

# Universidad Autónoma de Baja California



Instituto de Ingeniería



**Maestría y Doctorado en Ciencias e Ingeniería**

**“DESARROLLO DE SENSORES PARA MEDICIÓN EN TIEMPO REAL DE LA CONCENTRACIÓN DE HIDRÓGENO PRODUCIDO EN UN BIO-REACTOR FOTOSINTÉTICO”**

**Tesis Para Obtener El Grado De: Maestro En Ingeniería**

**Presenta:**

**Ana Luisa Reyes Ávila**

**Director de Tesis:**

**Dr. Roumen Koytchev Zlatev**

## Contenido

ÍNDICE DE FIGURAS _____	IV
<b><u>RESUMEN</u></b> _____	<b>1</b>
<b><u>INTRODUCCIÓN</u></b> _____	<b>6</b>
<b>PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA</b> _____	<b>7</b>
<b>JUSTIFICACIÓN</b> _____	<b>21</b>
<b>OBJETIVO GENERAL</b> _____	<b>25</b>
<b>OBJETIVO PARTICULAR</b> _____	<b>25</b>
<b><u>MARCO TEÓRICO</u></b> _____	<b>26</b>
<b>PRODUCCIÓN Y USOS DEL HIDRÓGENO</b> _____	<b>27</b>
PRODUCCIÓN BIOLÓGICA DE HIDRÓGENO _____	32
<i>HIDROGENASA</i> _____	32
<i>NITROGENASA</i> _____	33
MÉTODOS DE PRODUCCIÓN BIOLÓGICA DE HIDROGENO _____	36
BIOFOTÓLISIS DIRECTA _____	36
BIOFOTÓLISIS INDIRECTA _____	37
FOTOFERMENTACIÓN _____	38
FERMENTACIÓN OSCURA _____	39
PRODUCCIÓN INTEGRADA _____	39
FOTOSÍNTESIS EN LA PRODUCCIÓN BIOLÓGICA DE HIDRÓGENO _____	40
FOTOSÍNTESIS ANOXIGÉNICA _____	40

<b>EMPLEO DE SENSORES PARA LA MEDICIÓN EN TIEMPO REAL DE LA PRODUCCIÓN DE HIDRÓGENO</b>	<b>41</b>
EMPLEO DE ELECTRODO REVERSIBLE DE HIDRÓGENO COMO SENSOR	44
EMPLEO DE SENSORES VOLTAMÉTRICOS	47
<b><u>EXPERIMENTAL</u></b>	<b>53</b>
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>54</b>
MATERIALES USADOS PARA LA CONSTRUCCIÓN DE LOS SENSORES Y LA CELDA DE ELECTROLISIS	54
EQUIPOS Y SOFTWARE	55
LA VOLTAMETRIA COMO UN MÉTODO ANALÍTICO	55
LA POTENCIOMETRIA COMO UN MÉTODO ANALÍTICO	56
CALIBRACIÓN DE LOS SENSORES DESARROLLADOS	57
<b><u>RESULTADOS Y DISCUSION</u></b>	<b>60</b>
<b>CARACTERIZACIÓN ANALÍTICA DEL ELECTRODO REVERSIBLE DE HIDRÓGENO</b>	<b>61</b>
<b>SENSOR VOLTAMÉTRICO DE HIDROGENO Y SU CARACTERIZACIÓN ANALÍTICA</b>	<b>68</b>
CARACTERIZACIÓN DEL SENSOR POR UNA CONCENTRACIÓN DEL HIDROGENO SUBIENDO LINEALMENTE.	76
DETERMINACIÓN DEL LÍMITE DE DETECCIÓN DEL SENSOR VOLTAMETRICO.	79

APLICACIONES DE LOS SENSORES DESARROLLADOS EN MONITOREO  
DEL PROCESO DE PRODUCCIÓN BACTERIANA FOTOSINTÉTICA DE  
HIDROGENO \_\_\_\_\_ 81

**CONCLUSIONES** \_\_\_\_\_ **88**

**REFERENCIAS** \_\_\_\_\_ **91**

**ANEXOS** \_\_\_\_\_ **101**

COMPARISON BETWEEN POTENTIOMETRIC AND VOLTAMETRIC SENSORS FOR REAL  
TIME BACTERIAL PHOTOSYNTETIC HYDROGEN PRODUCTION MONITORING \_\_\_\_\_ 103

REAL TIME *IN-SITU* MONITORING OF HYDROGEN PHOTOSYNTHETIC PRODUCTION RATE  
BY *RHODOBACTER CAPSULATUS* \_\_\_\_\_ 104

DISSOLVED HYDROGEN VOLTAMMETRIC PROBE AND ITS APPLICATION FOR  
PHOTOSYNTHETIC BACTERIAL HYDROGEN PRODUCTION RATE EVALUATION \_\_\_\_\_ 105

## Índice de Figuras

<i>Figura 1. La curva de producción del petróleo, como sugirió originalmente M. King Hubbert en 1956</i>	7
<i>Figura 2 Cifras representadas como % de los totales mundiales de reservas, producción y consumos (2009)</i>	8
<i>Figura 3 Cifras representadas como % de los totales mundiales de reservas, producción y consumos (2011)</i>	9
<i>Figura 4. Proyección de demanda de energía para países miembros y no miembros de la Organización Para la Cooperación economía y el Desarrollo.</i>	10
<i>Figura 5. Fotografías microscópicas de la bacteria Rhodobacter Capsulatus</i>	17
<i>Figura 6. Consumo mundial de energía 1990-2035</i>	28
<i>Figura 7. Emisiones de Dióxido de Carbono según el tipo de combustible 1990-2035.</i>	29
<i>Figura 8. Materias primas para la producción de Hidrógeno</i>	30
<i>Figura 9. Estructura de la Nitrogenasa. Componente I confirmado por las subunidades azules y moradas. Componente II compuesto por las subunidades verdes.</i>	35
<i>Figura 10. Modelo de una celda electrolítica para la producción de Hidrógeno</i>	49
<i>Figura 11. Potencial como una función del tiempo en Voltamperometría (Cronoamperometría)</i>	51
<i>Figura 12. Celda electroquímica de tres electrodos</i>	51
<i>Figura 13. Foto de la celda conductométrica aplicada como ERH</i>	61
<i>Figura 14. Esquema del equipo aplicado para la caracterización del RHE</i>	62
<i>Figura 15. Equipo real aplicado para la caracterización del RHE</i>	63
<i>Figura 16. Curva de calibración de RHE como sensor de hidrogeno</i>	64
<i>Figura 17. Curva de generación de H<sub>2</sub> calculada por la aplicación de curva de calibración utilizando el potencial de RHE monitoreado</i>	66
<i>Figura 18. Curva cinética de generación de H<sub>2</sub> construido con el monitoreo de cambios de potencial en el RHE.</i>	67

<i>Figura 19. Sensor Voltamétrico de Hidrógeno - construcción</i>	68
<i>Figura 20. Cuerpo interno del Sensor Voltamétrico de Hidrógeno</i>	69
<i>Figura 21. Componentes del Sensor Voltamétrico de Hidrógeno: Cuerpo de PVC, membrana de polietileno y ácido Clorhídrico</i>	69
<i>Figura 22. Ensamble del Sensor Voltamétrico de Hidrógeno, primera parte</i>	70
<i>Figura 23. Ensamble del Sensor Voltamétrico de Hidrógeno, segunda parte</i>	71
<i>Figura 24. Vista del sensor listo para ser utilizado.</i>	72
<i>Figura 25. Vista del sensor voltamétrico conectado al equipo de medición.</i>	72
<i>Figura 26. Celda utilizada para la generación de hidrogeno y calibración del sensor</i>	73
<i>Figura 27. El hidrogeno generado forma burbujas en el compartimiento catódico</i>	74
<i>Figura 28. Naturaleza del hidrogeno generado en el compartimiento catódico comprobada por fuego</i>	74
<i>Figura 29. Ilustración del funcionamiento del generador 1</i>	75
<i>Figura 30. Ilustración del funcionamiento del generador 2</i>	75
<i>Figura 31. Respuesta del sensor voltamétrico a la concentración</i>	77
<i>Figura 32. La respuesta del sensor voltamétrico durante el experimento con interrupción del corriente</i>	78
<i>Figura 33. Curva de calibración del sensor voltamétrico de hidrógeno</i>	79
<i>Figura 34. La curva del ruido del sensor voltamétrico (la curva del blanco)</i>	80
<i>Figura 35. La respuesta del sensor voltamétrico para concentraron de hidrogeno igual al límite de detección del sensor</i>	80
<i>Figura 36. La respuesta del sensor voltamétrico para concentraciones de hidrógeno. Respuesta lineal del sensor</i>	81
<i>Figura 37. Interacción Lactato-Luz (Bórax). (rojo) 30,000 lux (negro) 8,000 lux</i>	83
<i>Figura 38. Interacción Lactato-Luz (KPi). (rojo) 30,000 lux (negro) 8,000 lux</i>	83
<i>Figura 39. Interacción Lactato-Fe (KPi). (rojo) 200 <math>\mu</math>M (negro) 43 <math>\mu</math>M</i>	84
<i>Figura 40. Interacción Lactato-Fe (Bórax). (rojo) 200 <math>\mu</math>M (negro) 43 <math>\mu</math>M</i>	84
<i>Figura 41. Superficie de Respuestas Fe-Lactato (Borax).</i>	85
<i>Figura 42. Superficie de Respuestas Luz-Lactato (Borax).</i>	86

# RESUMEN

1

## RESUMEN

La generación y empleo de energías han sido base para el desarrollo de las sociedades modernas. Sin embargo, desde finales del siglo XIX, este desarrollo se ha basado en el uso y explotación de fuentes de energía fósil.

El principal problema a los que se enfrenta la Humanidad es el agotamiento de esos combustibles fósiles. El modelo energético, muy dependiente históricamente del petróleo y el carbón, ha empezado a buscar alternativas sostenibles, como son las energías renovables. Otro problema no menos importante es la contaminación del medio ambiente por el uso de los combustibles fósiles. El gas CO<sub>2</sub> producido provoca el llamado “efecto invernadero” que causa el calentamiento global del planeta.

Así, se han publicado diversos estudios en el ámbito de las energías renovables, tales como la eólica, solar, hidráulica submarina, biomasa, etc., así como de dispositivos de almacenamiento de éstas. Gracias a distintos procesos químicos y físicos, el metabolismo de algunos microorganismos permiten la producción de energía y sus vectores, tales como el Hidrógeno el cual es considerado como un potencial sustituto de los combustibles fósiles utilizados actualmente.

Desafortunadamente el Hidrógeno no es fuente primaria de energía, es decir, no es un combustible que se pueda extraer directamente de la

Tierra como por ejemplo el gas natural, petróleo o carbón. Su proceso de obtención es de un costo elevado y sus métodos actuales de producción implican en su mayoría la utilización de combustibles fósiles. Además, junto con el hidrógeno se produce gas CO que tiene un efecto altamente tóxico; y la mezcla de los dos gases, conocida como “el gas de síntesis” se usa en la síntesis de metanol u otros compuestos orgánicos. Por lo tanto su obtención por vías biológicas representa una alternativa a los métodos comerciales utilizados a la fecha.

Existen microorganismos que producen Hidrógeno como resultado de su metabolismo. Por ejemplo, la bacteria fototrófica *Rhodobacter capsulatus* que es comúnmente utilizada para la producción de Hidrógeno a partir de diversas fuentes de carbono, sin embargo la velocidad y el rendimiento de la reacción varían dependiendo de la fuente de carbono utilizada y las condiciones fisiológicas experimentales, tales como la intensidad luminosa, la temperatura, el pH y la composición del medio. Por otro lado, muchos estudios han demostrado que existen algunas cepas mutantes que muestran capacidades de producción de Hidrógeno superior a las registradas en las variedades silvestres.

Se ha demostrado que bajo condiciones idénticas de iluminación y concentración lactato/glutamato del sustrato, se obtienen mayores rendimientos de producción de hidrógeno en reactores planos continuos o semicontinuos que en los reactores cilíndricos, debido a que en los reactores planos la superficie de contacto de las bacterias con la luz es mayor.

La optimización del proceso bacteriano fotosintético de producción de hidrógeno requiere cientos de experimentos, aun si se aplica la metodología del diseño de experimentos, debido del gran número de variables que determinan la velocidad de este proceso, mencionados anteriormente. El único método para evaluar la velocidad de la producción utilizado hasta el momento es la medición del volumen del hidrógeno producido en un periodo fijo del tiempo. Este método requiere el uso de bio-reactores de volúmenes grandes, del orden de varios litros (y respectivamente grandes cantidades de reactivos) para poder medir de manera precisa el volumen del gas hidrógeno producido; además de que los experimentos son muy tardados debidos de la baja productividad de las bacterias.

La aplicación de sensores sensibles de hidrógeno disuelto puede cambiar drásticamente la metodología de la optimización experimental del proceso de producción fotosintética-bacteriana del hidrógeno. La medición en tiempo real de la concentración del hidrógeno producido permutara aplicación de reactores fotosintéticos del rango de mililitros y los experimentos tendrán una duración de algunos minutos para cada una de las combinaciones de los distintos valores de cada una de las variables. Este enfoque permitirá encontrar las condiciones óptimas para producción máxima de hidrógeno a partir de cualquier fuente, habitualmente desechos industriales de industrias alimenticias.

Este trabajo está enfocado al desarrollo y el empleo de dos tipos de sensores: un sensor potenciométrico y un sensor voltamétrico para la medición en tiempo real de la producción de Hidrógeno por vía bacteriana fotosintética. Los dos sensores desarrollados fueron caracterizados analíticamente y comparados uno con otro en condiciones controladas.

# INTRODUCCIÓN

## PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El hombre moderno, el hombre de la tecnología, se caracteriza por utilizar mucha más energía de la que realmente necesita para sus actividades cotidianas. Hoy en día, en los EE.UU. un ser humano utiliza el equivalente a una máquina de 12.000 W en permanente consumo; es decir, ciento veinte veces más que lo que su metabolismo necesita. Consumimos (esto es, quemamos o transformamos) 32.000 millones de barriles de petróleo al año. Hasta la fecha se han quemado prácticamente la mitad de las reservas probadas de petróleo. Por otro lado, según el modelo de Hubbert [1956 Hubbert M.; "Peak Oil"] acerca de la duración de las reservas petroleras, la cantidad de barriles producidos alcanzara un pico máximo para después decrecer a medida que se consumen las reservas, formando una gráfica en campana, como se muestra en la Figura 1.

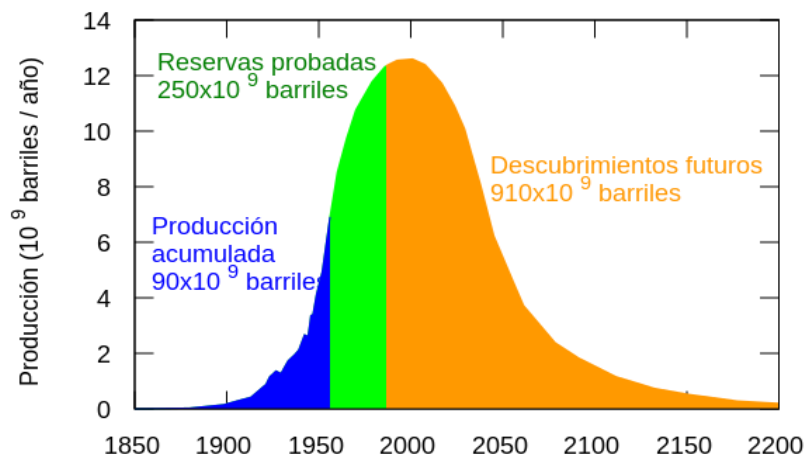


Figura 1. La curva de producción del petróleo, como sugirió originalmente M. King Hubbert en 1956 [1956 Hubbert M.; "Peak Oil"]

El modelo de Hubbert se basa en una ley simple concerniente a la tecnología de los recursos naturales que F. K. North expresa de la manera siguiente: «El ciclo completo de producción de cualquier recurso no renovable, en cualquier región o en el mundo entero, comienza con una producción que sube de cero hacia un máximo; puede haber varios máximos separados por declinaciones temporales; pero finalmente el ciclo se completa con una declinación larga y continua hacia cero, vía la exponencial negativa»

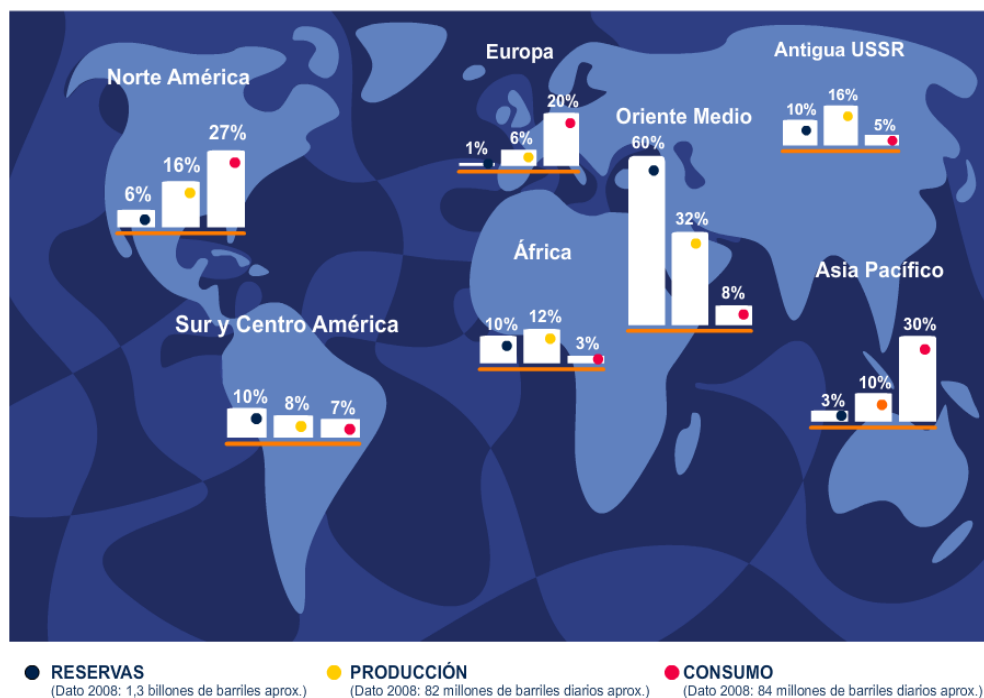


Figura 2 Cifras representadas como % de los totales mundiales de reservas, producción y consumos (2009)

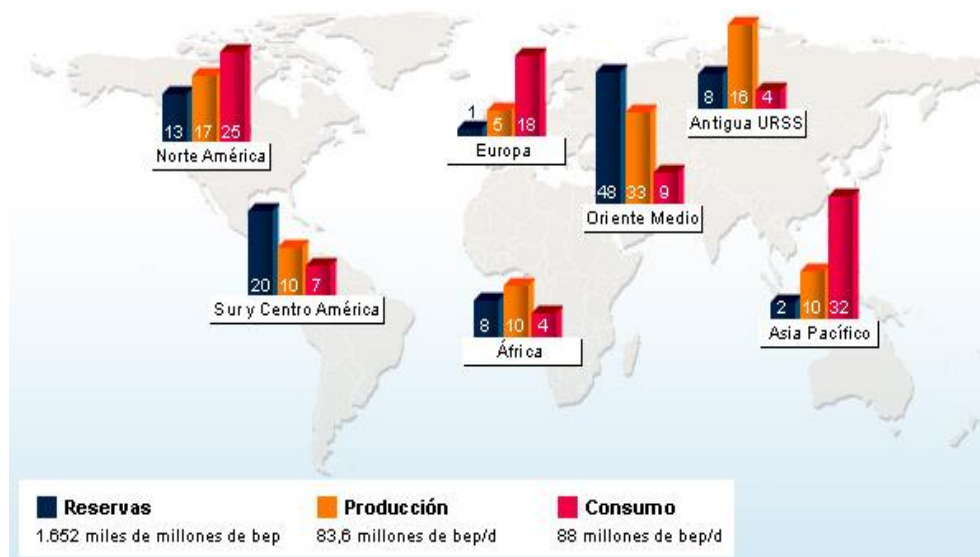
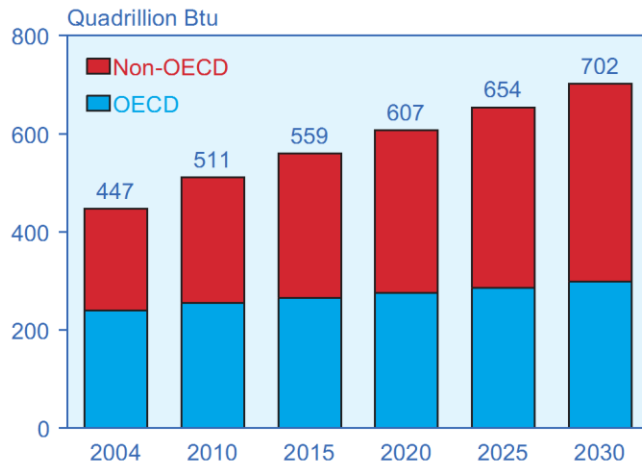


Figura 3 Cifras representadas como % de los totales mundiales de reservas, producción y consumos (2011)

La demanda energética mundial, estimada en unos 10,000 millones de toneladas equivalentes de petróleo (BP, 2004) se ve cubierta en más de un 87% por combustibles fósiles como el carbón, petróleo y gas natural (ver Figuras 2, 3 y 4). Esta dependencia tiene importantes repercusiones tanto económicas como ambientales. Por el lado económico cabe destacar que su producción centralizada en determinadas zonas del mundo está gobernada por factores esencialmente políticos, lo que resulta en precios volátiles y elevados. Así mismo, en ausencia de alternativas viables, el agotamiento de las reservas de petróleo estimadas en no más de 40 años resultará en un encarecimiento progresivo hasta niveles tales que afecten el desarrollo económico global.



Sources: **2004:** Energy Information Administration (EIA), *International Energy Annual 2004* (May-July 2006), web site [www.eia.doe.gov/iea](http://www.eia.doe.gov/iea). **Projections:** EIA, System for the Analysis of Global Energy Markets (2007).

Figura 4. Proyección de demanda de energía para países miembros y no miembros de la Organización Para la Cooperación economía y el Desarrollo.

La demanda energética incrementaría en un 57% para el 2030, respecto a la demanda del 2004.

Por este motivo es muy importante el desarrollo de nuevas tecnologías que hagan posible una transición controlada hacia un sistema energético sostenible y amigable con el medio ambiente, independiente de las reservas naturales de combustibles actualmente utilizados. El interés actual por la reducción en la emisión a la atmósfera de gases de efecto invernadero está dando lugar a diferentes estudios basados en la no emisión y/o recuperación de estos gases procedentes de la combustión de hidrocarburos.

El deterioro del medio ambiente y las consecuencias que esto tiene para el futuro de la humanidad, es un tema que ha cobrado importancia. La sobreexplotación de los recursos naturales, la disposición inadecuada y el exceso de los desechos, tienen graves y visibles consecuencias que golpean al planeta y afectan directamente a la humanidad. Deforestación,

desertificación, derretimiento de los glaciares y calentamiento global son algunas de las consecuencias del deterioro del medio ambiente. Esto causa, entre otras, pérdida y alteración de la biodiversidad y desastres naturales como, inundaciones y deslizamientos, que conllevan además a la propagación de epidemias. Hemos sido testigos en nuestro país de estos hechos en los inviernos de los últimos años. Un aspecto importante respecto a la contaminación del medio ambiente es el referido a los gases de efecto invernadero que, además de ser contaminantes y tóxicos en grandes concentraciones, están acelerando el cambio climático.

El dióxido de carbón es el gas de efecto invernadero más notorio y en gran porcentaje es producido por el uso de combustibles fósiles para la generación de energía. Para el 2010 las emisiones de CO<sub>2</sub> estuvieron cerca de los 60 billones de toneladas métricas, siendo las principales fuentes carbón, gas natural y combustibles líquidos. Para el 2035 se espera que superen los 80 billones de toneladas métricas (EIA, 2010).

Otro tema inquietante e importante a nivel mundial es el crecimiento de la población. Según el *US Census Bureau*, en el 2011 llegó a 7.000 millones, un crecimiento del 16% respecto al año 1999, y para el 2050 se espera supere los 9.000 millones de personas. Este crecimiento tiene como consecuencia un aumento casi exponencial de los requerimientos energéticos. Paralelamente el agotamiento vertiginoso de los combustibles fósiles se ha hecho cada vez más evidente, las proyecciones más optimistas apuntan a que el petróleo perdure 100 o 150 años más. Esto ha tenido un impacto significativo a nivel económico,

político y cultura, debido a que esta es la principal fuente de energía y un factor económico importante (Bedoya *et al.* 2008; EIA 2010). Por este motivo la industria y los gobiernos de diferentes países están invirtiendo en investigación y desarrollo de nuevas tecnologías que reduzcan el impacto en el medio ambiente, mejorando los procesos, minimizando los costos y el desperdicio de materias primas (Dicks A.L. *et al.*, 2008; WyldGroup *et al.*, 2008). El hidrógeno es actualmente una alternativa de gran interés pues es un combustible limpio que posee un gran rendimiento energético (143 kJ/g) cerca de tres veces mayor al de los hidrocarburos (Ni *et al.*, 2006), además no produce gases de efecto invernadero y es considerado, por muchos, un vector energético y el combustible del futuro. Este puede transformarse en electricidad, trabajo mecánico o calor, utilizando respectivamente pilas combustibles (*fuel cells*), motores de combustión interna y quemadores de hidrógeno.

Una de las alternativas que se han propuesto es el empleo del Hidrógeno como fuente de energía. El Hidrógeno es elemento más abundante del universo ya que el 92% de la materia está constituida por hidrógeno, el 7% es He y el 1% restante lo conforman los demás elementos. Con frecuencia se le encuentra combinado con agua (H<sub>2</sub>O) y otros elementos orgánicos. Es inodoro, incoloro e insípido en su forma natural no gaseosa. No es tóxico y se le puede respirar sin peligro. Es extremadamente liviano, y sube rápidamente de la superficie de la tierra la atmósfera.

Las ventajas del hidrógeno como fuente energética, no residen únicamente en el hecho de ser una materia prima prácticamente

inagotable, cuyo calor de combustión con oxígeno ( $14,19 \times 10^4$  kJ/kg) es bastante superior al de combustibles fósiles clásicos como la gasolina ( $\sim 4,5 \times 10^4$  kJ/kg) sino que, además, su combustión no produce  $\text{CO}_2$ , sino exclusivamente vapor de agua, lo que le convierte en un candidato ideal para la reducción del llamado “*efecto invernadero*”. Si bien esta última afirmación es cierta, es necesario matizar su validez, ya que los métodos comerciales actuales de producción de hidrógeno, implican necesariamente la utilización de combustibles fósiles, generando cantidades importantes de contaminantes (fundamentalmente  $\text{CO}_2$ ).

Hay varios avances en el campo tecnológico del hidrógeno. En la actualidad existen diferentes automóviles que funcionan utilizando este combustible. Uno de los más conocidos es el FCX *Clarity* de Honda, que funciona únicamente con hidrógeno transformado en energía mediante una pila combustible. Otros fabricantes de automóviles de hidrógeno son BMW, Mazda, Ferrari, General Motors, Nissan, entre otros, que en su mayoría fabrican automóviles híbridos. Además existen varios proyectos, en diferentes ciudades del mundo, que promueven el uso de estas tecnologías en los sistemas de transporte público. Como ejemplos notables entre otros están: las flotas de buses de hidrógeno en Londres, Madrid, Barcelona, y recientemente la primera iniciativa latinoamericana, un prototipo en Sao Paulo (PNUD, 2009). Por otra parte también se han adaptado pilas combustibles de hidrógeno en prototipos de dispositivos móviles como en los celulares y en sistemas de calefacción y refrigeración para el hogar.

La principal desventaja del uso de hidrógeno como fuente de energía, es la dificultad para almacenarlo y transportarlo. Debido a su baja densidad se requieren tanques más grandes y por tanto más pesados que los usados para los hidrocarburos, lo cual no es beneficioso para el diseño de automóviles u otros dispositivos. Por otra parte si el hidrógeno es comprimido se mejoraría el volumen de los tanques pero no el peso. Otra forma de almacenar el hidrógeno sería en forma líquida, pero para esto se requiere almacenamiento criogénico que es muy costoso. Por este motivo existe ahora una impulso a la búsqueda de materiales para implementar nuevos métodos de almacenamiento y transporte de hidrógeno (Wünschiers and Lindblad, 2002).

Otra desventaja respecto al uso de hidrógeno como combustible, es su producción. Los métodos de producción que se usan en la actualidad no son tan eficientes ni económicos como se requiere para suplir las necesidades mundiales de hidrógeno, mucho menos si se pretende utilizar en el área energética. Más del 96% del hidrógeno producido a nivel mundial depende de combustibles fósiles (Wünschiers and Lindblad, 2002).

Para el 2008 se produjeron, a nivel global, aproximadamente 500 mil millones m<sup>3</sup> de hidrógeno al año, lo cual equivale sólo al 1.5% de los requerimientos de energía (Dicks A.L. *et al.*, 2008). Sin embargo el hidrógeno no es particularmente utilizado en el área energética. Sus principales usos se dan en la industria de fertilizantes, producción de metanol y la refinación de combustibles, por lo cual hay que encontrar

formas de producción que satisfagan tanto las necesidades de las industrias, como las energéticas (Dicks A.L. *et al.*, 2008). Debido a lo anterior, se está incursionando en la búsqueda de nuevos métodos de producción, entre los cuales han ganado importancia, los métodos biológicos. Una de las principales ventajas de los procesos biológicos es que se pueden utilizar diversos sustratos como aguas residuales y residuos orgánicos para darles un valor agregado, además las condiciones del proceso son prácticamente ambientales por lo cual no hay un gasto energético importante. Sin embargo la eficiencia y rendimiento de estos procesos son bajos (Kapdan and Kargi, 2006).

La fuente más común de hidrógeno es el agua. Se obtiene por la descomposición química del agua en oxígeno e hidrógeno a partir de la acción de una corriente eléctrica (electrólisis) generada por fuentes de energía renovable (solar, fotovoltaica, eólica, etc.) Sin embargo, este proceso es aún costoso y la energía requerida para la producción del Hidrógeno es un tanto mayor a la energía obtenida.

Otras formas de obtención de Hidrógeno son: metabolismo de algas en bio-reactores, electrólisis, reducción química y termólisis. A pesar de su eficiencia, estos métodos aún son mucho menos utilizados y desarrollados que la obtención a partir de procesos en los cuales se utilizan hidrocarburos, pero se espera que en los próximos años se revierta ésta tendencia, ya que los beneficios de la energía limpia y libre de derivados del petróleo son incalculables para el medio ambiente.

La producción de hidrógeno por vía biológica puede ser llevada a cabo por una diversidad de microorganismos tales como las bacterias fotosintéticas, las cianobacterias, las algas y las bacterias fermentativas. Las bacterias fotosintéticas muestran las siguientes ventajas respecto a los demás microorganismos:

La eficiencia de conversión de la luz 'Photosynthetic Active Radiation', la cual es la base de la energía recibida por las bacterias, es del orden del 68.5% comparado con el 43% de las algas.

Entre las numerosas fuentes de carbono que utilizan tanto para desarrollarse, como para producir hidrógeno; estas se encuentran disponibles en los efluentes industriales.

No producen oxígeno, simultáneamente con la producción de hidrógeno (fotosíntesis anoxygenic); contrariamente a las algas y las cianobacterias. El oxígeno disminuye e inhibe la producción de hidrógeno, y conduce a la imposibilidad de usar la mezcla gaseosa directamente en una pila de combustible.

La producción de hidrógeno es continua, aun cuando el medio de cultivo está saturado en hidrógeno, contrariamente a la producción con algas y cianobacterias.

Por otro lado, la principal desventaja de las bacterias fotosintéticas es la necesidad de fuertes aportes energéticos, lo cual se resuelve con el uso de sustratos de carbono de desechos industriales.

Entre las bacterias fotosintéticas heterótrofas, la *Rhodobacter capsulatus* (fig. 5) fue elegida por su fuerte capacidad de producir hidrógeno. Utilizando lactato como fuente de carbono, la productividad de esta bacteria alcanza los 130 ml de hidrógeno puro/hora/gramo de peso seco de bacteria

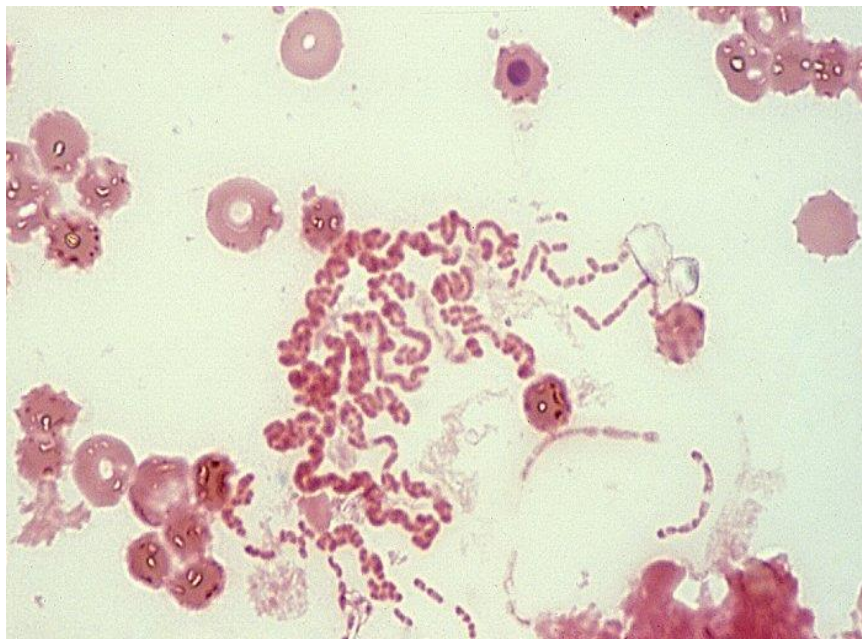


Figura 5. Fotografías microscópicas de la bacteria Rhodobacter Capsulatus

El género de la alfa-proteobacteria *Rhodobacter*, incluye especies que poseen un extenso rango de capacidades metabólicas, lo cual ha

despertado un gran interés científico, especialmente en el área de energías renovables. Esta bacteria es comúnmente utilizada para la producción de hidrógeno, a través de diversas fuentes de carbono, pero dependiendo de éstas, varían la velocidad y el rendimiento de la reacción presentada, y se ha demostrado que cultivos mutantes de ésta bacteria pueden ser aislados y muestran capacidades de producción de hidrógeno mejoradas.

La fotoproducción de hidrógeno es debida a la enzima nitrogenasa, la cual, en ausencia de sustratos alternativos, es capaz de reducir protones a hidrógeno. Además de la nitrogenasa, la *R. capsulata* posee una hidrogenasa ligada a membrana, la cual parece funcionar exclusivamente en la absorción de hidrógeno. Esta enzima permite a la *R. capsulata* crecer de forma autótrofa en una mezcla de hidrógeno y dióxido de carbono.

Las condiciones anaerobias, así como altas intensidades luminosas son requeridas, además de un sustrato que sea metabolizado eficientemente. Hillmer & Gest, encontraron que las mayores velocidades de producción de hidrógeno toman lugar en células alimentadas con DL-lactato o piruvato como fuente de carbono y energía, y glutamato como fuente de nitrógeno limitadora de crecimiento.

En otras bacterias diazotróficas, ha sido sugerido que el rol de la hidrogenasa es la de reciclar el hidrógeno desarrollado por la nitrogenasa, por lo tanto incrementando la eficiencia energética de la reacción de

fijación de nitrógeno; o bien, alternativamente, facilitar la protección de nitrogenasa contra el oxígeno, permitiendo al hidrógeno funcionar como un sustrato para la cadena de respiración aerobia. En la *R. capsulata* puede servir como sustrato para la respiración aerobia, participar en la fotoreducción del dióxido de carbono, o actuar como un donador de electrones a la nitrogenasa.

Zlatev demostró que a condiciones idénticas de iluminación y concentración lactato/glutamato del sustrato, mayores rendimientos de producción de hidrógeno son obtenidos en reactores planos continuos o semicontinuos, en los cuales la superficie de contacto de las bacterias con la luz es maximizada.

La minimización de los costos globales de la producción de hidrógeno por vía biológica (bacteriana) necesita por un lado, la concepción de un reactor fotosintético que utiliza la luz del sol como fuente de energía; y por el otro, desechos como sustrato.

El reactor donde se aplicaran los sensores de hidrógeno es un reactor fotosintético bacteriano con la misma sepa mutante IR3. La ventaja de los sensores electroquímicos es que pueden medir producción muy baja de hidrógeno en reactores bacterianos con volúmenes pequeños (como 10 ml), donde no se puede medir de manera precisa el volumen del hidrógeno producido que es de un rango de 1 a 2 ml por hora. Utilizar reactores de volumen mayor que produzcan volúmenes más grandes no es rentable ya que la optimización del proceso requiere un elevado

número de experimentos que a su vez requieren grandes cantidades de reactivos y cuyo tiempo de proceso es extenso hasta que se haya producido un volumen de hidrógeno que pueda ser medible de manera precisa.

Los sensores electroquímicos permiten las mediciones en tiempo real de la concentración de hidrógeno disuelto producido en el cultivo bacteriano adentro de los reactores bacterianos sin medir el volumen.

Existen varios estudios respecto a la producción de hidrógeno utilizando diferentes materiales de residuo (Kapdan and Kargi, 2006) que incluyen residuos de la fabricación de tofu (Zhu et al. 1999), residuos sólidos urbanos (Fascetti et al., 1998), residuos de las refinerías de azúcar, melaza (Bolliger et al., 1985; Yigit et al., 1999; Yetis, M. et al., 2000), aguas residuales de almazaras (Eroglu et al., 2004), lodos activados (Wang et al., 2003), residuos de almidón (Yoko et al., 2001; Zhang et al., 2003), residuos de la industria del papel (Kádáret al. 2004), materiales lignocelulósicos como: cáscara de arroz y bagazo de coco y caña de azúcar (Kumar and Das, 2001) y suero de leche (Zürer and Bachofen, 1979; Azbaret et al., 2009; Davila-Vazquez et al., 2009). El proyecto consiste en la producción biológica de hidrógeno basada en un método conocido como: fotofermentación. Se evalúa, a nivel laboratorio el potencial como sustrato del suero de leche, el cual es un residuo que representa un volumen importante de efluente en la industria láctea y es un significativo contaminante, no solo en nuestro país sino en el mundo entero.

A nivel mundial, para 2009 se produjeron aproximadamente 20 millones toneladas de queso (FAO, 2009), lo cual equivale aproximadamente a 180 millones de toneladas de suero. Los microorganismos que se utilizaron en el desarrollo del proyecto son dos cepas de bacterias púrpuras no sulfurosas llamadas *Rhodobacter capsulatus* (B10 y B10 LacZ). Estas degradan la lactosa y el lactato bajo la dependencia del metabolismo de la nitrogenasa, que es el enzima responsable de la producción de hidrógeno.

A pesar de los numerosos estudios en la producción de hidrógeno con materiales de residuo, son pocos los artículos encontrados en la revisión bibliográfica que estudian el uso del lactosuero industrial, la gran mayoría de estos son estudios de la producción de hidrógeno mediante el proceso de fermentación oscura (Davila-Vazquez *et al.* 2008; 2009; Azbaret *al.* 2009; Ferchichiet *al.* 2005). Los estudios mediante el método de fotofermentación encontrados, se realizaron sólo para la degradación del lactato (Zürrer & Bachofen 1979; 1981).

## JUSTIFICACIÓN

La generación de energías y su utilización es la base para el desarrollo de las sociedades modernas. Sin embargo, éste desarrollo desde finales del siglo XXI se ha basado en el empleo y explotación de fuentes de energía fósil tales como el carbón, el petróleo, el gas, etc.

No obstante uno de los principales problemas a los que se enfrenta la Humanidad es el agotamiento de éstos combustibles. El modelo energético actual, dependiente en su mayoría del petróleo y el carbón, ha empezado a buscar alternativas sostenibles, como las llamadas energías renovables.

De acuerdo al modelo de Hubbert de la duración de las reservas petroleras, la cantidad de barriles de crudo producidos mundialmente alcanzará un pico máximo para después decrecer a medida que se consumen las reservas, formando una gráfica en campana. Teniendo en cuenta éste modelo, así como algunas condiciones que recientemente se han agregado a la ecuación tales como: consumo/demanda en determinadas regiones, costo de obtención y refinamiento, inversiones y otros; se estima que la producción de barriles de petróleo a nivel mundial alcanzará su máximo alrededor de 2020, cayendo hasta cero en el 2090 (aproximadamente).

Además, se cree que dado el alto grado de dependencia del uso del petróleo y sus derivados en las actividades industriales, agrícolas y de transporte; el descenso en la producción de petróleo después de su pico máximo tendrá un impacto negativo en la economía global ante el encarecimiento del mismo.

Recientemente, a la luz de los hechos observados en cuestiones ambientales tales como el calentamiento global, es de gran importancia el

que se busquen nuevas fuentes de energía que no sean tan dañinas como lo han sido los combustibles fósiles, debido a que éstos contribuyen a la generación tanto de partículas suspendidas como de gases dañinos para la salud y el medio ambiente que contribuyen al calentamiento global.

El impacto en la economía de los países importadores de petróleo, así como en el medio ambiente global, ha llevado a países como Estados Unidos a iniciar programas como el 'Programa Hidrógeno' (U.S. Department of Energy , 2007), bajo el cual se destinan recursos a la investigación y desarrollo de nuevas tecnologías para la producción, almacenamiento y uso del Hidrógeno. Actualmente Estados Unidos importa más del 55% del petróleo que consume y se estima que el porcentaje será del 68% en el 2025. Además, dos terceras partes de los 20 millones de barriles de petróleo consumidos anualmente son usados en transportación. Por este motivo es muy importante el desarrollo de nuevas tecnologías que hagan posible una transición controlada hacia un sistema energético sostenible y amigable con el medio ambiente, que no sea dependiente de las reservas naturales de combustibles fósiles. Una de estas alternativas es el empleo del Hidrógeno como fuente de energía alternativa. Debido a su gran abundancia, el Hidrógeno podría utilizarse en lugar del carbón o del petróleo. No obstante éste combustible no es una fuente primaria de energía, es decir, no es posible su extracción directa de la Tierra como el gas natural, siendo su proceso de obtención de un costo bastante elevado y más aún, los métodos actuales de obtención de Hidrógeno implican en su mayoría la utilización de

combustibles fósiles. Aun así, el Hidrógeno tiene el contenido de energía por unidad de peso más alto que ningún otro combustible conocido.

Una alternativa para la producción de Hidrógeno que resulte mucho más barata es la aplicación de masa bacteriana. Utilizando la bacteria fotosintética *Rhodobacter capsulatus* en determinadas condiciones empleando lactato ácido como fuente de carbono, y luz solar como fuente de energía, su productividad alcanza los 130 ml de Hidrógeno puro/hora/gramo de peso seco de bacteria.

La obtención de Hidrógeno mediante el uso de productos de desecho como sustrato, así como de la luz solar como fuente de energía están dirigidos a la reducción de costos en su producción. Además, el Hidrógeno generado biológicamente representa una fuente renovable y limpia de combustible alternativo al petróleo.

El parámetro lo más representante que demuestra el funcionamiento normal de un biorreactor bacteriano para la producción fotosintética de hidrógeno es la velocidad del proceso, que se mide con el volumen del hidrógeno producido durante un periodo de tiempo – como por ejemplo una hora. La medición en tiempo real de este parámetro permitirá el control óptimo del proceso bacteriano de la producción de hidrógeno, que determina la necesidad a desarrollar sensores adecuadas capas a medir la velocidad de la producción del hidrógeno e n tiempo real de que es dedicado este trabajo.

## OBJETIVO GENERAL

***Desarrollar y caracterizar analíticamente dos tipos de sensores de hidrógeno: potenciométrico y voltamétrico, capaces de monitorear en tiempo real la concentración de hidrógeno disuelto producido en un reactor bacteriano fotosintético.***

La medición en tiempo real de la concentración del hidrógeno producido permitiría la aplicación de reactores fotosintéticos pequeños con volúmenes del rango de varios mililitros en optimización experimental del proceso. También experimentos de optimización van a durar no más que varios minutos para cada una de las combinaciones de los valores de las variables.

La aplicación de este enfoque permitirá encontrar rápido y económicamente las condiciones óptimas para producción máxima de hidrógeno, a partir de cualquier fuente nutritiva disponible localmente habitualmente desechos industriales de industrias alimenticias.

## OBJETIVO PARTICULAR

Optimizar la construcción de los sensores desarrollados y evaluación de la influencia de la naturaleza del metal del electrodo indicador (Platino y Paladio) sobre la sensibilidad y el tiempo de la respuesta.

# MARCO TEÓRICO

## PRODUCCIÓN Y USOS DEL HIDRÓGENO

Para el 2008 se produjeron a nivel mundial 50 millones de toneladas de hidrógeno con un crecimiento del 10% anual. (Jaén, 2004; Dicks A.L. *et al.*, 2008; Wyld Group *et al.*, 2008). La demanda de hidrógeno se concentra principalmente en la industria de fertilizantes para la producción de amoníaco. Otros usos importantes son la refinación de combustibles y la producción de metanol.

Además de sus usos convencionales, el hidrógeno actualmente se ha convertido en una alternativa energética de gran interés. La adopción del hidrógeno como combustible es la respuesta a diversos factores como son, por una parte, el crecimiento desmesurado de la población, lo cual conlleva a un crecimiento casi exponencial de los requerimientos energéticos, como se puede apreciar en la **Figura 6**, esto combinado con el agotamiento de las reservas de petróleo, que en las proyecciones más optimistas durarán 150 años, ha fomentado la búsqueda urgente de nuevas alternativas energéticas.

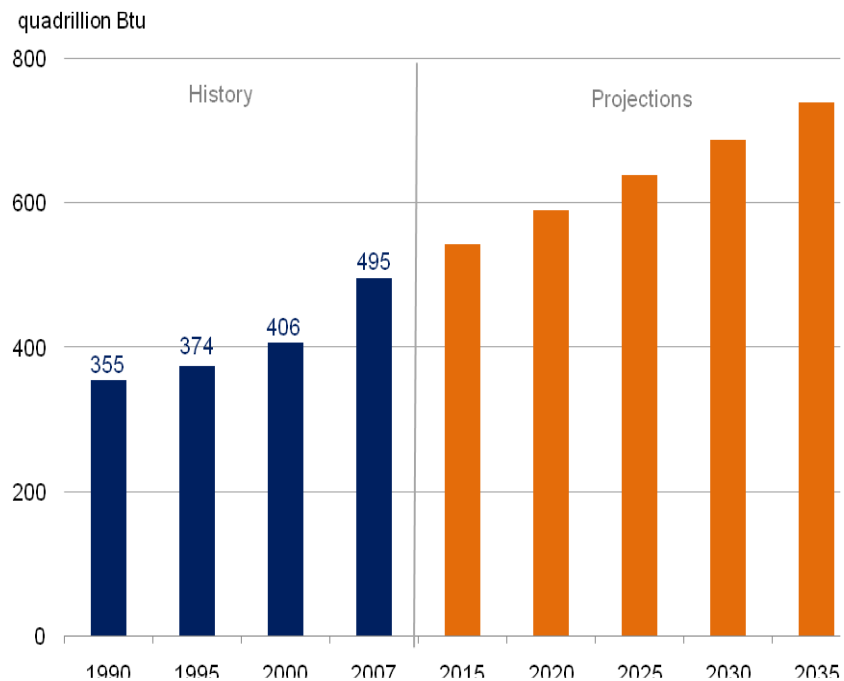


Figura 6. Consumo mundial de energía 1990-2035 Fuente:(EIA 2010)

Por otra parte la conciencia respecto al cuidado del planeta es cada vez más grande y se buscan alternativas energéticas que no sean tan dañinas para el medio ambiente. Uno de los principales problemas ambientales es la producción de gases de efecto invernadero, especialmente el dióxido de carbono que además de ser contaminante, acelera el calentamiento global y se produce en grandes cantidades principalmente por los combustibles fósiles **Figura 7**.

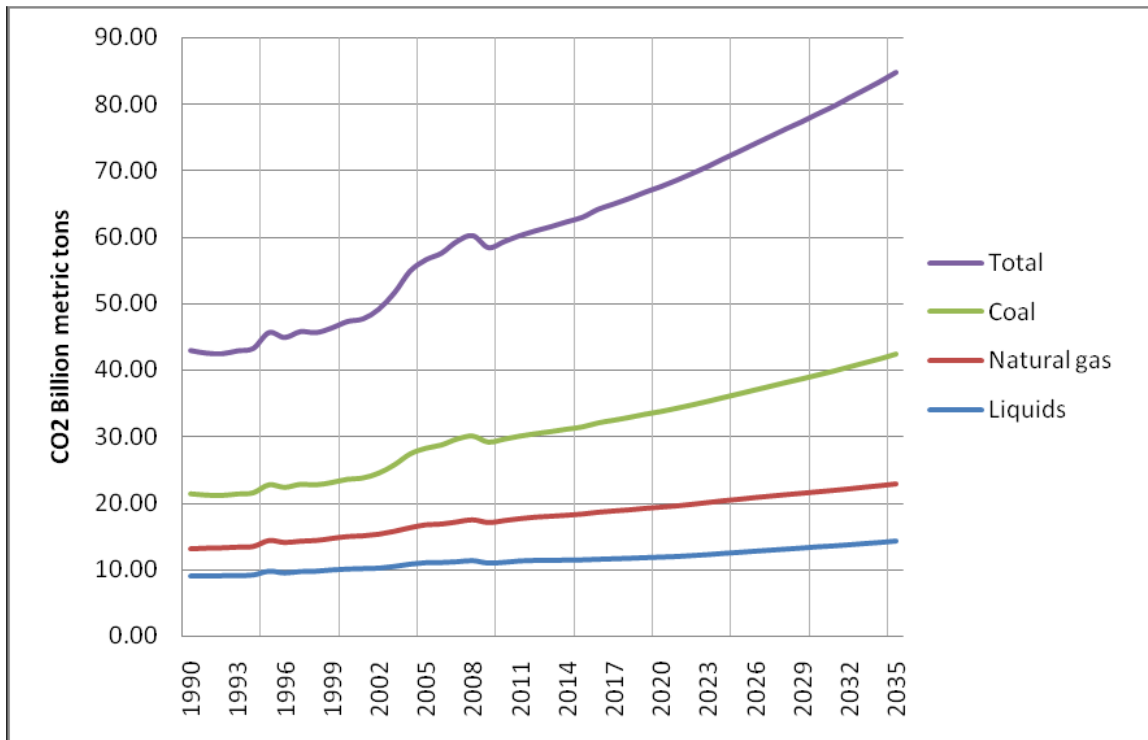


Figura 7. Emisiones de Dióxido de Carbono según el tipo de combustible 1990-2035.  
Fuente (EIA, 2010)

El hidrógeno es un combustible limpio que posee un gran rendimiento energético (143 kJ/g) mayor al de los hidrocarburos, y además no produce gases de efecto invernadero. El hidrógeno puede transformarse en electricidad, trabajo mecánico o calor utilizando respectivamente pilas combustibles, motores de combustión interna y quemadores de hidrógeno (Wünschiers and Lindblad, 2002; Vignais et al., 2006).

El uso del hidrógeno como combustible es muy escaso ya que, como se ilustró anteriormente, los requerimientos industriales son importantes

(Kruse *et al.*, 2002). Debido a lo anterior es necesario encontrar nuevas técnicas de producción de hidrógeno que sean sostenibles y económicamente viables. La obtención convencional de hidrógeno utiliza principalmente gas natural, aceites, carbón, agua y biomasa como fuente de energía (**Figura 8**) (Das, 2009). Los métodos usados convencionalmente son reformados de hidrocarburos y descomposición térmica, los cuales se caracterizan por altos costos energéticos. No obstante, en los últimos años se han planteado nuevas y novedosas formas de obtener hidrógeno. Principalmente ha tomado fuerza la producción biológica, que resulta de la conversión de diferentes compuestos mediante diversos microorganismos (Dicks A.L. *et al.*, 2008).

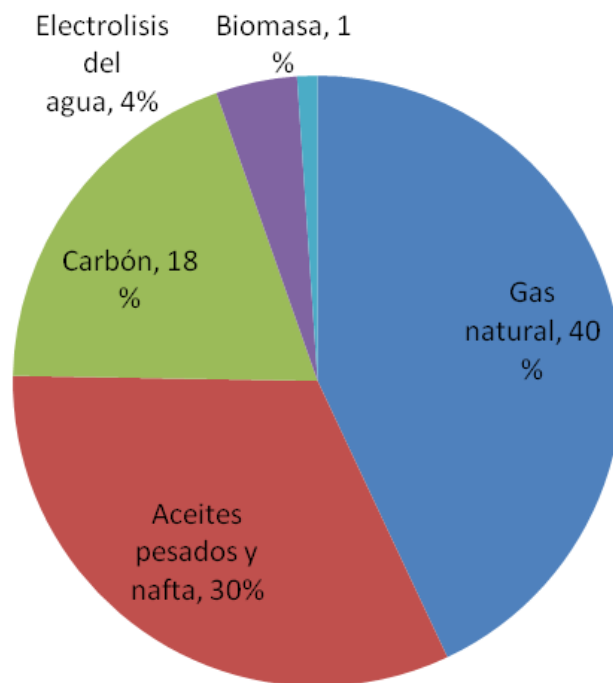


Figura 8. Materias primas para la producción de Hidrógeno \*Adaptado (Das, 2009)

En la **Tabla 1** se muestran diferentes métodos de obtención de hidrógeno, su fuente de energía, rendimiento y temperatura requerida.

**Tabla 1** Procesos de producción de hidrógeno

Tipo de Proceso	Fuente de energía	Rendimiento (%)	T requerida (°C)	Referencia
Reformado con vapor	Gas Natural	80	750 < T < 900	(García, 2005)
Oxidación parcial	Gas Natural	70	1300 < T < 1400	(García, 2005)
Reformado auto térmico	Gas Natural	76	1100 < T < 1400	(García, 2005)
Gasificación	Carbón	60	400 < T < 1600	(García, 2005)
Electrólisis de agua en fase vapor	Nuclear	40	1000 < T < 2500	(García, 2005)
Electrólisis convencional de agua	Hidroeléctrica, eólica geotérmica, mareomotriz	70	80 < T < 85	(Dicks A.L. <i>et al.</i> , 2008)
Hidrógeno Foto biológico	Solar, Microorganismo, Sustrato (fuentes carbonadas)	10	25 < T < 40	(Nath and Das, 2004)
Hidrógeno Fermentativo	Microorganismo, Sustrato(fuentes carbonadas)	10	25 < T < 40	(Nath and Das, 2004)

Como se puede observar los procesos que utilizan materias fósiles y los procesos de electrólisis de agua tiene rendimientos mucho más altos que los que presentan los procesos biológicos (Hidrógeno fotobiológico y fermentativo), sin embargo al comparar las temperaturas requeridas se puede observar que se requieren temperaturas mucho más altas en los procesos no biológicos lo cual genera mayores gastos energéticos.

Aunque el rendimiento de los procesos biológicos no es alto, actualmente se están haciendo diversos esfuerzos para aumentarlo, mediante el desarrollo de microorganismos modificados y recombinados genéticamente para mejorar su función de síntesis de hidrógeno. Otro esfuerzo se hace es la optimización del diseño de los bio-reactores de acuerdo a las necesidades de los microorganismos, lo cual junto con la selección de las mejores condiciones de operación mejora el rendimiento notablemente (Nath and Das, 2004; Das, 2009).

## **PRODUCCIÓN BIOLÓGICA DE HIDRÓGENO**

Conocer los fundamentos moleculares de la producción de hidrógeno es fundamental para la investigación aplicada. La reducción de protones del hidrógeno es catalizada principalmente por dos enzimas, la hidrogenasa y la nitrogenasa que están presentes en las células (Vignais *et al.*, 2006).

### **HIDROGENASA**

Las hidrogenasas son enzimas que están encargadas de combinar los protones (H<sup>+</sup>) con electrones para la producción de hidrógeno molecular (H<sub>2</sub>) y el proceso contrario.  $2\text{H}^+ + 2\text{e}^- = \text{H}_2$

Esta enzima se halla en casi todos los organismos procariotas, en algunos eucariotas anaerobios y en algas verdes unicelulares (Vignais *et al.*, 2006). Se han identificado tres clases de hidrogenasas hasta el momento: [Fe]-hidrogenasa, [NiFe]-hidrogenasa y [NiFeSe]-hidrogenasa.

En la mayoría de casos, es evidente que la [NiFe]-hidrogenasa es la encargada de la captación de hidrógeno mientras la [Fe]-hidrogenasa es la encargada del procesos de producción de H<sub>2</sub>(Prince and Kheshgi, 2005; Basak and Das, 2007)

### **NITROGENASA**

La nitrogenasa es un sistema compuesto por dos proteínas que cataliza la reducción de nitrógeno molecular N<sub>2</sub> en amonio, junto con la hidrólisis del ATP. Notablemente, después de 35 años de estudio, la reacción estequiométrica global todavía no está determinada de forma definitiva (Vignais *et al.*, 2006). Existen 3 diferentes tipos de enzimas las cuales convierten nitrógeno en amonio con diferentes estequiometrias:

- Enzimas de molibdeno:  $N_2 + 8 H^+ + 8 e^- \leftrightarrow 2NH_3 + H_2$
- Enzimas de vanadio:  $N_2 + 12H^+ + 12 e^- \leftrightarrow 2NH_3 + 3H_2$
- Enzimas de hierro:  $N_2 + 21H^+ + 21 e^- \leftrightarrow 2NH_3 + 7.5H_2$

Estas reacciones requieren energía, al menos 2 moléculas de ATP por electrón. La nitrogenasa en ausencia de N<sub>2</sub> puede reducir protones a H<sub>2</sub>. Debido a lo anterior los procesos de producción de hidrógeno con organismos que contienen esta enzima se hacen bajo la condición de ausencia de N<sub>2</sub> (Rees and Howard, 2000; Prince and Kheshgi, 2005). Para entender cómo funciona la nitrogenasa hay que entender que esta enzima es un complejo que consta de dos componentes (ver **Figura 9**).

Los electrones requeridos para la reducción llegan al complejo por medio de una ferredoxina o una flavodoxina (FeS proteínas no hémicas), que los transfiere al componente II, que queda reducido. El componente II reducido se une a dos moléculas de ATP, y cambia su conformación, lo que le permite unirse al componente I. Entonces se produce la transferencia de electrones desde el componente II al componente I, con hidrólisis de ATP; este proceso a su vez provoca la separación del componente II respecto del I. Una vez reducido el componente I (la molibdoferroproteína), éste transfiere los electrones (y los protones) al  $N_2$ , hasta convertirlo en dos moléculas de amoníaco. El amoníaco entra entonces en las rutas biosintéticas para convertirlo en nitrógeno orgánico, incorporable a las macromoléculas.

En este proceso es de resaltar el alto costo energético que se tiene, en forma de al menos 18 ATP. Esto se debe a que el  $N_2$  es una molécula muy inerte y su reducción requiere una gran energía de activación para transferir 6 electrones. Además hay que tener en cuenta que parte de la energía se gasta en el proceso de producción de  $H_2$ .

La nitrogenasa es extremadamente sensible a la presencia de oxígeno, por lo que queda rápida e irreversiblemente inactivada por este gas (Taiz and Zeiger, 2006; Basak and Das, 2007). En la **Tabla 2** se muestra la comparación de las principales características de la nitrogenasa y la hidrogenasa.

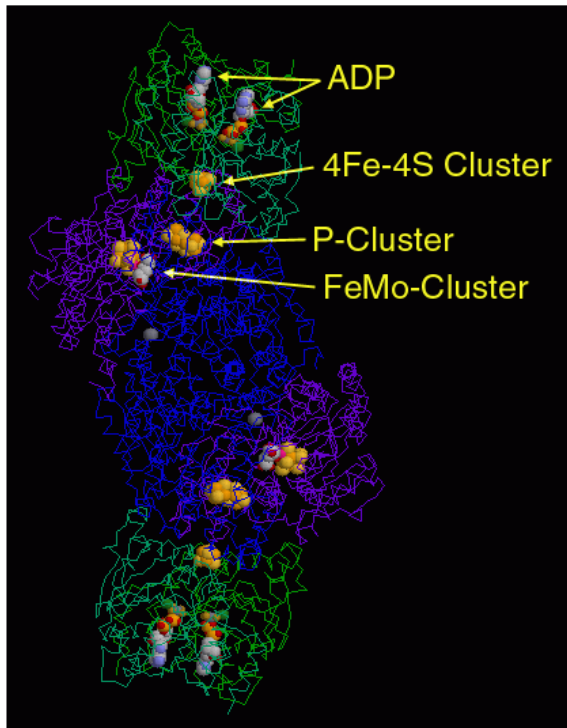


Figura 9. Estructura de la Nitrogenasa. Componente I confirmado por las subunidades azules y moradas. Componente II compuesto por las subunidades verdes.

**Tabla 2** Comparación entre Nitrogenasa e Hidrogenasa \*Adaptado (Basaket *al*, 2007)

Características	Hidrogenasa	Nitrogenasa
Producción de Hidrógeno	Si	Si
Consumo de Hidrógeno	Si	No
Requerimientos de Energía (ATP)	No	Si
Sensibilidad al Oxígeno	Si	Si
Velocidad Catalítica	Alta	Baja
Presencia en Procariotas	Si	Si
Presencia en Eucariotas	Si	No

## MÉTODOS DE PRODUCCIÓN BIOLÓGICA DE HIDROGENO

Los métodos de producción de Hidrógeno se pueden clasificar en los siguientes:

### BIOFOTÓLISIS DIRECTA

Este método de producción de hidrógeno está basado en dos etapas: fotosíntesis y la producción catalizada de hidrógeno por hidrogenasas. El microorganismo más común en este método es el alga verde. (Riiset *al.*, 2005; Melis and Melnicki, 2006; Bedoya *et al.*, 2008) Fotosíntesis: *Producción de Hidrógeno*: A pesar de que la fisiología del metabolismo de hidrógeno en las algas es aun materia de investigación básica, el foto-proceso de producción de hidrógeno es de interés ya que utiliza unos de los recursos más abundantes en la tierra: agua y luz. En este proceso primero hay una etapa para el crecimiento de los microorganismos en estanques abiertos, luego se cosechan y se colocan en foto-bio-reactores donde se busca que produzcan hidrógeno y oxígeno pero no crezcan. Para lograr esto hay que adaptar las algas a una atmósfera anaeróbica, inyectando por ejemplo argón en oscuridad. (WünschiersandLindblad, 2002; Prince andKheshgi, 2005)  $2\ 2\ 244\ H\ O\ H\ e\ O\ 2\ 442\ H\ e\ H$

A pesar de que este proceso de producción de hidrógeno parece simple, existen diversos problemas que hay que tener en cuenta. Un problema es que la mezcla de oxígeno e hidrógeno es inflamable, explosiva y peligrosa. Por este motivo la separación y manejo es difícil y costosa.

Además, como se había considerado anteriormente, la hidrogenasa y nitrogenasa son altamente sensibles a la presencia de oxígeno y se ven inhibidas lo cual baja notablemente el rendimiento del proceso ya que en este se produce oxígeno. (Prince and Kheshgi, 2005)

### **BIOFOTÓLISIS INDIRECTA**

Este proceso se lleva a cabo principalmente por cianobacterias y algas verde-azules. A partir del proceso de fotosíntesis, el CO<sub>2</sub> es fijado a sustratos ricos en hidrógeno interno, generando hidrógeno molecular cuando estos microorganismos se incuban en condiciones anaerobias (Dutta *et al.*, 2005; Bedoya *et al.*, 2008) La biofotólisis indirecta intenta evitar la inhibición de la hidrogenasa debido al oxígeno mediante una separación temporal de las reacciones de producción de hidrógeno de aquellas en las que participa el oxígeno. Al igual que el proceso anterior en este proceso primero hay una etapa para el crecimiento de los microorganismos en estanques abiertos, luego se cosechan y se colocan en un reactor anaeróbico donde se induce la hidrogenasa y se inactiva el fotosistema II. Después la iluminación oxida los carbohidratos y lípidos almacenados y produce hidrógeno, ya sea directamente o después de fermentación oscura. Como idealmente solo se produce hidrógeno y dióxido de carbono mediante este proceso, el gas es más manejable y menos peligroso (Prince and Kheshgi, 2005).

Las tasas de producción de hidrógeno utilizando este método son variadas y dependen de las especies de cianobacterias y las condiciones

del proceso. Existen varias desventajas en este proceso como son las bajas tasas de producción encontradas y la sensibilidad al O<sub>2</sub> de la nitrogenasa y la hidrogenasa lo que hace necesario remover el O<sub>2</sub> producido. (Bedoya *et al.*, 2008)

### **FOTOFERMENTACIÓN**

En este proceso se utilizan bacterias púrpuras no sulfurosas que producen hidrógeno, catalizado por la nitrogenasa bajo condiciones de poco N<sub>2</sub>, usando luz y compuestos reducidos, como ácidos orgánicos, que muchas veces están contenidos en sustancias de desecho (Kapdan and Kargi, 2006; Rupprecht *et al.*, 2006; Bedoya *et al.*, 2008). Un factor clave en la fotofermentación es la intensidad de luz, ya que se ha observado que afecta tanto la velocidad de producción y el rendimiento del hidrógeno. En la fotofermentación los organismos más utilizados son del género *Rhodobacter* en lotes y con menor frecuencia en continuo (Zürcher & Bachofen 1979; 1981; Kapdan & Kargi 2006). Entre los resultados reportados más destacables de tasas de producción de hidrógeno por este microorganismo están 9 ml H<sub>2</sub>/Lcultivo h (E. Eroglu *et al.* 2004; 2006).

La ventaja de este método es que se pueden usar diferentes materiales de desecho como sustrato, además estas bacterias pueden usar un amplio espectro de energía lumínica. La desventaja es la baja eficiencia y que el oxígeno es un fuerte inhibidor para la producción de hidrógeno, por lo que el proceso debe realizar en condiciones anaerobias (Nath and Das, 2004; Melis and Melnicki, 2006).

## FERMENTACIÓN OSCURA

La producción de hidrógeno por este método está dada por bacterias anaeróbicas que crecen en oscuridad y usan sustratos ricos en carbohidratos. Entre los organismos que realizan este proceso se encuentran los del género *Clostridium* como son *C. buytricum*, *C. thermolactium*, *C. pasteurianum* (Kapdan and Kargi, 2006; Melis and Melnicki, 2006). Los subproductos de la fermentación son ácidos acético y butírico, con lo que los rendimientos prácticos de hidrógeno en la fermentación oscura están alrededor de 2 molH<sub>2</sub>/mol glucosa (Levinet al., 2004; Bedoya et al., 2008). La ventaja de este método es que se pueden utilizar varias fuentes carbonadas como sustrato. Las desventajas consisten en sus bajos rendimientos y en que a medida que aumenta el rendimiento la fermentación se vuelve termodinámicamente desfavorable (Nath and Das, 2004; Melis and Melnicki, 2006).

## PRODUCCIÓN INTEGRADA

El metabolismo y las propiedades de los microorganismos mencionados anteriormente para la producción de H<sub>2</sub> apuntan a un diseño de un sistema integrado. En este proceso se busca que el hidrógeno puede ser recolectado a través de un ciclo de luz-oscuridad. Así mismo, la biomasa extraída de este proceso se puede convertir, mediante enzimas, en material celulolítico compuesto por hidrolizados de proteínas y poliglucosa, con el que se puede alimentar directamente a las bacterias anaeróbicas que se utilizan en la fermentación oscura. Alternativamente bacterias fermentativas que contienen celulosomas pueden ser utilizadas.

Por otra parte, existen estudios que han demostrado que en la producción de hidrógeno mediante fermentación oscura se puede utilizar biomasa de algas. El proceso de fermentación oscura anaeróbica mediante bacterianas genera  $H_2$  y una variedad de ácidos orgánicos. Estos últimos pueden retroalimentar a los procesos de producción fotosintética de  $H_2$ .

Este sistema integrado genera un alto rendimiento por lo cual el proceso es sostenible, y económicamente viable para la producción de  $H_2$ . Sin embargo es necesario seguir trabajando para mejorar las condiciones de operación de estos sistemas (anaeróbico y aeróbico) para así obtener las tasas más altas de producción y conversión (Melis and Melnicki, 2006). Varios estudios se han realizado con los diferentes métodos para la producción biológica de hidrógeno.

## **FOTOSÍNTESIS EN LA PRODUCCIÓN BIOLÓGICA DE HIDRÓGENO**

Uno de los métodos más utilizados para la generación de hidrógeno es extraerlo de los productos basados en carbohidratos producidos durante la fotosíntesis usando bacterias fermentativas (Nath & Das 2004). Existen dos tipos de fotosíntesis, la oxigénica y la anoxigénica.

### **FOTOSÍNTESIS ANOXIGÉNICA**

En términos de la producción de hidrógeno las bacterias purpuras no del azufre (PNS) y las bacterias *Geobactersulfurreducens*(GS) tienen una ventaja en la fermentación, ya que estas tienen una alta eficiencia en la

conversión del sustrato a hidrógeno y además pueden utilizar una gran variedad de sustratos para crecer y producir hidrógeno.

Bacterias como el *Rhodospirillum* y *Rhodobacter* sp. pueden usar un amplio rango de ácidos orgánicos y carbohidratos como sustratos para la producción de hidrógeno con tasas de crecimiento superiores a 140 - 200 ml de H<sub>2</sub> g<sup>-1</sup> peso seco h<sup>-1</sup> (Macleret al., 1979; Kokuet al., 2002; Rupprecht et al., 2006). El sustrato es oxidado en el ciclo de ácido tricarbóxico con el derivado paso de e<sup>-</sup> por un sistema de transporte de electrones vía NAD<sup>+</sup>/NADH y ferredoxina antes de ser recombinado con H<sup>+</sup> mediante la nitrogenasa para producir H<sub>2</sub>. Este proceso requiere hidrólisis de ATP la cual es producida por un gradiente fotosintético de H<sup>+</sup>. El gen de la nitrogenasa (N<sub>2</sub>ase) codificado es el encargado para la producción de hidrógeno en las bacterias PNS y GS, se expresa en presencia de luz, en condiciones anaerobias y en ausencia de amonio, se encarga de catalizar la conversión. Dos moléculas de ATP se deben hidrolizar por cada electrón que se deja libre para la producción de hidrógeno, haciendo la reacción altamente dependiente de ATP (Rupprecht et al., 2006)

## **EMPLEO DE SENSORES PARA LA MEDICIÓN EN TIEMPO REAL DE LA PRODUCCIÓN DE HIDRÓGENO**

La optimización del proceso de obtención de hidrógeno, es decir, el aumento de la velocidad de reacción así como de la cantidad de producto;

requiere de un gran número de experimentos para encontrar los valores óptimos de todos los parámetros para obtener el volumen máximo de hidrógeno producido. Debido de eso la medición precisa del volumen del hidrógeno producido es de una gran importancia para lograr la meta del proyecto.

El método más aplicado para la medición del volumen del hidrógeno producido es el método volumétrico. Este método tiene una precisión satisfactoria únicamente en la medición de volúmenes grandes de hidrógeno producidos por reactores de escala industrial. Para reducir el tiempo y el costo de los experimentos relacionados con la optimización del proceso biológico es necesario aplicar reactores de volúmenes pequeños (100 ml); lo que provoca la aparición del problema con la medición de los volúmenes pequeños de hidrógeno.

La ventaja más grande de los sensores electroquímicos es la oportunidad de medir concentraciones pequeñas de hidrógeno ya que no es necesario producir grandes volúmenes para poder medirlos de manera precisa (actualmente la medición precisa de volúmenes pequeños es difícil). Sin embargo con los sensores electroquímicos (debido a su sensibilidad) puede medirse la concentración del hidrógeno disuelto en el momento de su formación por métodos bacterianos y determinar la velocidad de la producción en tiempo real, utilizando bio-reactores de muy bajo volumen (del rango de mililitros: de 10 hasta 100 ml).

Habitualmente se utilizan bio-reactores de grandes volúmenes (de varios litros para poder producir volúmenes medibles con alta precisión) y medir el volumen del hidrógeno producido durante una hora o más para determinar la velocidad de producción con precisión. La desventaja de este método es la pérdida de reactivos y tiempo.

Para optimizar el proceso de producción bacteriana fotosintética de hidrógeno se deben hacer un gran número de experimentos en diferentes condiciones de temperatura, intensidad total de la luz, composición espectral de la luz (intensidad de cada línea del espectro en el rango 340 - 650 nm), concentración del sustrato, tipo de sustrato. Teniendo que hacer variaciones en los valores de todos estos parámetros, se deben realizar cientos de experimentos, aun cuando se aplique la metodología del diseño de experimentos.

Si se utilizan sensores electroquímicos se pueden emplear reactores de bajos volúmenes (mililitros) y la información sobre la velocidad del proceso se obtendría en tiempo real, sin la necesidad de esperar hasta que se produzca un volumen medible y sobre todo sin destinar grandes cantidades de reactivos. Esta es la propuesta de éste proyecto, ya que hasta el momento no existen publicaciones sobre la aplicación de sensores electroquímicos para medir la velocidad de producción bacteriana de hidrógeno en tiempo real.

## EMPLEO DE ELECTRODO REVERSIBLE DE HIDRÓGENO COMO SENSOR

Se sabe que el potencial del electrodo reversible de hidrógeno (RHE) es proporcional a la concentración del hidrógeno. El potencial del RHE se puede usar como medida del volumen del hidrógeno producido.

El RHE se aplicó como sensor de hidrógeno y fueron determinadas sus propiedades. También se construyó la curva de calibración en condiciones controladas.

El Electrodo Reversible de Hidrógeno (RHE) se aplicará como sensor en tiempo real del hidrógeno producido. Para determinar de manera confiable el nivel de producción de H<sub>2</sub> se requiere de un reactor de volumen mayor, y dado que la producción de H<sub>2</sub> es pequeña evaluada en mL/hr el obtener una medición precisa es complicado. Sin embargo, el potencial de RHE permite la determinación en tiempo real del H<sub>2</sub> generado y en consecuencia el proceso se evalúa sin el consumo de grandes cantidades de reactivos.

El electrodo estándar de hidrógeno (NHE) es comúnmente utilizado como un electrodo de referencia, suponiendo que su potencial es de 0 volts. Esto basado en la ecuación:



Ocurriendo en condiciones estandarizadas: presión de hidrógeno de 1bar y concentración de iones hidronio de 1M/L. El potencial de electrodo establecido depende de la presión parcial de hidrógeno y se puede expresar por la ecuación de Nernst de la siguiente manera:

$$E = E_0 + RT/F (\ln a_{H^+} - \ln (p_{H_2}/p_0)^{1/2}) \quad [2]$$

Donde:

$E_0$  es el Potencial estándar, el cual por definición es cero

$a_{H^+}$  es la actividad de los iones de hidrógeno

$p_{H_2}$  es la presión parcial de hidrógeno

R es la constante del gas

T es la temperatura

F es la constante de Faraday

$p_0$  es la presión estándar (1 bar)

Cuando el equilibrio descrito en la ecuación [1] es establecido en condiciones distintas a las condiciones estándar incluyendo la composición de la solución del electrodo es llamado electrodo de hidrógeno reversible (RHE). Sus potenciales dependen del pH de la solución, precisamente del hidrógeno, de acuerdo a la ecuación de Nernst:

$$E_0 = - 0.059 \text{ pH} \quad [3]$$

y en la presión de  $H_2$  (Concentración del hidrógeno disuelto), así como a un pH constante, permitiendo así la aplicación del RHE como electrodo indicador (sensor) para el hidrógeno disuelto en condiciones anaeróbicas. La presencia de agentes oxidantes en la solución donde el RHE se encuentra inmerso (sumergido) corrompe el equilibrio descrito en la ecuación [1] y por consecuencia el potencial establecido del electrodo.

La producción de  $H_2$  por bacterias fotosintéticas se realiza en condiciones anaeróbicas y el RHE puede servir como un excelente sensor de hidrógeno para la determinación en tiempo real de los parámetros cinéticos en reactores de pequeños volúmenes.

La aplicación RHE como un sensor de hidrógeno permite la determinación precisa de la cantidad de  $H_2$  generado por bacterias en reactores de pocos mililitros, sólo monitoreando el potencial del RHE ya que su valor es proporcional a la concentración de  $H_2$  disuelto (presión de  $H_2$ ).

La determinación de las características del RHE como un sensor de hidrógeno se realiza mediante un electrodo con anillos de Pt palatinado que es parte de una celda conductométrica que contiene dos electrodos de anillos iguales. La celda se sumerge verticalmente en un vaso de precipitados de 100ml que contenga  $H_2SO_4$  1M.

El anillo de Pt colocado abajo fue aplicado como un cátodo que producía el hidrógeno y fue conectado con el terminal negativo de una fuente de voltaje controlado. Un alambre de Pt fue aplicado como ánodo conectado

con el terminal positivo e inmerso en una solución 1M de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  fuera de la celda conductométrica y una pulgada más arriba del fondo del vaso evitando de esta manera la entrada del oxígeno producido en la celda conductométrica y su mezcla con el hidrógeno.

El anillo de Pt colocado arriba fue aplicado como un electrodo indicador (sensor de hidrógeno) conectado con un Voltímetro de gran impedancia de entrada. Un electrodo de Ag/AgCl fue aplicado como electrodo de referencia. El hidrógeno generado sobre el anillo de abajo (en cantidad conocida) se mueve flotando hasta el electrodo de Pt de arriba determinando su potencial.

Se aplicó un potencial de 2,3 V entre el electrodo de Pt generador situado en la parte inferior de la celda conductométrica y el ánodo exterior que resulta en la generación de hidrógeno dentro de la celda conductométrica. La masa y el volumen del gas producido se calculan aplicando la ley de Faraday mediante la cantidad de electricidad evaluada por integración de la curva que se registra.

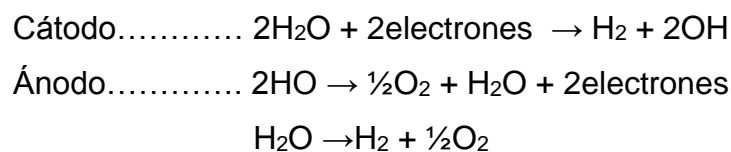
## **EMPLEO DE SENSORES VOLTAMÉTRICOS**

El hidrógeno puede ser producido de diversas maneras, por medio del gas natural, carbón, electrólisis del agua, biomasa, energía solar, eólica o nuclear. De los diferentes métodos de producción, la electrólisis del agua es una tecnología que produce hidrógeno con cero emisiones y disponible

en el momento. Para que la electrólisis del agua sea un proceso económico y eficiente, la reducción del potencial de la celda electrolítica es vital. El voltaje requerido en la celda depende principalmente del sobre voltaje del hidrógeno y oxígeno, y de la resistencia electrolítica del electrolito usado.

El sobre voltaje puede ser reducido con el uso de un apropiado electro catalizador, mientras que la resistencia del electrolito puede ser reducida por el uso de sustancias más conductoras o aumentando la temperatura de la solución.

La electrolisis del agua consiste en un proceso electroquímico en el cual el agua se divide en Hidrógeno y Oxígeno. La electrolisis consiste en pasar corriente eléctrica por medio de dos electrodos, un cátodo que es el negativo y un ánodo que es el positivo. Al someter a la sustancia a la corriente ambos electrodos presentaran desprendimiento de gases, por el cátodo se desprende el gas Hidrógeno, mientras que por el ánodo se desprenderá el gas Oxígeno. Lo expresado anteriormente se puede escribir de la siguiente forma.



Para observar el proceso con claridad es recomendable que en el montaje de la electrólisis ambos gases se desprendan sin juntarse en la

superficie del agua ya que no podría apreciarse los resultados, el ácido sulfúrico o cloruro sódico funcionan como catalizador de la reacción, es decir, acelera el proceso de desprendimiento.

Existen tres tipos de electrolizadores de agua fundamentalmente: el de electrolito alcalino, el de altas temperaturas y el de electrolito de membrana polimérica (PEM). Los Electrolizadores Alcalinos se consideran una tecnología bien establecida que usualmente emplea una solución acuosa de agua con hidróxido de potasio del 25-30% en peso. Sin embargo, también se han utilizado otros electrolitos como el NaCl y el NaOH.

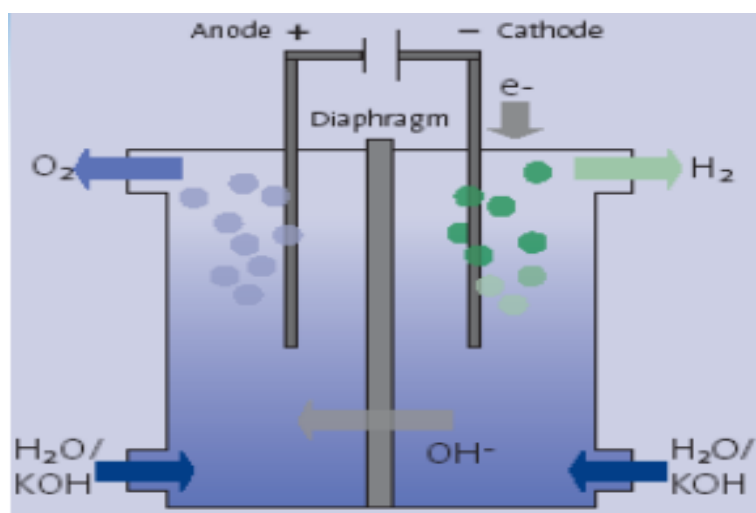


Figura 10. Modelo de una celda electrolítica para la producción de Hidrógeno

Los materiales electrocatalíticos para los electrodos son muy variables, entre los más usados se encuentran el Fe, Ru, Os, Co, Rh, Ir, Ni, Pd, Pt y sus aleaciones. Los materiales nobles como el Pt y el Ir, poseen una alta

actividad catalítica, así como una buena resistencia a la corrosión, sin embargo estos materiales son muy caros, por lo que se ha optado por materiales de bajo costo como el Fe, Ni y Co para ser usados como cátodos en la electrolisis alcalina. Los electrodos de Ni y de acero recubiertos con Ni son unos de los materiales para electrodo más utilizado, ya que poseen una alta resistencia a la corrosión, especialmente a altas temperaturas (por arriba de los 80°C), así como también en concentraciones altas de electrolito.

Los electrolizadores alcalinos son usados en todo el mundo para la producción de hidrógeno con un 99.8% de pureza, operan de 1.8 a 2.2 V, con densidades de corriente por debajo de los 0.4 mA cm<sup>-2</sup>. Presentan una eficiencia entre el 60-80%, la velocidad de producción de hidrógeno es de 0.01 y 10 m<sup>3</sup> h<sup>-1</sup>

La voltamperometría es un método mediante el cual se puede obtener información sobre un determinado analito, midiendo las intensidades de corriente generadas en función de la diferencia de potencial (Voltios) aplicado, en ciertas condiciones, que favorecen la polarización en el electrodo de trabajo. Muchas veces, los electrodos utilizados en voltamperometría son micro electrodos, de modo de aumentar la polarización gracias a su pequeña superficie.

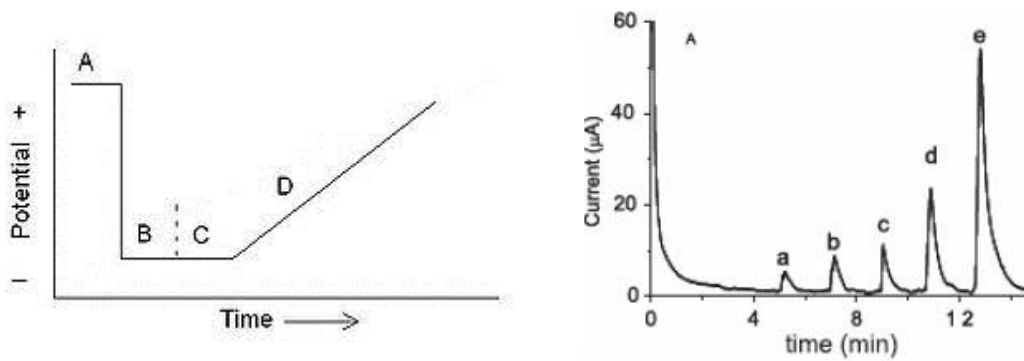


Figura 11. Potencial como una función del tiempo en Voltamperometría (Cronoamperometría)

Para llevar a cabo un experimento voltamétrico se requiere una celda electroquímica de tres electrodos.

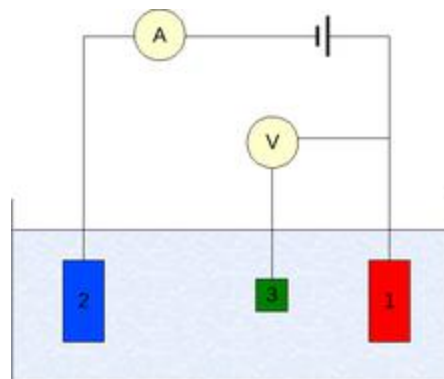


Figura 12. Celda electroquímica de tres electrodos: (1) electrodo de trabajo, (2) electrodo auxiliar; (3) electrodo de referencia.

El electrodo de trabajo, que hace contacto con el analito, debe aplicar el potencial deseado de una manera controlada con respecto del electrodo de referencia y facilitar la transferencia de electrones desde y hacia el analito. El tercer electrodo (Auxiliar) actúa como la otra semi-celda y su potencial se controla de manera que permita mantener el potencial del electrodo de trabajo constante.

# EXPERIMENTAL

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

Este capítulo describe los materiales usados así como los métodos aplicados en el trabajo experimental hecho a lograr las metas de la tesis.

### **MATERIALES USADOS PARA LA CONSTRUCCIÓN DE LOS SENSORES Y LA CELDA DE ELECTROLISIS**

Como sensor potenciométrico se utilizó una celda conductométrica de vidrio con electrodos de platino platinado negro.

Par la construcción del sensor voltamétrico se utilizaron tubos de PVC, alambres de paladio, plata y platino como electrodos de trabajo referencia y auxiliar respectivamente y resina époxica para colocar los electrodos en el cuerpo del sensor. Como membrana que separa el electrolito del sensor se aplicó hoja de polietileno con grosor de 50 micrómetros.

La celda de electrolisis fue de plástico PET con electrodos de acero inoxidable.

## **EQUIPOS Y SOFTWARE**

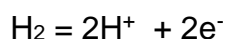
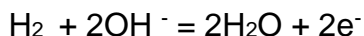
Las mediciones se realizaron con 264 Polarographic Analyser (EG&G PAR, USA acoplado con El\_Chemy Software y POL150 Polarographic Analyser, Hach, USA acoplado con Trace Master 7 Software.

Para la electrolisis se uso el fuente de voltaje modelo Topward 6303D (2 X 30V , 3A)

## **LA VOLTAMETRIA COMO UN MÉTODO ANALÍTICO**

La voltametría es una técnica electroquímica en las que se aplica un determinado potencial eléctrico a un electrodo (denominado electrodo de trabajo) sumergido en una solución (electrolito) que contiene una especie electro activa y se mide la corriente que pasa por este electrodo. La corriente es función del potencial aplicado y de la concentración de la especie electro activa presente.

La aplicación de la voltametría para la medición de la concentración del hidrogeno disuelto está basada sobre el proceso de oxidación electroquímica de gas hidrogeno de acuerdo con las ecuaciones:



El primer proceso ocurre en soluciones alcalinas ( $\text{pH} > 7$ ), mientras el segundo en soluciones ácidas ( $\text{pH} < 7$ ). En los dos casos ocurre acidificación de la solución – por consumo de los grupos  $\text{OH}^-$  o por generación de iones de hidrógeno  $\text{H}^+$ . Por este motivo el mejor electrolito para el sensor voltamétrico de hidrógeno es un ácido con concentración alta, como ácido sulfúrico o clorhídrico. En este caso la acidificación de la solución durante el funcionamiento del sensor no va a cambiar el pH.

Los electrodos y el electrolito del sensor voltamétrico de hidrógeno se deben separar de la solución de medición por una membrana permeable para gases, que no va a permitir la mezcla con el electrolito ácido del sensor. La construcción del sensor está presentada en el capítulo Resultados y Discusiones.

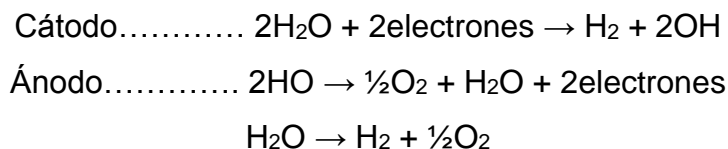
## **LA POTENCIOMETRIA COMO UN MÉTODO ANALÍTICO**

La potenciometría es un método con el que se puede determinar la concentración de una especie electroactiva en una solución empleando un electrodo indicador y un electrodo de referencia (un electrodo con un potencial conocido y constante con el tiempo). El potencial medido con un voltímetro con impedancia de entrada grande depende de la concentración de la especie medida. En el trabajo de la tesis como electrodo indicador fue usado el Electrodo Reversible de Hidrógeno.

## CALIBRACIÓN DE LOS SENSORES DESARROLLADOS

Para calibrar un sensor es necesario usar una solución patrón con concentración conocida. Una solución que contiene hidrogeno disuelto puede existir en condiciones muy especiales: temperatura constante y presión parcial del hidrogeno en la atmósfera en contacto con la solución constante también. El hidrógeno se genera de manera controlada fácilmente por electrolisis de agua y la medición precisa de la carga eléctrica utilizada en el proceso de electrolisis permita calcular de manera precisa la masa de hidrogeno producido.

La electrolisis del agua consiste en un proceso electroquímico en el cual el agua se divide en Hidrógeno y Oxígeno. La electrolisis consiste en pasar corriente eléctrica por medio de dos electrodos, un cátodo que es el electrodo negativo y un ánodo que es el electrodo positivo. Al someter a la sustancia a la corriente ambos electrodos presentaran desprendimiento de gases, por el cátodo se desprende el gas Hidrógeno, mientras que por el ánodo se desprenderá el gas Oxígeno. Lo expresado anteriormente se puede escribir de la siguiente forma.



Existen tres tipos de electrolizadores de agua fundamentalmente: el de electrolito alcalino, el de altas temperaturas y el de electrolito de

membrana polimérica (PEM). Los Electrolizadores Alcalinos se consideran una tecnología bien establecida que usualmente emplea una solución acuosa de agua con hidróxido de potasio del 25-30% en peso. Sin embargo, también se han utilizado otros electrolitos como el NaCl y el NaOH.

Los materiales electrocatalíticos para los electrodos son muy variables, entre los más usados se encuentran el Fe, Ru, Os, Co, Rh, Ir, Ni, Pd, Pt y sus aleaciones. Los materiales nobles como el Pt y el Ir, poseen una alta actividad catalítica, así como una buena resistencia a la corrosión, sin embargo estos materiales son muy caros, por lo que se ha optado por materiales de bajo costo como el Fe, Ni y Co para ser usados como cátodos en la electrolisis alcalina. Los electrodos de Ni y de acero recubiertos con Ni son unos de los materiales para electrodo más utilizados, ya que poseen una alta resistencia a la corrosión, especialmente a altas temperaturas (por arriba de los 80°C), así como también en concentraciones altas de electrolito.

Los electrolizadores alcalinos son usados en todo el mundo para la producción de hidrógeno con un 99.8% de pureza, operan de 1.8 a 2.2 V, con densidades de corriente por debajo de los 0.4 mA cm<sup>-2</sup>. Presentan una eficiencia entre el 60-80%, la velocidad de producción de hidrógeno es de 0.01 y 10 m<sup>3</sup> h<sup>-1</sup>

Para llevar a cabo el electrolisis se requiere una celda electroquímica de tres electrodos: un electrodo de trabajo, que hace contacto con el

electrolito, al cual se aplica el potencial deseado de una manera controlada con respecto del electrodo de referencia y facilitar la transferencia de electrones desde y hacia el electrolito. El tercero electrodo (Auxiliar) actúa como la otra semi-celda y su potencial se controla de manera que permita mantener el potencial del electrodo de trabajo constante por un dispositivo electrónico - potenciostato.

# **RESULTADOS Y DISCUSION**

## CARACTERIZACIÓN ANALÍTICA DEL ELECTRODO REVERSIBLE DE HIDRÓGENO

La parte la más importante de un electrodo reversible de hidrogeno ERH es la placa de platino cubierta con nanopartículas de platino que aumenta su superficie. En los experimentos para caracterizar el ERH como sensor de hidrogeno disuelto fue utilizada una celda conductométrica que consta de dos anillos de platino; el que es colocado abajo se utilizó como electrodo generador de hidrogeno y el superior actuó como electrodo indicador (ver la **Figura 13**).

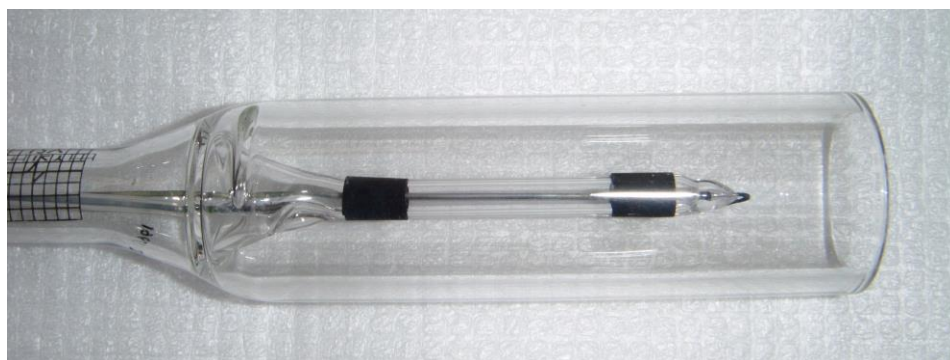


Figura 13. Foto de la celda conductométrica aplicada como ERH

El segundo electrodo de platino generador fue conectado como cátodo a una fuente de voltaje (8), y como ánodo (6) fue utilizado un electrodo de dos alambres de platino (ver la **Figura 14**)

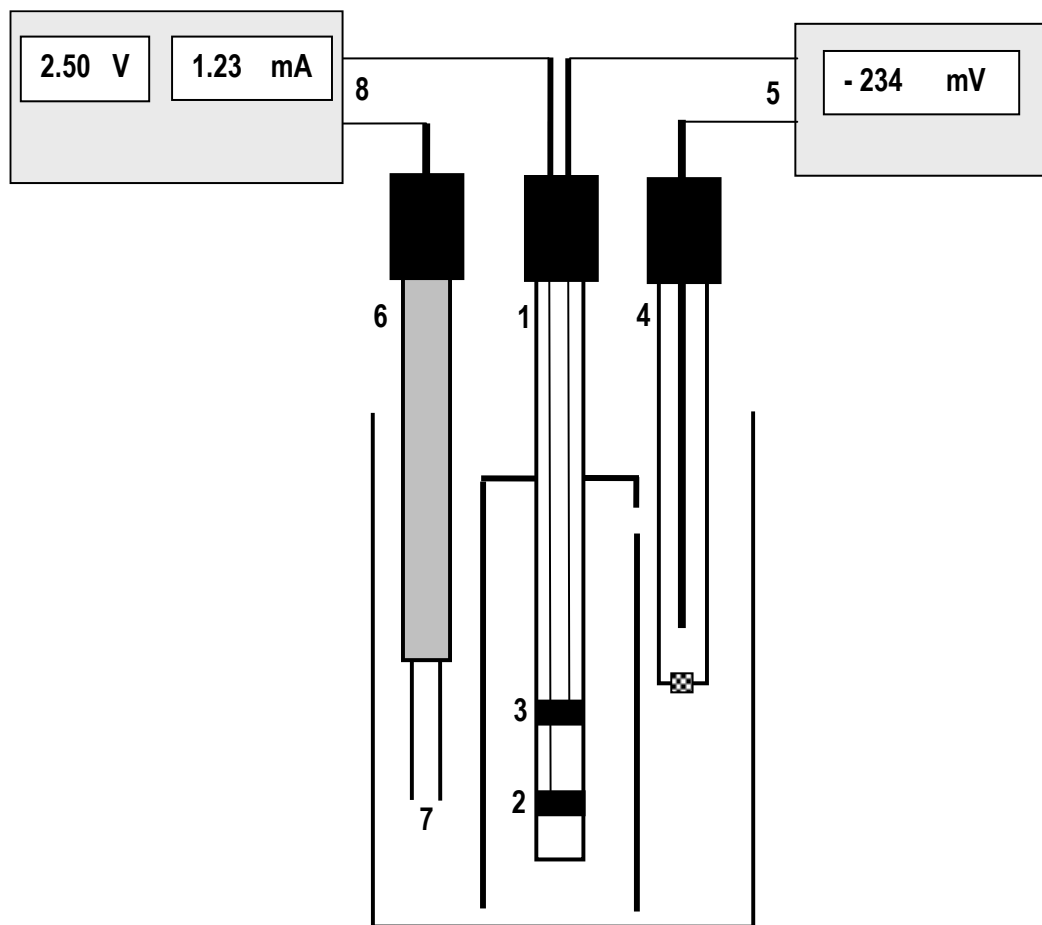


Figura 14. Esquema del equipo aplicado para la caracterización del RHE

El hidrogeno producido en el electrodo no. 2 por electrolisis se concentró alrededor de éste por difusión se dispersaba en todo el volumen limitado por el blindaje alrededor del electrodo no. 1. La cantidad del hidrogeno producido es conocido por el valor del corriente pasado y el tiempo (ley de Faraday), también el volumen saturado con el hidrogeno es conocido que permita calcular la concentración del hidrogeno disuelto alrededor del

electrodo indicador 3. Esta concentración determine su potencial que se mide por un voltímetro 5 con alta impedancia de la entrada, con respecto de un electrodo de referencia 4 de Ag/AgCl.



Figura 15. Equipo real aplicado para la caracterización del RHE

Aplicando la ley de Faraday:  $m = QM/Fn$ , donde:  $m$  es la masa de  $H_2$  producido  $Q = I \cdot t$  es la carga eléctrica total,  $M$  es la masa molar del  $H_2$  (gramos/mol)  $F = 96485$  C / mol,  $n = 1$  es el número de valencia del  $H_2$ ; se puede calcular la masa del hidrogeno producido. Tomando en cuenta que la densidad del  $H_2$  es de  $0,0899$  kg/m<sup>3</sup> su masa se convierta en volumen.

La calibración del RHE fue realizada graficando el potencial establecido del electrodo vs  $\frac{1}{2} \ln[H_2]$ , de acuerdo con la ecuación [2]. Primeramente, la solución se saturó por la generación de  $H_2$  durante 30 minutos logrando la

concentración máxima para la temperatura actual de 25 °C. Entonces el potencial del RHE correspondiente a la concentración máxima se midió y se encontró: -244 mV frente a Ag/AgCl, KCl 3M.

El valor de la concentración máxima de H<sub>2</sub> (saturado) se calculó tomando en cuenta la solubilidad de H<sub>2</sub> a 1 bar de presión y 25 ° C de temperatura igual a 1,55 mg/L y la presión parcial de H<sub>2</sub> en el aire igual a 0,00005 bares. *Se encontró que la concentración de H<sub>2</sub> saturada es 61 µg/L.*

Dado que en una concentración de H<sub>2</sub> igual a cero el potencial tienden a ser infinito [ln (0)] como se ve a partir de la ecuación [2], con el fin de obtener diferentes valores para la concentración de H<sub>2</sub> disuelto y para la construcción de la curva de calibración en coordenadas:  $\frac{1}{2} \ln [H_2]$  vs potencial RHE, se pueden aplicar dos métodos independientes:

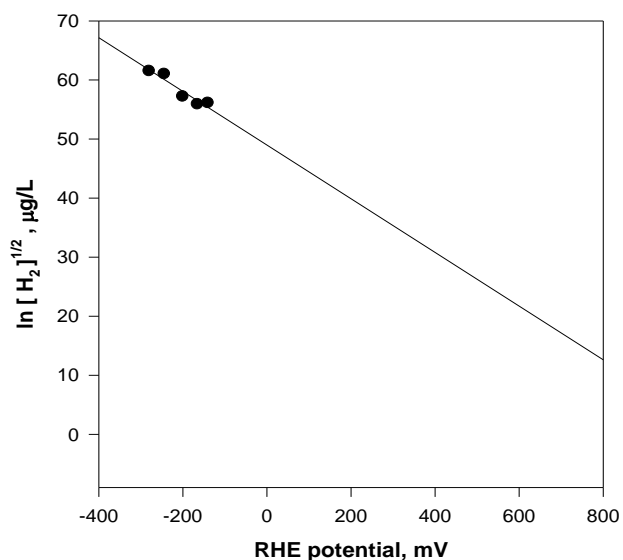


Figura 16. Curva de calibración de RHE como sensor de hidrógeno

1. Cambiando la temperatura de 20°C a 40°C con un escalón de 5°C, resulta en los correspondientes cambios de la solubilidad de H<sub>2</sub>, y por lo tanto, cambia la concentración del equilibrio del H<sub>2</sub>. Los valores correspondientes al potencial del RHE después de las correcciones de temperatura, fueron graficados de acuerdo con el término  $(RT / nF)$  de la ecuación de Nernst [2].
2. Aplicando pequeños pulsos de voltaje consecutivos en el electrodo de Pt generador de H<sub>2</sub> se obtiene un incremento escalonado en la concentración del H<sub>2</sub> disuelto, teniendo en cuenta la cantidad de la electricidad del pulso evaluado calculado por la ley de Faraday.

Se eligió el primer método en lugar del segundo, dada la manera empírica en la determinación de la duración de pulsos y la pausa entre ellos empleada en el segundo método.

El monitoreo de los potenciales del RHE proporciona información que puede ser fácilmente convertida en el volumen de H<sub>2</sub> generado biológicamente empleando una curva de calibración, y por lo tanto calcular el rendimiento del proceso.

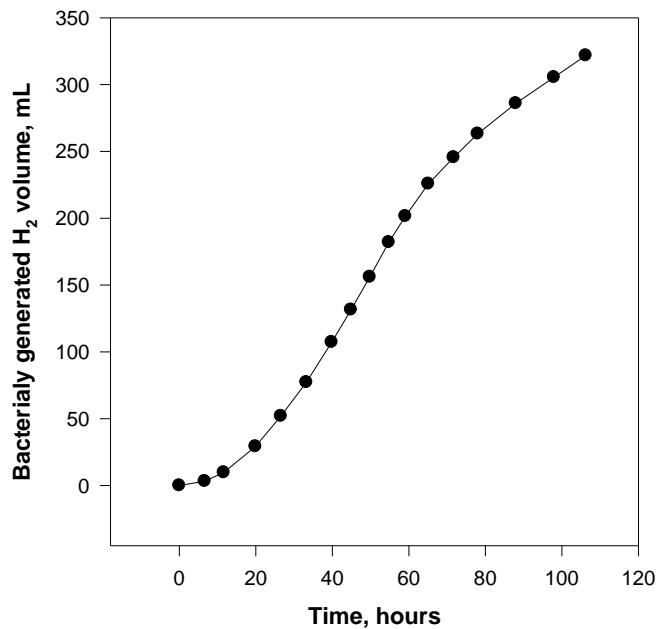


Figura 17. Curva de generación de H<sub>2</sub> calculada por la aplicación de curva de calibración utilizando el potencial de RHE monitoreado

Una curva típica en coordenadas: Volumen generado de H<sub>2</sub> vs el tiempo, calculado por el monitoreo del potencial del RHE en un reactor de 100 ml es presentado en la **Figura 17**, fue construida utilizando los cambios en los valores potenciales en el REH durante un periodo de tiempo conocido. La tasa de generación de H<sub>2</sub> de 5,49  $\mu$ l/hora se determinó con la aplicación de un reactor de 100 ml.

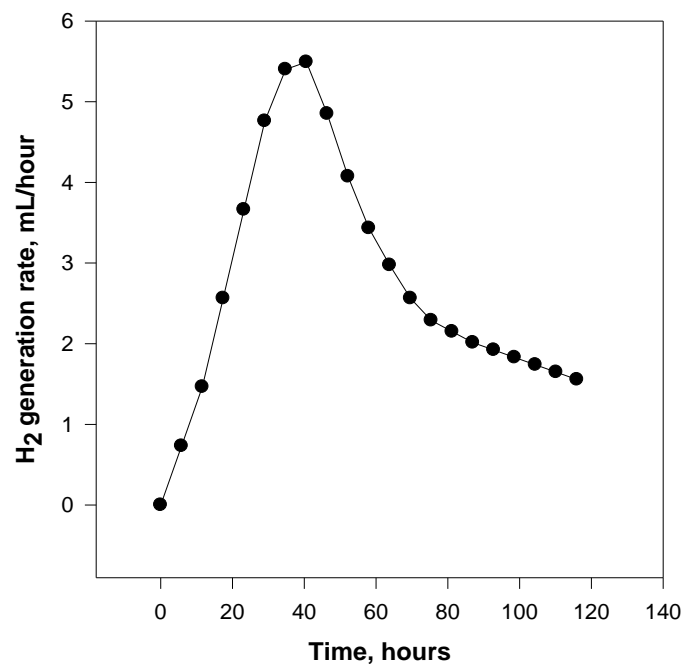


Figura 18. Curva cinética de generación de H<sub>2</sub> construido con el monitoreo de cambios de potencial en el RHE.

Las mediciones precisas para volúmenes de gas muy pequeños, medidos en micro litros imposibilitan la construcción de ésta curva aplicando métodos volumétricos. Por ello, el RHE parece ser la herramienta adecuada para la medición de la optimización de la producción de H<sub>2</sub> bacteriana.

La curva de cinética correspondiente a la tasa de generación de H<sub>2</sub> frente al tiempo se muestra en la **Figura 18**.

## SENSOR VOLTAMÉTRICO DE HIDROGENO Y SU CARACTERIZACIÓN ANALÍTICA

Durante la realización de éste trabajo se diseñó un sensor voltamperométrico para el análisis de la producción de Hidrógeno en una celda electrolítica, desarrollado con materiales como el Cloruro de Polivinilo (PVC), tubo de plástico especializado que se utiliza en sistemas de agua.. Para éste sensor se empleó material PVC del calibre 40. También se emplearon piezas de Cloruro de Polivinilo clorado (CPVC) que es un tipo especial de PVC calibre 40.

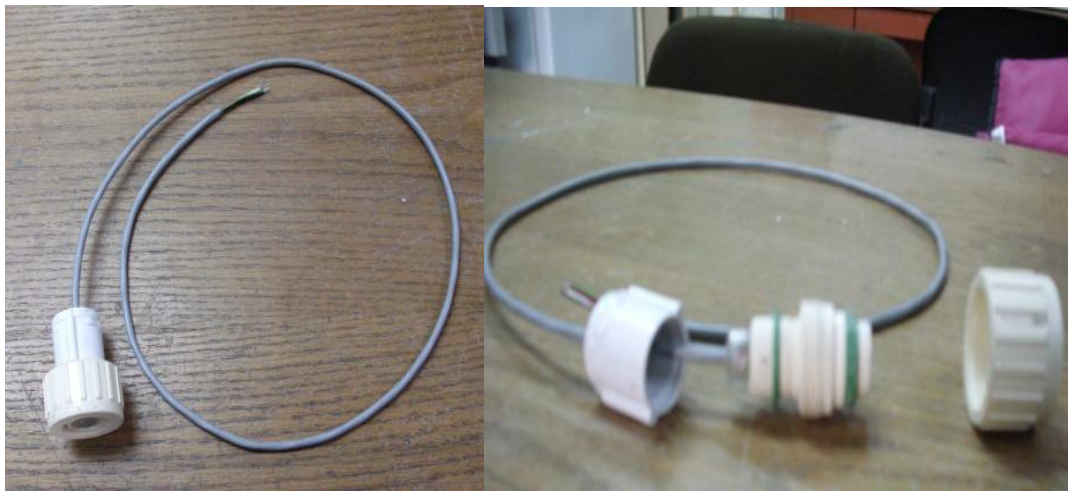


Figura 19. Sensor Voltamétrico de Hidrógeno - construcción

Dentro del cuerpo del sensor hecho de acrílico se encuentran otras piezas tales como los electrodos de trabajo, referencia y auxiliar de paladio, plata y platino, sellos/empaques tipo O-rings.



Figura 20. Cuerpo interno del Sensor Voltamétrico de Hidrógeno

Los electrodos están inmersos en ácido clorhídrico el cual está contenido en la cavidad constituida por el cuerpo de PVC y una membrana de polietileno de baja densidad transparente a todos los gases que puedan difundir a través de ella generar una respuesta de corriente al potencial.



Figura 21. Componentes del Sensor Voltamétrico de Hidrógeno: Cuerpo de PVC, membrana de polietileno y ácido Clorhídrico

Al electrodo de trabajo de paladio, que hace contacto con el electrolito, se aplica el potencial deseado de una manera controlada con respecto del electrodo de referencia y facilitar la transferencia de electrones desde y hacia el analito.

Teniendo éstos componentes, se procedió al ensamblado del sensor, donde el primer paso es la colocación de la membrana sobre el cuerpo de PVC, sujetándola con uno de los empaques, verificando que al finalizar la colocación se tenga una superficie lisa y tensa, ya que ésta estará en contacto directo con los electrodos del sensor.

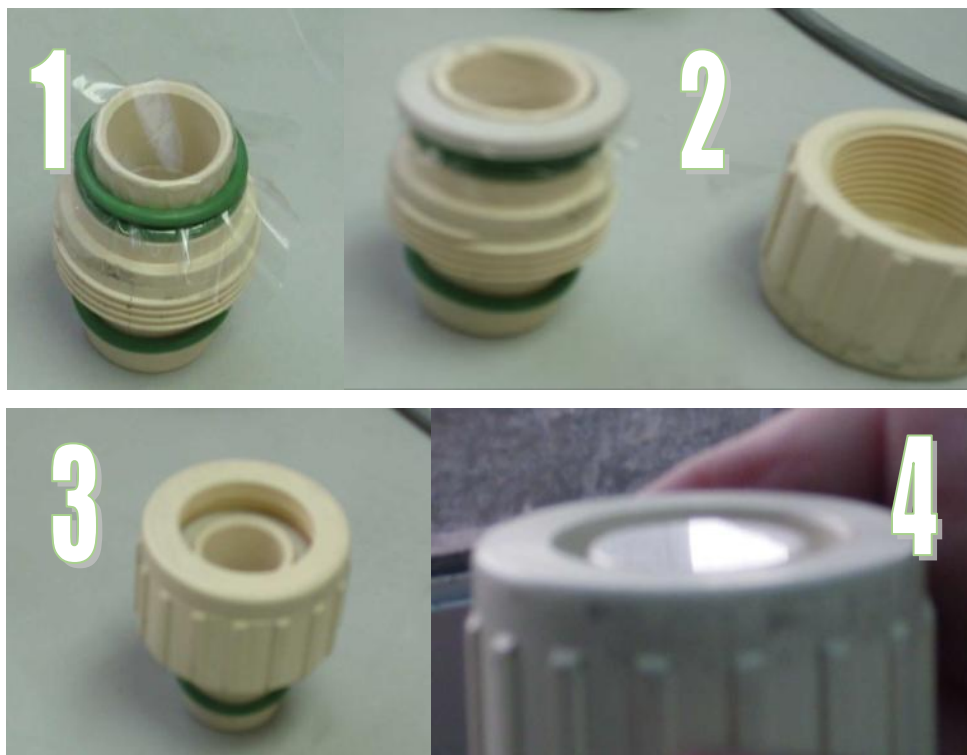


Figura 22. Ensamble del Sensor Voltamétrico de Hidrógeno, primera parte

Después se coloca un nuevo empaque para introducirlo en el cuerpo externo (CPVC) como esta mostrado a las figuras siguientes.

Posteriormente se vierte HCl y se introduce el cuerpo con los electrodos. En éste punto se tiene especial cuidado con el líquido contenido del cual, el excedente es liberado por medio de una pequeña perforación realizada en el cuerpo de PVC y posteriormente es sellada con otro de los empaques empleados. Finalmente se ensambla la pieza que cierra y sujeta el sensor quedando así listo para ser utilizado.

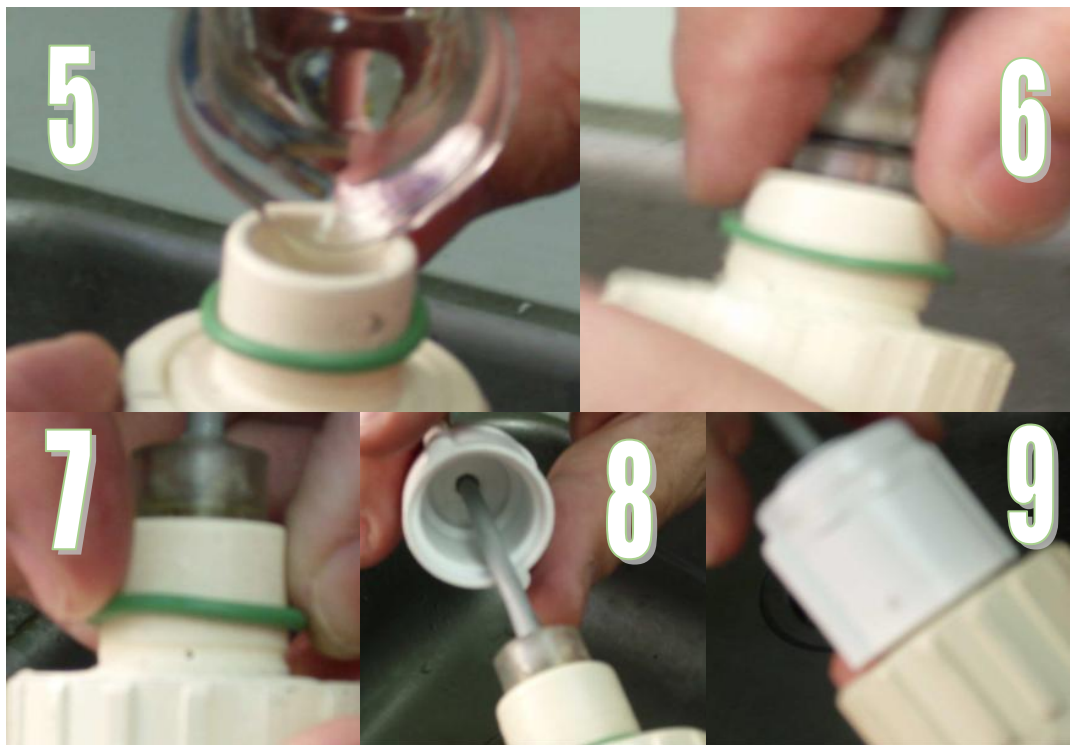


Figura 23. Ensamble del Sensor Voltamétrico de Hidrógeno, segunda parte

Al final se obtiene el sensor listo (**Figura 24**) y se conecta al equipo de medición (**Figura 25**).



Figura 24. Vista del sensor listo para ser utilizado. Debajo de la membrana transparente se encuentra el multielectrdo de paladio (trabajo), referencia (plata) y como una espiral alrededor, el electrodo auxiliar (platino).



Figura 25. Vista del sensor voltamétrico conectado al equipo de medición.

La celda electrolítica usada para la calibración del sensor voltamétrico consta de: ánodos y cátodo de acero inoxidable, inmersos en una solución de hidróxido de potasio (KOH). Al agregar corriente se aprecia la reacción de electrolisis, en forma de burbujas de  $O_2$  en el ánodo y de  $H_2$  en el cátodo. Se agrega una manguerilla de escape para evidenciar la presencia del gas ( $H_2$ ) en la celda.



Figura 26. Celda utilizada para la generación de hidrógeno y calibración del sensor



Figura 27. El hidrogeno generado forma burbujas en el compartimiento catódico

La naturaleza del hidrogeno generado en el compartimiento catódico fue comprobada por fuego, como mostrado a la **Figura 28**



Figura 28. Naturaleza del hidrogeno generado en el compartimiento catódico comprobada por fuego



Figura 29. Ilustración del funcionamiento del generador 1



Figura 30. Ilustración del funcionamiento del generador 2

## CARACTERIZACIÓN DEL SENSOR POR UNA CONCENTRACIÓN DEL HIDROGENO SUBIENDO LINEALMENTE.

Se registró la respuesta del sensor sumergiendo en el comportamiento catódico de la celda de electrolisis del agua donde fue aplicada un corriente constante provocando generación del hidrogeno proporcional al tiempo pasando.

De acuerdo con la ley de Faraday una cantidad de electricidad de 1 Ah (amper/hora) puede descomponerse 0.336 g H<sub>2</sub>O produciendo: **0.419 Litros de H<sub>2</sub> + 0.209 Litros O<sub>2</sub>**

Tomando en cuenta la pérdida de electricidad de 10% durante el electrolisis del agua para el calentamiento del electrolito (un valor determinado experimentalmente), se calcula la cantidad real de hidrogeno producido por 1 Ah de electricidad para el volumen **V<sub>H2</sub>** del hidrogeno producido se obtiene el valor:

**V<sub>H2</sub> = 0.419 \* 0.9 = 0.377 L/Ah**, que permita convertir el tiempo en volumen de hidrogeno.

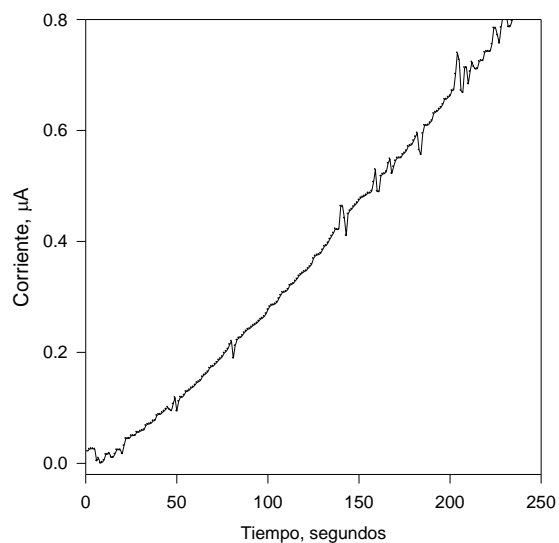


Figura 31. Respuesta del sensor voltamétrico a la concentración

Un experimento parecido fue realizado durante un tiempo casi 4 veces más largo con interrupción del corriente que resulto una curva con escalones los cuales corresponden a los momentos de interrupción y respectivamente a las concentraciones establecidas del hidrogeno disuelto.

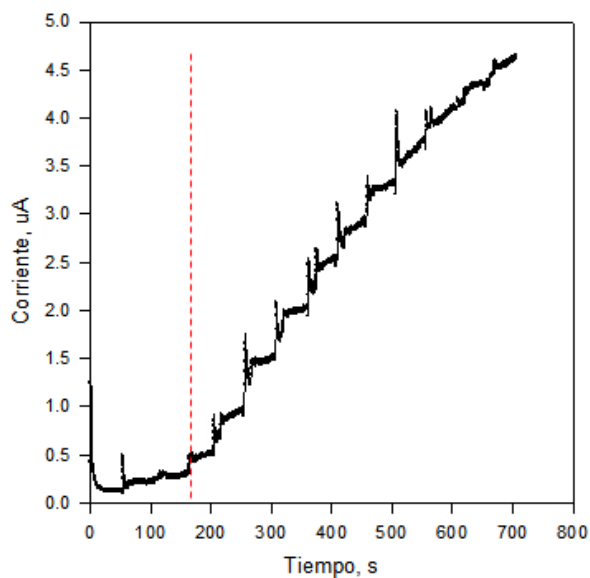


Figura 32. La respuesta del sensor voltamétrico durante el experimento con interrupción del corriente

La interrupción de la corriente permite que se establezcan las concentraciones del hidrogeno producidos durante el tiempo de interrupción y eliminar de esta manera el efecto del tiempo de la respuesta del sensor que influye mucho en el experimento de crecimiento de la concentración de manera lineal. A partir de los valores establecidos se puede construir la curva de calibración del sensor, presentada en la **Figura 33**. De esta curva se ve que para concentraciones más grandes del hidrogeno la respuesta pierde su linealidad que se puede explicar con la saturación de la solución acuosa con hidrogeno disuelto acercándose a la concentración máxima de la saturación para la temperatura establecida.

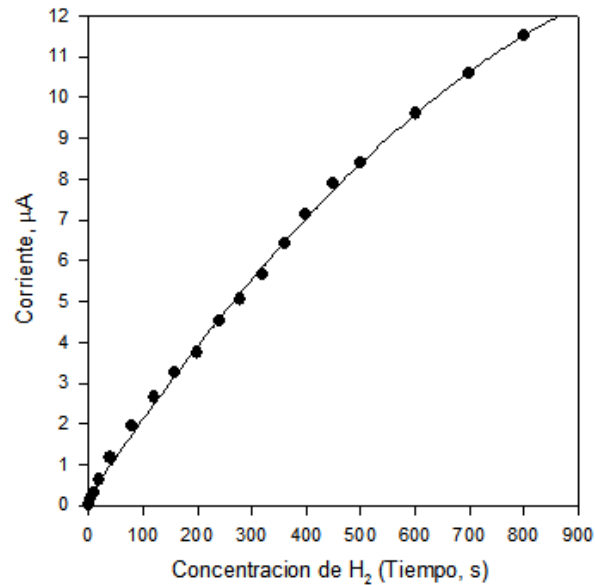


Figura 33. Curva de calibración del sensor voltamétrico de hidrógeno

### DETERMINACIÓN DEL LÍMITE DE DETECCIÓN DEL SENSOR VOLTAMETRIC.

El límite de detección es la concentración del hidrogeno disuelto que genera respuesta la amplitud del cual es al mínimo 3 veces más grande que el ruido total generado por el sensor (criterio de  $3\sigma$ ).

Para determinar este parámetro primero se registró la curva de la respuesta del sensor en ausencia de hidrogeno (blanco)(**Figura 34**). Esta curva realmente representa el ruido generado por el sensor y permita aplicar el criterio de  $3\sigma$ .

La generación del hidrogeno se realiza por electrolisis aplicando un corriente de baja densidad, que se aumenta hasta que se registra una respuesta del sensor detectable, que tiene amplitud 3 veces más grande que el ruido (la amplitud de la desviación de la curva del blanco).

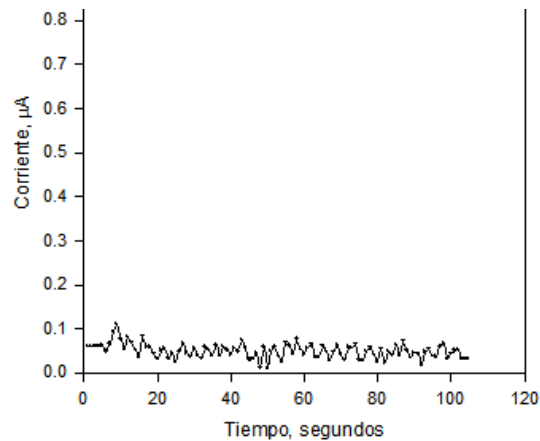


Figura 34. La curva del ruido del sensor voltamétrico (la curva del blanco)

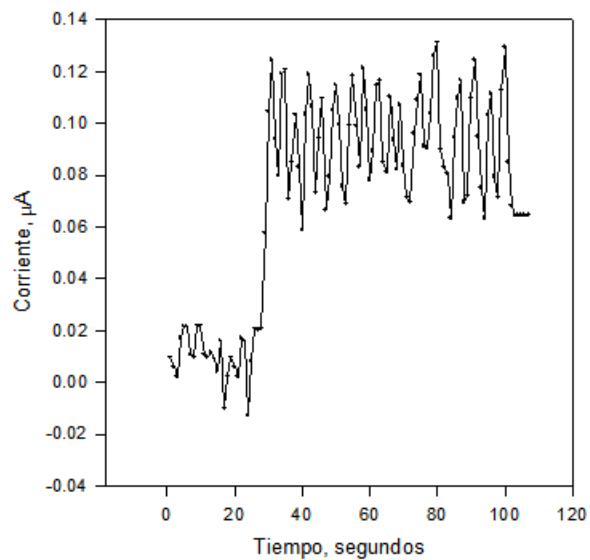


Figura 35. La respuesta del sensor voltamétrico para concentraron de hidrogeno igual al límite de detección del sensor

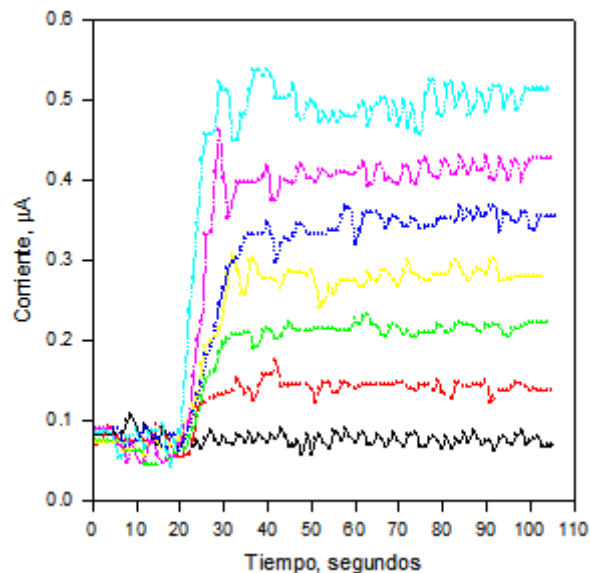


Figura 36. La respuesta del sensor voltamétrico para concentraciones de hidrógeno.  
Respuesta lineal del sensor

## APLICACIONES DE LOS SENSORES DESARROLLADOS EN MONITOREO DEL PROCESO DE PRODUCCIÓN BACTERIANA FOTOSINTÉTICA DE HIDROGENO

El sensor voltamétrico fue aplicado para determinar las interacciones entre los parámetros de los cuales depende la velocidad de la producción del hidrogeno, mientras el sensor potenciométrico fue aplicado para el control del proceso bacteriano fotosintético ya establecido. La diferencia proviene de la construcción de los sensores – el sensor voltamétrico tiene una membrana que separa el sensor (el electrodo indicador) del medio mientras en el caso del sensor potenciométrico el electrodo indicador está

en contacto directo con el medio. De esta manera, el sensor voltamétrico es protegido de contaminantes.

Una interacción entre dos parámetros significa que el efecto de un factor depende del nivel del otro. En las **Figuras 37 y 38** se muestra la interacción de la concentración de lactato y la intensidad de la luz en buferes de Bórax (borato) y KPi (fosfato de potasio) respectivamente. Las líneas de respuestas no son paralelas y se observan grandes variaciones para concentraciones altas de lactato. El efecto de la concentración de lactato en la producción de H<sub>2</sub> depende del valor de la intensidad de la luz. Este efecto es más importante con una intensidad de luz alta (30,000 lux), que a baja intensidad (8,000 lux). La tendencia de esta interacción se observa tanto en el buffer KPi como en el Bórax. Esta correlación se observó previamente en un estudio (Obeidet *et al.*, 2009) para una cepa mutante de *R. capsulatus* súper productora de hidrógeno. La producción de hidrógeno se incrementó a medida que incrementaba la intensidad lumínica de 3,000 a 30,000 lux y alcanzó mejores valores de producción para el intervalo de 30,000 a 50,000 lux. La influencia de estos dos factores juntos no había sido estudiada antes, los resultados conseguidos anteriormente se obtuvieron de una metodología de experimentación de un factor a la vez (OFAT por sus siglas en inglés)(Kim *et al.*, 2006; Das, 2009).

Las barras perpendiculares en los extremos de las líneas representan la mínima diferencia significativa entre los resultados (95% de confianza). Si estas barras se superponen representa que no hay ninguna diferencia

significativa entre los dos puntos. Las líneas rojas indican el valor máximo del factor estudiado y las negras el valor mínimo.

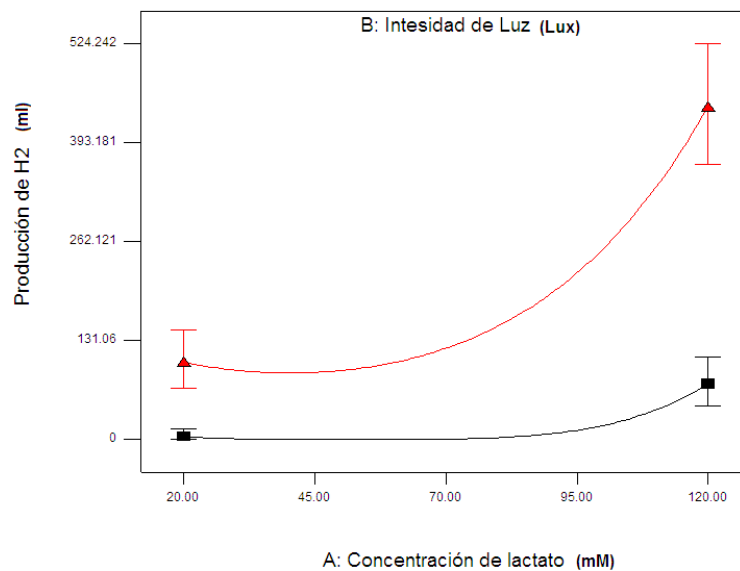


Figura 37. Interacción Lactato-Luz (Bórax). (rojo) 30,000 lux (negro) 8,000 lux

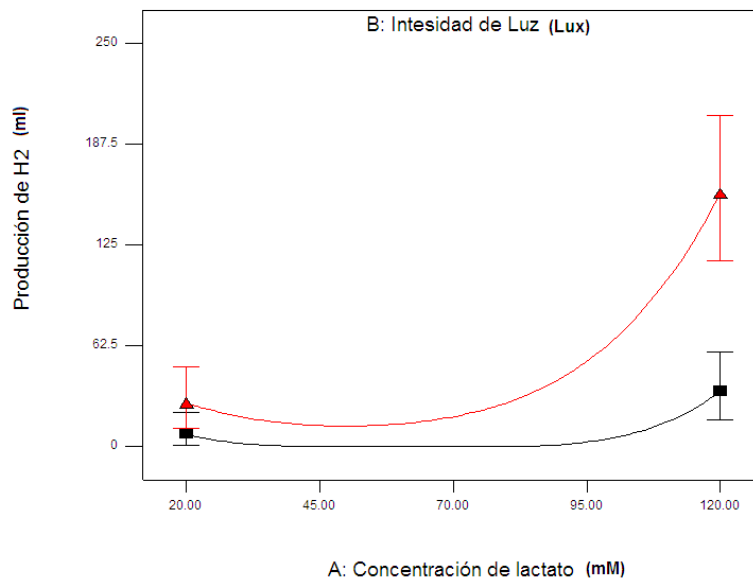


Figura 38. Interacción Lactato-Luz (KPi). (rojo) 30,000 lux (negro) 8,000 lux

Existe también una interacción entre la concentración de hierro y de lactato.

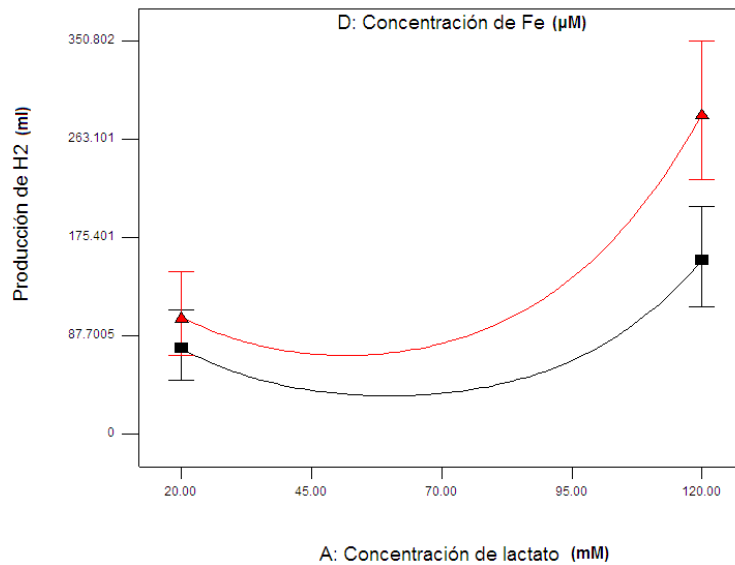


Figura 39. Interacción Lactato-Fe (KPi). (rojo) 200  $\mu\text{M}$  (negro) 43  $\mu\text{M}$

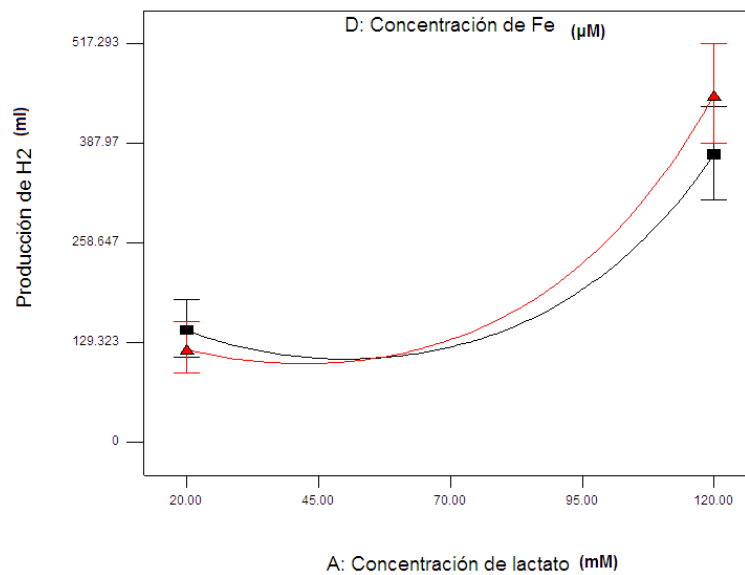


Figura 40. Interacción Lactato-Fe (Bórax). (rojo) 200  $\mu\text{M}$  (negro) 43  $\mu\text{M}$

Las líneas para la producción de hidrógeno no son totalmente paralelas en ningún intervalo de concentración de lactato, esto demuestra que el efecto que la concentración de hierro tiene sobre la producción de hidrógeno depende de los valores de la concentración de lactato. Este efecto es más pronunciado para el buffer KPi que para el buffer Bórax como se puede observar en las **Figuras 39 y 40** respectivamente.

El sensor voltamétrico fue aplicado para determinar la producción del hidrogeno en función de las concentraciones de lactato y Fe para el buffer Kpi. La superficie de respuesta tridimensional está representada en la **Figura 41**. Esta tiene forma de superficie cóncava. La mínima producción de H<sub>2</sub> (214 ml) dio como resultado de una concentración inicial de lactato de 58 mM y de Fe de 40  $\mu$ M.

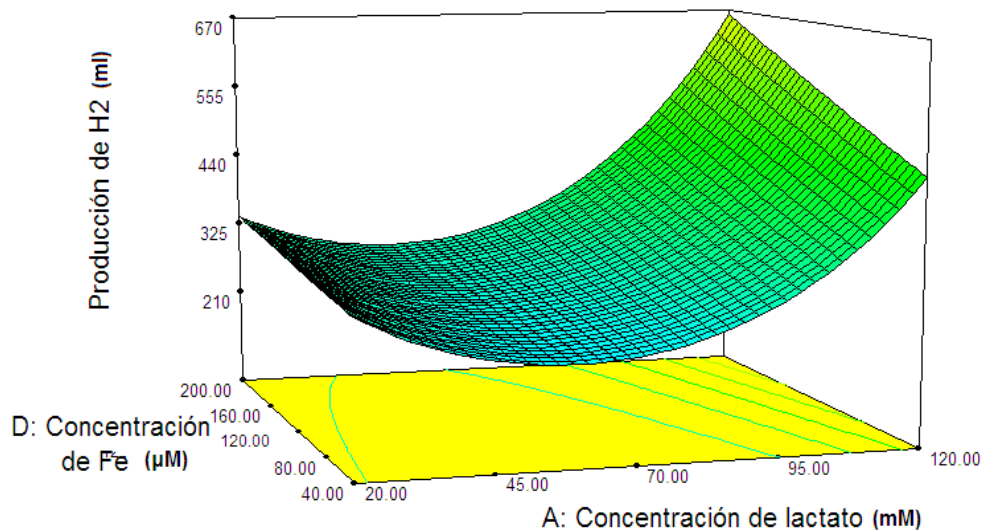


Figura 41. Superficie de Respuestas Fe-Lactato (Borax).

Los 4 extremos de la superficie presentan valores diferentes. La máxima producción de H<sub>2</sub> (662 ml) se produjo cuando las concentraciones de lactato y Fe fueron 120 mM y 200  $\mu$ M, respectivamente. Los otros 3 extremos tuvieron valores 468 ml (120 mM, lactato, 40  $\mu$ M de Fe), 297 ml (20 mmol de lactato, 40  $\mu$ M de Fe), y 337 ml (20 mmol de lactato, 200  $\mu$ M Fe). Como se puede observar al incrementar la concentración de Fe de 40 a 200  $\mu$ M a la concentración de 120 mM de lactato se obtuvo aumento 41.4% y de 13.5% para 20 mM de lactato. Este incremento es lineal en función de la concentración de hierro.

En función de lactato y la intensidad de luz, la superficie 3D-respuesta mostró una forma de silla de montar **Figura 42**. El óptimo de producción de H<sub>2</sub> (662 ml) se obtuvo cuando la concentración de lactato fue de 120 mM y la intensidad de la luz 22.400lux.

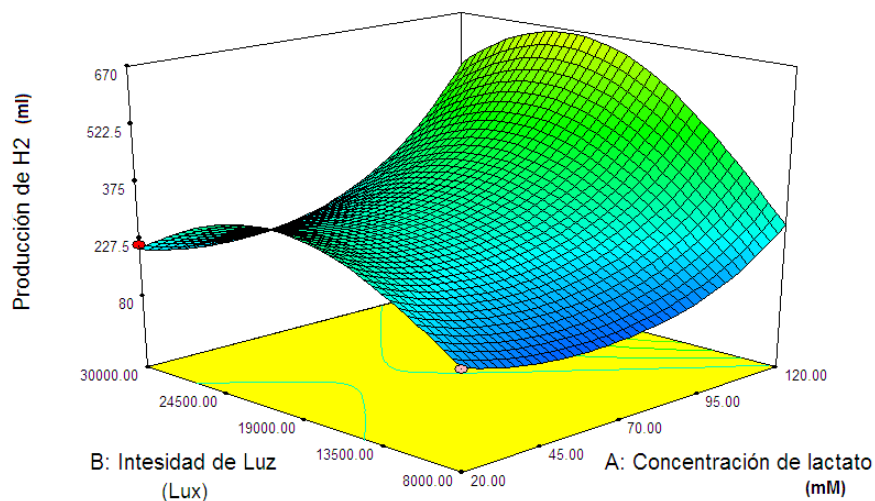


Figura 42. Superficie de Respuestas Luz-Lactato (Borax).

A una intensidad lumínica baja (8.000 lux), la producción de H<sub>2</sub> fue una curva en función de la concentración de lactato: 140 ml de H<sub>2</sub> (20 mM de lactato), 88 ml H<sub>2</sub> (56mM) y 272 ml (120 mM). En alta intensidad lumínica (30.000 lux), esta no linealidad fue más marcada: 203ml (20 mM de lactato), 171 ml (46 mM de lactato), y 530 ml (120 lactato mM). Esta superficie de producción de H<sub>2</sub> mostró un grado de curvatura importante para una concentración de 120mM de lactato y en el intervalo de intensidad de la luz 8,000-25000 lx. Para una mayor intensidad de la luz, la producción de H<sub>2</sub> decrece rápidamente.

# CONCLUSIONES

## CONCLUSIONES

### **1. Fueron desarrollados y caracterizados analíticamente dos tipos de sensores de hidrógeno: potenciométrico y voltamétrico.**

Se demostró la viabilidad del empleo del sensor voltamperométrico desarrollado como una herramienta eficaz en la medición y evaluación de la producción de Hidrógeno, en la experimentación empleando un reactor de volumen de 10 mL, el cual es apropiado en comparación de otros métodos en los cuales se requiere la aplicación de reactores de mayor volumen, consumiendo así grandes cantidades de reactivos en cada experimentación que se realiza y cuyo tiempo de respuesta es más lento. Su empleo es adecuado para el registro de información en tiempo real de la producción de Hidrógeno dentro del reactor y de ésta manera conocer de manera saber si el funcionamiento del reactor es correcto y/o si se tiene presencia de algún factor que interfiera con la producción del Hidrógeno.

### **2. Los dos tipos de sensores de hidrógeno desarrollados fueron aplicados para monitorear en tiempo real la concentración de hidrógeno disuelto producido en un reactor bacteriano fotosintético con bajo volumen.**

### **3. Los resultados del monitoreo en tiempo real fueron aplicados para optimizar el funcionamiento del reactor fotosintético bacteriano para generación de hidrogeno**

La medición en tiempo real de la concentración del hidrógeno producido permutara la aplicación de reactores fotosintéticos pequeños con volúmenes del rango de varios mililitros en optimización experimental del proceso. También experimentos de optimización van a durar no más que varios minutos para cada una de las combinaciones de los valores de las variables. La aplicación de este enfoque permitirá encontrar rápido y económicamente las condiciones óptimas para producción máxima de hidrógeno, a partir de cualquier fuente nutritiva disponible localmente habitualmente desechos industriales de industrias alimenticias.

# REFERENCIAS

Azbar, N., Çetinkaya Dokgöz, F., Keskin, T., Korkmaz, K.S., Syed, H.M., 2009. Continuous fermentative hydrogen production from cheese whey wastewater under thermophilic anaerobic conditions. *International Journal of Hydrogen Energy* 34, 7441–7447.

Basak, N., Das, D., 2007. The prospect of purple non-sulfur (PNS) photosynthetic bacteria for hydrogen production: the present state of the art. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 23, 31–42.

Bedoya, A., Castrillón, J.C., Ramírez, J.E., Vásquez, J.E., Zabala, M.A., 2008. Producción biológica de hidrógeno: una aproximación al estado del arte. *Dyna* 75, 137–157.

Bolliger, R., Zürrer, H., Bachofen, R., 1985. Photoproduction of molecular hydrogen from waste water of a sugar refinery by photosynthetic bacteria. *Applied microbiology and biotechnology* 23, 147–151.

Boulet, M., Marier, J., 1961. Precipitation of calcium phosphates from solutions at near physiological concentrations. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 93, 157–165.

Cai, Yu; Anderson, Alfred B. (2004). "The reversible hydrogen electrode: potential-dependent activation energies over platinum from quantum theory". *The Journal of Physical Chemistry B* 108 (28): 9829. [doi:10.1021/jp037126d](https://doi.org/10.1021/jp037126d).

Das, D., 2009. Advances in biohydrogen production processes: An approach towards commercialization. *International Journal of Hydrogen Energy* 34, 7349–7357.

Davila-Vazquez, G., Alatríste Mondragón, F., de León Rodríguez, A., Razo Flores, E., 2008. Fermentative hydrogen production in batch experiments using lactose, cheese whey and glucose: influence of initial substrate concentration and pH. *International Journal of Hydrogen Energy* 33, 4989–4997.

Davila-Vazquez, G., Cota-Navarro, C.B., Rosales-Colunga, L.M., de León-Rodríguez, A., Razo-Flores, E., 2009. Continuous biohydrogen production using cheese whey: Improving the hydrogen production rate. *International Journal of Hydrogen Energy* 34, 4296–4304.

Dicks A.L., Bradley J., Alexander D. T., 2008. Australian Hydrogen Activity.

82 Evaluación experimental de la producción de hidrógeno a partir de suero de leche como sustrato de en la fotosíntesis de microorganismos recombinados de *Rhodobacter capsulatus*

Dutta, D., De, D., Chaudhuri, S., Bhattacharya, S.K., 2005. Hydrogen production by Cyanobacteria. *Microbial Cell Factories* 4, 36.

EIA, US. Energy Information Administration, 2010. World Energy Demand and Economic Outlook.

Eroglu, E., Eroglu, I., Gündüz, U., Türker, L., Yücel, M., 2006. Biological hydrogen production from olive mill wastewater with two-stage processes. *International journal of hydrogen energy* 31, 1527–1535.

Eroglu, E., Gündüz, U., Yücel, M., Türker, L., 2004. Photobiological hydrogen production by using olive mill wastewater as a sole substrate source. *International journal of hydrogen energy* 29, 163–171.

FAO Food and Agriculture Organization, 2009. *Perspectivas Alimentarias, Análisis del Mercado Mundial*.

FAO Food and Agriculture Organization, Statistics Division, 2009. *Producción de Queso Mundial 2009* [WWW Document]. URL <http://faostat.fao.org>

Fascetti, E., D'addario, E., Todini, O., Robertiello, A., 1998. Photosynthetic hydrogen evolution with volatile organic acids derived from the fermentation of source selected municipal solid wastes. *International journal of hydrogen energy* 23, 753–760.

Ferchichi, M., Crabbe, E., Gil, G.-H., Hintz, W., Almadidy, A., 2005. Influence of initial pH on hydrogen production from cheese whey. *Journal of Biotechnology* 120, 402–409.

García, F., 2005. Técnicas de producción del Hidrogeno y rendimientos. ELCOGAS S.A. Conferencia UCLM 29/04/2005 [WWW Document]. URL <http://www.uclm.es/area/amf/Antoine/Fusion/Hidrogeno.pdf>

Gillies, M.T., 1974. Whey processing and utilization. Economic and technical aspects. Noyes Data Corp.

Guerra, A.C., Abascal, E.N., Pacheco, S.V., Alonso, M.P.S., Cruz, C.V., 2012. El hierro. *Elementos* 85, 41–48.

He, D., Bultel, Y., Magnin, J.P., Roux, C., Willison, J.C., 2005. Hydrogen photosynthesis by *Rhodobacter capsulatus* and its coupling to a PEM fuel cell. *Journal of power sources* 141, 19–23.

Jaén, M., 2004. Tecnologías del Hidrógeno y Pilas Combustibles. Presented at the II Jornada Técnicas de Ciencias Ambientales, ARIEMA Energía y Medioambiente, Madrid. Bibliografía 83

Kádár, Z., de Vrije, T., van Noorden, G.E., Budde, M.A., Szengyel, Z., Réczey, K., Claassen, P.A., 2004. Yields from glucose, xylose, and paper sludge hydrolysate during hydrogen production by the extreme thermophile *Caldicellulosiruptor saccharolyticus*. *Applied biochemistry and biotechnology* 114, 497–508.

Kapdan, I.K., Kargi, F., 2006. Bio-hydrogen production from waste materials. *Enzyme and Microbial Technology* 38, 569–582.

Kars, G., Gündüz, U., Yücel, M., Türker, L., Eroglu, İ., 2006. Hydrogen production and transcriptional analysis of *nifD*, *nifK* and *hupS* genes in *Rhodobacter sphaeroides* OU 001 grown in media with different concentrations of molybdenum and iron. *International journal of hydrogen energy* 31, 1536–1544.

Kim, M.S., Baek, J.S., Lee, J.K., 2006. Comparison of H<sub>2</sub> accumulation by *Rhodobacter sphaeroides* KD131 and its uptake hydrogenase and PHB synthase deficient mutant. *International journal of hydrogen energy* 31, 121–127.

Koku, H., Eroglu, I., Gündüz, U., Yücel, M., Türker, L., 2002. Aspects of the metabolism of hydrogen production by *Rhodobacter sphaeroides*. *International Journal of Hydrogen Energy* 27, 1315–1329.

Kolthoff, I., 1925. A new set of buffer mixtures that can be prepared without the use of standardized acid or base. *Journal of Biological Chemistry* 63, 135.

Kruse, B., Grinna, S., Buch, C., 2002. *Hydrogen -Status and Possibilities*. The Bellona Foundation.

Kruse, O., Rupprecht, J., Mussnug, J.H., Dismukes, G.C., Hankamer, B., 2005. Photosynthesis: a blueprint for solar energy capture and biohydrogen production technologies. *Photochem. Photobiol. Sci.* 4, 957–970.

Kumar, N., Das, D., 2001. Continuous hydrogen production by immobilized *Enterobacter cloacae* IIT-BT 08 using lignocellulosic materials as solid matrices. *Enzyme and microbial technology* 29, 280–287.

Levin, D.B., Pitt, L., Love, M., 2004. Biohydrogen production: prospects and limitations to practical application. *International Journal of Hydrogen Energy* 29, 173–185.

Lin, C.Y., Chang, R.C., 2004. Fermentative hydrogen production at ambient temperature. *International Journal of Hydrogen Energy* 29, 715–720.

Macler, B.A., Pelroy, R.A., Bassham, J.A., 1979. Hydrogen formation in nearly stoichiometric amounts from glucose by a *Rhodospseudomonas sphaeroides* mutant. *Journal of bacteriology* 138, 446–452.

84 Evaluación experimental de la producción de hidrógeno a partir de suero de leche como sustrato de en la fotosíntesis de microorganismos recombinados de *Rhodobacter capsulatus*

Melis, A., Melnicki, M.R., 2006. Integrated biological hydrogen production. *International journal of hydrogen energy* 31, 1563–1573.

Minnan, L., Jinli, H., Xiaobin, W., Huijuan, X., Jinzao, C., Chuannan, L., Fengzhang, Z., Liangshu, X., 2005. Isolation and characterization of a high H<sub>2</sub>-producing strain *Klebsiella oxytoca* HP1 from a hot spring. *Res. Microbiol.* 156, 76–81.

Mojica, F., Trujillo, R., Castellanos, D., Bernal, N., 2007. Agenda prospectiva de investigación y desarrollo tecnológico de la cadena láctea colombiana. Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural, Bogotá.

Nath, K., Das, D., 2004. Improvement of fermentative hydrogen production: various approaches. *Applied microbiology and biotechnology* 65, 520–529.

Ni, M., Leung, M.K., Sumathy, K., Leung, D.Y., 2006. Potential of renewable hydrogen production for energy supply in Hong Kong. *International Journal of Hydrogen Energy* 31, 1401–1412.

Obeid, J., Magnin, J.P., Flaus, J.M., Adrot, O., Willison, J.C., Zlatev, R., 2009. Modelling of hydrogen production in batch cultures of the photosynthetic bacterium *Rhodobacter capsulatus*. *International Journal of Hydrogen Energy* 34, 180–185.

Oh, Y.K., Seol, E.H., Kim, M.S., Park, S., 2004. Photoproduction of hydrogen from acetate by a chemoheterotrophic bacterium *Rhodospseudomonas palustris* P4. *International journal of hydrogen energy* 29, 1115–1121.

PNUD, Programa de las Naciones Unidas para el Desarrollo, 2009. Primer autobús de hidrógeno de América Latina recorre las calles de Sao Paulo.

Pouliot, Y., Landry, J., Giasson, J., 1991. Induction of calcium phosphate precipitation in sweet whey permeate Induction de la précipitation phosphocalcique dans le perméat de lactosérum de fromagerie. *Le Lait* 71, 8.

Prince, R.C., Kheshgi, H.S., 2005. The photobiological production of hydrogen: potential efficiency and effectiveness as a renewable fuel. *Critical reviews in microbiology* 31, 19–31.

Rees, D.C., Howard, J.B., 2000. Nitrogenase: standing at the crossroads. *Current Opinion in Chemical Biology* 4, 559–566.

Riis, T., Hagen, E., Vie, P.J.S., Ulleberg, U., 2005. Hydrogen Production—Gaps and Priorities. IEA Hydrogen Implementing Agreement (IEA, Paris, 2005).

Rupprecht, J., Hankamer, B., Mussnug, J.H., Ananyev, G., Dismukes, C., Kruse, O., 2006. Perspectives and advances of biological H<sub>2</sub> production in microorganisms. *Applied microbiology and biotechnology* 72, 442–449. Bibliografía 85

Shi, X.Y., Yu, H.Q., 2005. Optimization of glutamate concentration and pH for H<sub>2</sub> production from volatile fatty acids by *Rhodospseudomonas capsulata*. *Letters in applied microbiology* 40, 401–406.

Shi, X.Y., Yu, H.Q., 2006. Continuous production of hydrogen from mixed volatile fatty acids with *Rhodospseudomonas capsulata*. *International Journal of hydrogen energy* 31, 1641–1647.

Taiz, L., Zeiger, E., 2006. *Plant physiology*. Sunderland: Sinauer.

Tanisho, S., Ishiwata, Y., 1994. Continuous hydrogen production from molasses by the bacterium *Enterobacter aerogenes*. *International journal of hydrogen energy* 19, 807–812.

Urribarrí, L., Vielma, A., Paéz, G., Ferrer, J., Mármol, Z., Ramones, E., 2004. Producción de ácido láctico a partir de suero de leche, utilizando *Lactobacillus helveticus* en cultivo continuo. *Revista Científica* 14.

Valencia, E., Ramírez, M.L., 2009. La industria de la leche y la contaminación del agua. *Ciencia y Cultura Elementos* 16, 27–31.

Vignais, P.M., Billoud, B., Meyer, J., 2001. Classification and phylogeny of hydrogenases1. *FEMS microbiology reviews* 25, 455–501.

Vignais, P.M., Magnin, J.P., Willison, J.C., 2006. Increasing biohydrogen production by metabolic engineering. *International journal of hydrogen energy* 31, 1478–1483.

Vincenzini, M., Balloni, W., Mannelli, D., Florenzano, G., 1981. A bioreactor for continuous treatment of waste waters with immobilized cells of photosynthetic bacteria. *Cellular and Molecular Life Sciences* 37, 710–712.

Vrati, S., Verma, J., 1983. Production of molecular hydrogen and single cell protein by *Rhodospseudomonas capsulata* from cow dung. *Journal of fermentation technology* 61, 157–162.

Wang, C.C., Chang, C.W., Chu, C.P., Lee, D.J., Chang, B.V., Liao, C.S., 2003. Producing hydrogen from wastewater sludge by *Clostridium bifermentans*. *Journal of biotechnology* 102, 83–92.

Weaver, P.F., Wall, J.D., Gest, H., 1975. Characterization of *Rhodospseudomonas capsulata*. *Archives of microbiology* 105, 207–216.

Willison, J.C., Madern, D., Vignais, P.M., 1984. Increased photoproduction of hydrogen by non-autotrophic mutants of *Rhodospseudomonas capsulata*. *Biochemical Journal* 219, 593.

86 Evaluación experimental de la producción de hidrógeno a partir de suero de leche como sustrato de en la fotosíntesis de microorganismos recombinados de *Rhodobacter capsulatus*

Wünschiers, R., Lindblad, P., 2002. Hydrogen in education—a biological approach. *International journal of hydrogen energy* 27, 1131–1140.

Wyld Group, MMA, bwisIP, 2008. Hydrogen Technology Roadmap [WWW Document]. URL <http://www.ret.gov.au>

Yegani, R., Yoshimura, S., Moriya, K., Katsuda, T., Katoh, S., 2005. Improvement of growth stability of photosynthetic bacterium *Rhodobacter capsulatus*. *Journal of bioscience and bioengineering* 100, 672–677.

Yemail, Beatriz, 1999. Cadena Productiva de los Lácteos. Programa cadenas productivas DNP-DDE. Documento de trabajo. Departamento Nacional de Planeación.

Yetis, M., Eroglu, I., Yücel, M., Türker, L., 2000. Photoproduction of hydrogen from sugar refinery wastewater by *Rhodobacter sphaeroides* OU 001. *International journal of hydrogen energy* 25, 1035–1041.

Yigit, D. Ö, Gündüz, U., Türker, L., Yücel, M., 1999. Identification of by-products in hydrogen producing bacteria; *Rhodobacter sphaeroides* OU 001 grown in the waste water of a sugar refinery. *Progress in Industrial Microbiology* 35, 125–131.

Yokoi, H., Mori, S., Hirose, J., Hayashi, S., Takasaki, Y., 1998. H<sub>2</sub> production from starch by a mixed culture of *Clostridium butyricum* and *Rhodobacter* sp. M [h] 19. *Biotechnology letters* 20, 895–899.

Yokoi, H., Saitsu, A., Uchida, H., Hirose, J., Hayashi, S., Takasaki, Y., 2001. Microbial hydrogen production from sweet potato starch residue. *Journal of bioscience and bioengineering* 91, 58–63.

Yu, H., Zhu, Z., Hu, W., Zhang, H., 2002. Hydrogen production from rice winery wastewater in an upflow anaerobic reactor by using mixed anaerobic cultures. *International journal of hydrogen energy* 27, 1359–1365.

Zhang, T., Liu, H., Fang, H.H., 2003. Biohydrogen production from starch in wastewater under thermophilic condition. *Journal of environmental management* 69, 149–156.

Zhu, H., Fang, H.H., Zhang, T., Beaudette, L.A., 2007. Effect of ferrous ion on photo heterotrophic hydrogen production by *Rhodobacter sphaeroides*. *International journal of hydrogen energy* 32, 4112–4118.

Zhu, H., Suzuki, T., Tsygankov, A.A., Asada, Y., Miyake, J., 1999. Hydrogen production from tofu wastewater by *Rhodobacter sphaeroides* immobilized in agar gels. *International journal of hydrogen energy* 24, 305–310.

Zürrer, H., Bachofen, R., 1979. Hydrogen Production by the Photosynthetic Bacterium *Rhodospirillum rubrum*. *Appl Environ Microbiol* 37, 789–793.  
Bibliografía 87

# ANEXOS

**A. COMPARISON BETWEEN POTENTIOMETRIC AND VOLTAMETRIC SENSORS FOR REAL TIME BACTERIAL PHOTOSYNTETIC HYDROGEN PRODUCTION MONITORING.**

**B. REAL TIME *IN-SITU* MONITORING OF HYDROGEN PHOTOSYNTHETIC PRODUCTION RATE BY *RHODOBACTER CAPSULATUS***

**C. DISSOLVED HYDROGEN VOLTAMMETRIC PROBE AND ITS APPLICATION FOR PHOTOSYNTHETIC BACTERIAL HYDROGEN PRODUCTION RATE EVALUATION**

## Comparison Between Potentiometric And Voltametric Sensors For Real Time Bacterial Photosynthetic Hydrogen Production Monitoring

R. Zlatev, M. Stoytcheva, J-P. Magnin, G. Montero, B. Valdez, M. Schorr, A. L. Reyes  
Engineering Institute of the Autonomous University of Baja California, 21280 Mexicali, B.C., Mexico

In a number of biological applications such as nucleic acids and proteins detection, nanoparticles QCM signal amplification was accomplished applying a complicated probe treatment including sandwich hybridization of the surface capture probe, target, and nanoparticles modified probe (probe/target/probe-nanoparticles), or target labeling with nanoparticles by means of ligands [1-5].

This investigation introduces a new very simple and efficient approach for QCM sensor response amplification, developed for hydrolases activity determination. For this purpose, the QCM crystal surface was modified with nanoparticles loaded enzyme substrate. During the enzymatic substrate degradation, the heavier nanoparticles were also released from the sensitive layer together with the substrate degradation products. Nanoparticles removal resulted in QCM signal amplification due to the higher nanoparticles specific mass compared with the specific mass of the substrate, as demonstrated by the following equations:

$$\begin{aligned}\Delta f_1 &= -K\Delta m_s \\ \Delta f_2 &= -K(\Delta m_s + \Delta m_{NP}) \\ \Delta f_2/\Delta f_1 &= 1 + \Delta m_{NP}/\Delta m_s\end{aligned}$$

where  $\Delta f_1$  is the QCM frequency change due to the sensitive layer degradation in the absence of nanoparticles;  $\Delta f_2$  is the QCM frequency change due to the sensitive layer degradation in the presence of nanoparticles;  $m_s$  is the mass of the substrate;  $m_{NP}$  is the mass of the nanoparticles;  $K$  is a constant, depending on the resonant frequency of the fundamental mode of the crystal.

The suggested concept was successfully applied for creating of simple biosensing platforms for lipase and trypsin activity determination in real time using respectively  $\text{SiO}_2$  nanoparticles loaded olive oil and Ag nanoparticles loaded gelatin as enzyme substrates. The amplification of the QCM signal allowed developing the most sensitive method reported until now for lipase activity determination, reaching a detection limit as low as  $1.04 \times 10^{-6} \text{ U mL}^{-1}$ .

Keywords: QCM, nanoparticles, hydrolase activity.

### References

1. X. Jiang, R. Wang, Y. Wang, X. Su, Y. Ying, J. Wang, Y. Li. *Biosens. Bioelectron.*, 2011, 29, 23.
2. T. Liu, J. Tang, M. Han, L. Jiang. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2003, 304, 98.
3. X. Mao, L. Yang, X. L. Su, Y. Li. *Biosens. Bioelectron.*, 2006, 21, 1178.
4. Y. Weizmann, F. Patolsky, I. Willner. *Analyst*, 2001, 126, 1502.
5. N. H. Kim, T. J. Baek, H. G. Park, G. H. Seong. *Anal. Sci.*, 2007, 23, 177.

Presenting author's email: [mschorr2000@yahoo.com](mailto:mschorr2000@yahoo.com)

## Real time *in-situ* monitoring of hydrogen photosynthetic production rate by *Rhodobacter Capsulatus*

R. Zlatev<sup>(1)\*</sup>, M. Stoytcheva<sup>(1)</sup>, C. Iñiguez<sup>(1)</sup>, A-L. Reyes<sup>(1)</sup>, B. Valdez<sup>(1)</sup>, J-P. Magnin<sup>(2)</sup>

<sup>(1)</sup>Engineering Institute of UABC, Blvd. B. Juarez s/n, 21280 Mexicali, B.C. Mexico

<sup>(2)</sup>LEPMI, GP2E, INPG, rue de la Piscine, 38402 Saint Martin d'Herès, France

\*Corresponding author: roumen@uabc.edu.mx

### Abstract

The objective of the present work is the Reversible Hydrogen Electrode (RHE) application as a dissolved hydrogen sensor for real time and *in-situ* evaluation of the bacterial hydrogen production rate employing the B10 variety of the photosynthetic *Rhodobacter Capsulatus* bacterial strain. The precise real time H<sub>2</sub> production monitoring is of great importance to employ small volume bio-reactors which allows minimizing the reagents consumption during the great number of the process optimization experiments. In all the experiments in this work 10 ml containing RCV medium was used.

As known the Reversible Hydrogen Electrode (RHE) potential depends on the pH and the H<sub>2</sub> pressure as well (the latter determine the dissolved hydrogen concentration according to the Henry law):  $E = E_0 + RT/F (\ln a_{H^+} - \ln (p_{H_2}/p_0)^{1/2})$  [1-4]. *Rhodobacter Capsulatus* produce hydrogen at anaerobic conditions which favors the RHE application since the presence of oxygen which may corrupt the results [5].

The hydrogen production rate determined by the RHE application was compared with those obtained with a large volume (4.5 liters) bio-reactor application applying the volumetric method at same conditions. It was found that the results obtained by the two methods fit very well within 3.4%.

[1] PARK YEJUN et al., Journal of Physical Chemistry, C 114, 3688, 2010. [2] ISHIHARA AKIMITSU et al., Electrochimica Acta, 55, 8005-8012, 2010. [3] CHUN JANG H. et al., Journal of the Electrochemical Society, 157, S14, 2010. [4] ZHANG PENG et al., Journal of the Electrochemical Society, 157, B1163, 2010. [5] J. OBEID et al., Int. J. Hydrogen energy 34, 180, 2009.

**Key-words:** Hydrogen, *Rhodobacter Capsulatus*, RHE, photosynthetic bioreactor.

**881**

## **Dissolved Hydrogen Voltammetric Probe and Its Application for Photosynthetic Bacterial Hydrogen Production Rate Evaluation**

*Tuesday, May 13, 2014*

*Grand Foyer, Lobby Level (Hilton Orlando Bonnet Creek)*

*R. Zlatev, M. Stoytcheva, P. A. R. Medina, A. L. Reyes (Universidad Autonoma de Baja California, Instituto*

*de Ingenieria), and J. P. Magnin (LEPMI Grenoble, France)*

As known, the dissolved hydrogen undergoes electrochemical oxidation, the mechanism of which depends on the electrolyte pH. In alkaline solutions the OH participates in the hydrogen oxidation according to the reaction:  $H + OH = H_2O + 2e^-$ , while in acid solutions the electrochemical oxidation is direct:  $H = 2H^+ + 2e^-$ . In both cases electrolyte acidifying occurs because of the OH consumption or H<sup>+</sup> generation, making suitable the application of very acid electrolytes to avoid the sensor characteristics changes caused by a great pH changes over time.

A 3-electrode probe similar to the Clark type oxygen probe construction was proposed, elaborated, and characterized as a dissolved hydrogen sensor. Its analytical characteristics such as LOD, sensitivity, response time, and linear response concentration range were determined as a function of the temperature, membranes materials, the electrolytes composition, and pH. Coulometric controlled electrochemical hydrogen generator was applied for standard solution preparation.

The sensor characterization results are presented and discussed together with the results obtained from its application for the real time determination of the rate of hydrogen production by the varieties B10 and IR3 of the photosynthetic strain *Phodobacter Capsulatus*.

Acknowledgement. This work was supported by CONACyT Mexico: Research grant No. 152961, CONACyT-SENER "Sustentabilidad Energética" 2010-01.