Extracellular electron transfer: wires, capacitors, iron lungs, and more. *Geobiol.* 225-31.

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

Logan B. E. (2006). Microbial fuel cells. Methodology and technology, *Environmental Science and Technology*; 40 (17), 5181- 5192.

Logan E., Hamelers B., Rozendal R., Schroder U., Keller J., Freguia S., Aelterman P., Verstraete W. and Rabaey K. (2006). Microbial fuel cells: Methodology and technology. *Environ. Sci. Technol.* 40 (17), 5181-5192. DOI: 10.1021/es0605016

Logan B.E., Call D., Cheng S., Hamelers H.V.M., Sleutels T.H.J.A., Jeremiasse A.W., Rozendal R.A. (2008). Microbial Electrolysis Cells for High Yield Hydrogen Gas Production from Organic Matter. *Environ. Sci. Technol.* 42(23), 8639-8640.

Logan B. y E., Rabaey K. (2012). Conversion of wastes into bioelectricity and chemicals by using microbial electrochemical technologies. *Science.* 337:686–690.

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

Lu L., Xing D., Liu B., Ren N. (2012). Enhanced hydrogen production from waste activated sludge by cascade utilization of organic matter in microbialelectrolysis cells. *Water Res.* 46, 1015-1026.

Metcalf. (1995). *Ingeniería de aguas residuales*. Ed. Mc Graw Hill. España. Vol. 1.

Methé B. A., Nelson K. E., Eisen J. A., Paulsen I. T., Nelson W., Heidelberg J., Wu D., Wu M., Ward N., Beanan M. J., Dodson R. J., Madupu R., Brinkac L., Daugherty S. C., DeBoy R. T., Durkin A. S., Gwinn M., Kolonay J. F., Sullivan S. A., Haft D. H., Selengut J., Davidsen T. M., Zafar N., White O, Tran B, Romero C, Forberger HA, Weidman J., Khouri H., Feldblyum T. V., Utterback T. R., Van Aken S. E., Lovley D. R. (2003). Genome of *Geobacter sulfurreducens*: metal reduction in subsurface environments. *Science.* 1967-1969.

Melis A., and Happet T. (2001). Hydrogen production. Green algae as source of energy. *Plant Physiology.* Vol. 127, 740-748.

Min Booki., S. Cheng and B. E. Logan. (2005). Electricity generation using membrane and salt bridge microbial fuel cells, *Water Research.*39, 1675–1686.

NOM-001-SEMARNAT-1996. Límites máximos permisibles de contaminantes en las descargas de aguas residuales en aguas y bienes nacionales. México, D.F.

NOM– 003- SEMARNAT- 1997. Establece los límites máximos permisibles de contaminantes para las aguas residuales tratadas que se reúsen en servicios al público.

NMX-AA-005-SCFI-2013 Medición de grasas y aceites recuperables en aguas naturales, residuales y residuales tratadas.

NMX-AA-008-SCFI-2011 Medición del pH en aguas naturales residuales y aguas residuales tratadas.

NMX-AA-026-SCFI-2010. Medición de nitrógeno total Kjeldahl en aguas naturales residuales y aguas residuales tratadas.

NMX-AA-028-SCFI-2001. Determinación de la Demanda Bioquímica de Oxígeno en aguas naturales residuales y aguas residuales tratadas.

NMX-AA-030-SCFI-2001 DQO. Determinación de la Demanda Química de Oxígeno en aguas naturales, residuales y residuales tratadas.

NMX-AA-034-SCFI-2001. Determinación de sólidos y sales disueltas en aguas naturales, residuales y tratadas.

NMX-AA-093-SCFI-2000. Determinación de la conductividad electrolítica.

Oh S., Min B. and Logan B. (2004). Cathode performance as a factor in electricity generation in microbial fuel cells. *Environ. Sci. Technol.* 38 (18), 4900-4904. DOI: 10.1021/es049422p

Orozco Barrenetxea, Pérez Serrano A., Gonzales Delgado M.N., Rodríguez Vidal, Alfayate Blanco. (2003). *Contaminación Ambiental. Una visión desde la química.* Tomson Eds. Paraninfo S.A. Madrid, España.

Pant D., G. Van Bogaert, L. Diels and K. Vanbroekhoven. (2010). A review of the substrates used in microbial fuel cells (MFCs) for sustainable energy production, *Bioresource Technology*: 101 (6), 1533-1543.

Pérez A., Cajigas Á., Otero A. M. Y González M. (2017). Selección de acondicionadores químicos para el tratamiento anaerobio de aguas residuales del proceso de extracción de almidón de yuca. *Ingeniería de Recursos Naturales y del Ambiente*, 66-74.

Petrovic Mira, González Susana and Barcelo Damiá. (2003). Analysis and removal of emerging contaminants in wastewater and drinking water. En: *Trends in Analytical Chemistry*. Vol. 22, N° 10, p.685-696.

Qiao W., Takayanagi Q., Niu M., Shofie and Y. Li. (2013). Long- term stability of thermophilic methane fermentation treatment of manure and food waste. *Journal of Japon Society Waste Management Experts* 16 (1):44-54.

Vollenweider. (1976). Advances in defining critical loading levels for phosphorus in lake eutrophication. *Memorie dell' Istituto Italiano di Idrobiologia*. vol.33, 1976, pages 53-83.

Rabaey K., Verstraete W. (2005). Microbial fuel cells: novel biotechnology for energy generation. *Trends Biotechnol.* 23: 291-298.

Rabaey K., Boon N., Siciliano S., Verhaege M., Verstraete W. (2004). Biofuel cells select for microbial consortia that self-mediate electron transfer. *Applied Environmental Microbiology* 70(9):5373-82.

Ramírez N., A. Regueiro O. Arias y R. Contreras. (2009). *Espectroscopia de impedancia electroquímica, herramienta eficaz para el diagnóstico rápido microbiológico*. *Biotecnología Aplicada*: 26 (1), 65-71.

Ravot G., Olivier B., Magot M., Patel B., Crolet M., Fardeau M. y García J. (1995). Thiosulfate reduction: a physiological feature shared by members of the Thermotogales. *Applied Environmental Microbiology*. 61: 2053-2055.

Reynolds K. (2002). Tratamiento de Aguas Residuales en Latinoamérica: Identificación del Problema. Recuperado de: <http://www.agualatinoamerica.com/docs/pdf/DeLaLaveSepOct02.pdf>.

Reith J., Wijffels R., and Barten H. (2003). Bio-methane y Bio-hydrogen status and perspectives of biological methane and hydrogen production. Dutch Biological Hydrogen Foundation: 103-123.

Rittmann B. E. (2006). *Microbial ecology to manage processes in environmental biotechnology*, Trends in Biotechnology: 24 (6), 261-266.

Rodríguez Prieto, L. (2012). Treatment of emerging contaminants in wastewater treatment plants (WWTP) effluents by solar photocatalysis using low TiO₂ concentrations. En: Journal of Hazardous Materials. Vol. 211-212. p. 131-137.

Rossner Alfred, Snyder Shane and Knappe Detlef. (2009). Removal of emerging contaminants of concern by alternative adsorbents. En: Water Research. 2009. Vol. 43, p. 3787-3796.

Rosenbaum M., F. Aulenta, M. Villano and L. Angenent. (2011). Cathodes as electron donors for microbial metabolism: Which extracellular electron transfer mechanisms are involved, Bioresource Technology: 324-33.

Rozendal R. A., Hamelers H. V. M., Rabaey K. y Keller., J. (2008). Buisman CJN. Towards practical implementation of bioelectrochemical wastewater treatment. Trends Biotechnol. 26:450–459.

Santoro Catia Arbizzani, Benjamin Erable and Ioannis Ieropoulos. (2017). J. Microbial fuel cells: From fundamentals to applications. University of Toulouse. Department of Chemical and Biological Engineering. 356 (2017) 225e244.

Sawyer, C. (2001). Química para Ingeniería Ambiental. McGraw Hill, Bogotá. p.p. 715

Selemba A.P., Matthew D. Merrill, Bruce E. Logan. (2009). Hydrogen production with nickel powder cathode catalysts in microbial electrolysis cells. International journal of hydrogen energy.35:428-437

SEMARNAT. (2005). Secretaría del Medio Ambiente, Recursos Naturales. Clasificación del agua según su Índice de Calidad. México D.F.

Serment, J., Lara_ E., Becerril k., Suárez S., Ramírez N. (2017). *Detección Y Aislamiento De Microorganismos Exoelectrógenos A Partir De Lodos Del Río Lerma, Estado De México, México*. México: Revista de Contaminación Ambiental. 33 (4) 617-628.

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

Sawyer C. (2001). Química para Ingeniería Ambiental. McGraw Hill, Bogotá. p.p. 715.

Show K.Y., Lee D.J., Tay J.H., Lin C.Y., Chang J.S. (2012). Biohydrogen production: Current perspectives and the way forward. Int. J. Hydrogen Ener. 30, 1-16.

Sinha P. y Pandey A. (2011). An evaluative report and challenges for fermentative biohydrogen production. International Journal of Hydrogen Energy. 36: 7460-7478.

Sleutels T.H.J.A., Hamelers H.V.M., Rozendal R.A., Buisman C.J.N. (2009). Ion transport resistance in Microbial Electrolysis Cells with anion and cation exchange membranes. Int. J. Hydrogen Ener. 34, 3612-3620.

Sleutels Heijne A. T., Buisman C. J. N., Hamelers H. V. M. (2012). Bioelectrochemical systems: an outlook for practical applications. *Chem Sus Chem*. 1012–9.

Soares G. Peixoto, F.R. Albrecht, N.K. Saavedra del Aguila and M. (2010). Zaiat. Potential to produce biohydrogen from various wastewaters”. *Energy for Sustainable Development*. Vol. 14, Issue 2, pp.143-148.

Tadahiro Karasawa, Xingmin Wang, Tsuneo Maegawa, Yoshio Michiwa, and Hiroyuki Kita. (2002). *Clostridium sordellii* Phospholipase C: Gene Cloning and Comparison of Enzymatic and Biological Activities with Those of *Clostridium perfringens* and *Clostridium bifermentans* Phospholipase C, American Society for Microbiology.

Terry L. Miller and M. J. Wolin. (1994). A serum bottle modification of the Hungate technique for cultivating obligate anaerobes. *Applied Microbiology*, Vol. 27, pp 985-987.

Thorley C. M. and Wolf J. (1960). Some Germination Factors of Mesophilic Spore Formers, Spores. Ed. H. O. Halvorson. Minneapolis 15, Min.: Burgess Publishing Co. Minneapolis. 1-23.

Wang C.C., Chang C.W., Chu C.P., Lee D.J., Chang B.V.y Liao C. S. (2003). Producing hydrogen from wastewater sludge by *Clostridium bifermentans*. *J. Biotechnol*. 102 (1), 83-92.

Wang X, Cheng S., Feng Y., Merrill M. D., Saito T., Logan B. E. (2009). Use of carbon mesh anodes and the effect of different pretreatment methods on power production in microbial fuel cells. *Environ Sci Technol* 43(17):6870–6874.

Watanabe K. (2008). Recent Developments in Microbial Fuel Cell Technologies for Sustainable Bioenergy, *Journal of Bioscience and Bioengineering*.

Benemann B.L., Koopman J.C., Weissman D.M., Eisenberg R.P. Goebel. (1980). *Algae Biomass: Production and Uses*, Elsevier pp. 457-459.

Wrana N., Sparling R., Cicek N., Levin D B. (2010). Hydrogen gas production in a microbial electrolysis cell by electrohydrogenesis. *J. Clean. Prod.* 18, S105-S111.

Yi H. y Kelly P. Nevin, Byoung-ChanKim, Ashely E. Franks, Anna Klimes, Leonard M. Tender, Derek R. Lovley. (2009). Selection of a variant of *Geobacter sulfurreducens* with enhanced capacity for current production in microbial fuel cells, *Biosensors and Bioelectronics*: 24 (12), 3498-3503.

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

ANEXOS

Anexo 1: Técnica de Hungate

Para el crecimiento de las bacterias anaeróbicas estrictas *Clostridium bifermentans* y *Clostridium sordelliis* se preparó el medio de cultivo utilizando 2.975 g de tioglicolato con reazurina en 100 mL de agua desionizada. Posteriormente se calentó ligeramente y se agitó hasta que se homogenizó, aproximadamente de 20 a 30 minutos, torna a un color azul cuando el tioglicolato comienza a disolverse y a un color rosa cuando la solución es homogénea y aerobia. La solución se dejó enfriar ya que la temperatura afecta el volumen.

Una vez que está a temperatura ambiente, se colocaron 10 mL en frascos viales los cuales se burbujearon con nitrógeno en presencia de temperatura a fin de eliminar el aire presente en el medio de cultivo, el burbujeo duró aproximadamente 8 min hasta que el medio cambió de un color rosa a un color amarillo, indicando la atmósfera anóxica.

Los viales se retiraron de la parrilla de calentamiento y se dejaron enfriar sin quitar el burbujeo con el nitrógeno hasta que los viales estuvieron a temperatura ambiente, la manguera se retiró del medio líquido, se colocó en cada vial un tapón de goma acompañado de un aro sello de aluminio, posteriormente por medio de una máquina de anillo manual se sellaron.

Los viales esterilizaron a 121°C por 20 min en autoclave. 100 µL de un cultivo previo se tomaron con ayuda de una jeringa de insulina y se inyectaron en los viales previamente preparados. Finalmente, las bacterias se incubaron a una temperatura de 32°C± 1 durante 24 horas y se refrigeraron a 4°C.

Anexo 2: Composición del amortiguador de fosfato

REACTIVO	g/L
$(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)$	1
KH_2PO_4	4.5
K_2HPO_4	10.5

Anexo 3: Medio Ravot (Ravot *et al.*, 1995)

En 1 litro de agua bidestilada y desionizada se agrega:

NH_4Cl	1.0 g
K_2HPO_4	0.3 g
KH_2PO_4	0.3 g
$\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.2 g
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.1 g
Cisteina* HCl	0.5 g
KCl	0.1 g
Acetato de sodio (anhidro)	0.5 g
Extracto de levadura	5.0 g
Biotriptasa	5.0 g
Trazas de elementos minerales (Anexo 4)	0.1 g
Resarzurina	0.001 g

Nota: Ajustar el pH a 7.0 y esterilizar a 120°C por 20 min.

Anexo 4: Solución de minerales traza

En 950 mL de agua bidestilada y desionizada se añade a 15 g de ácido nitriolotriacético, se ajusta el pH a 6.5 con una solución de KOH. Posteriormente se disuelven los siguientes compuestos y se afora a 1.0 L.

MgSO ₄ *7H ₂ O	3.0 g
MnSO ₄ *2H ₂ O	0.5 g
NaCl	1.0 g
FeSO ₄ *7H ₂ O	0.1 g
CoSO ₄ ó CoCl ₂	0.1 g
CaCl ₂ *2H ₂ O	0.1 g
ZnSO ₄	0.1 g
CuSO ₄ *5H ₂ O	0.01 g
AlK(SO ₄) ₂	0.01 g
H ₃ BO ₃	0.01 g
NaMoO ₄ *H ₂ O	0.01 g

Anexo 5: Voltaje en los diferentes medios.

