

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA
INSTITUTO DE INGENIERÍA
MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS E INGENIERÍA



**“ Producción fotosintética de hidrógeno utilizando la bacteria
Rhodobacter Capsulatus con luz solar como fuente de energía”**

TESIS PARA OBTENER EL GRADO DE:
DOCTOR EN INGENIERÍA

PRESENTA

César Gonzalo Iñiguez Monroy

DIRECTOR

Dr. Roumen Koytchev Zlatev

CODIRECTOR

Dra. Margarita Stilianova Stoytcheva

Mexicali, B. C.

Diciembre 2011

AGRADECIMIENTOS

- A Dios, por guiarme a la culminación de esta etapa tan gratificante.
- A mis padres, porque gracias a su apoyo y consejos, he llegado a realizar una gran meta, la cual constituye una herencia muy valiosa.
- A mi esposa e hijos, sabiendo que jamás encontraré la forma de agradecer su constante apoyo y confianza, sólo espero que comprendan que mis ideales, esfuerzos y logros han sido también suyos e inspirados en ustedes.
- Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, por la beca que me fue otorgada (No. 89724), gracias a la cual me fue posible dedicar el tiempo necesario a este programa doctoral.
- Al Dr. Benjamín Valdez, director del Instituto de Ingeniería de la Universidad Autónoma de Baja California, y a la Dra. Gisela Montero, subdirectora; por su apoyo durante mi doctorado en el programa MDCl, así como por su apoyo en la realización de estancias de investigación en la Universidad de Antioquia (Colombia), UNAL (Colombia) y la Universidad Autónoma de Guadalajara.
- Al Dr. Roumen Zlatev, por todo el conocimiento compartido durante el proyecto, así como por su calidad humana. Ha sido para mí un auténtico privilegio y honor tenerlo como director, a quien agradezco la gran oportunidad que me ha dado y la confianza que ha depositado en mí en el transcurso de esta tesis doctoral.
- A la Dra. Margarita Stoytcheva, por su siempre amable y oportuna ayuda, tanto como profesora, como codirectora de tesis.
- A la Dra. Mónica Carrillo, por su ayuda durante la etapa experimental de mi proyecto, especialmente con el manejo de las cepas bacterianas.
- Al grupo de trabajo del Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Medicina de la UABC, dirigido por el Dr. Mario Abasolo; les agradezco sus conocimientos compartidos durante la etapa inicial de este proyecto.

-
- A mis sinodales de tesis, Doctores Roumen Zlatev, Margarita Stoytcheva, Benjamín Valdez, Mónica Carrillo y Lidia Vargas, por la revisión de esta tesis.

 - A mis profesores en el programa MDCl, les agradezco su esfuerzo y vocación, gracias a lo cual me ha sido posible conseguir las herramientas necesarias para completar mi proyecto y aspirar a ser Doctor en Ingeniería.

 - A mis amigos y compañeros del Instituto de Ingeniería, les agradezco innumerables momentos gratos, tanto de estudio como de esparcimiento; gracias a los cuales me siento muy contento de pertenecer a este grupo. Al término de esta etapa de mi vida, quiero expresar un profundo agradecimiento a quienes con su ayuda, apoyo y comprensión me alentaron a lograr esta hermosa realidad.

I. Índice General

<i>I. Índice General</i>	i
<i>II. Índice de Figuras y Tablas</i>	iv
• <i>Figuras</i>	iv
• <i>Tablas</i>	xi
<i>III. Objetivos</i>	xiv
1. INTRODUCCIÓN	1
2. REVISION BIBLIOGRÁFICA	4
2.1 SUMINISTRO DE ENERGIA EN EL MUNDO	4
2.1.1 Situación Energética Actual	4
2.1.2 Suministro y Seguridad Energética	8
2.1.3 Situación Energética en México	15
2.2 EFECTOS ADVERSOS DE LOS COMBUSTIBLES	18
2.2.1 Efectos de los Combustibles en la Naturaleza	18
2.2.2 Pronósticos de concentración de dióxido de carbono	20
2.2.3 Políticas de reducción del gas de efecto invernadero	22
2.3 HIDRÓGENO	24
2.3.1 Importancia Estratégica del Hidrógeno	24
2.3.2 Hidrógeno como combustible	27
2.3.3 Aplicaciones actuales del hidrógeno como combustible	31
2.3.4 Producción de Hidrógeno	36
2.3.4.1 Métodos clásicos	36
2.3.4.2 Gasificación de biomasa con posterior conversión	39
2.3.4.3 Tecnología GICC. Gasificación Integrada en Ciclo	40
Combinado	
2.3.4.4 Producción de hidrógeno con energía solar	41
2.3.4.5 Rutas básicas de producción de hidrógeno vía solar	42
2.3.4.6 Descarbonización solar de combustibles fósiles	43
2.3.4.7 Hidrógeno solar y rutas termoquímicas	45
2.3.4.8 Energía eólica e hidrógeno	46
2.3.4.9 Esquemas de producción eólica y su utilización	49
2.3.4.10 Sistema de producción de hidrógeno mediante un	53
convertidor de plasma PCS y un filtro StarCellTM	
2.3.4.10.1 Cámara del sistema convertidor de plasma	55
2.3.4.10.2 Filtro de hidrógeno. StarCell	56
2.3.4.11 Producción de hidrógeno con bioetanol	57
2.3.4.11.1 Reformado de etanol	57

2.3.5	Hidrógeno Biológico	60
2.3.5.1	Bacterias Productoras de Hidrógeno	62
2.3.5.1.1	Fotodescomposición de Compuestos Orgánicos ..	64
2.3.5.1.2	Producción Fermentativa de Hidrógeno	66
2.3.5.1.3	Sistemas híbridos	67
2.3.5.2	Mecanismos de la producción de hidrógeno biológico	68
2.3.5.3	Procesos enzimáticos	71
2.3.5.3.1	Hidrogenasas	72
2.3.5.3.2	Nitrogenasas	75
2.3.5.4	Producción de biohidrógeno “in vitro”	77
2.3.5.5	Microorganismos fotosintéticos	78
2.3.5.6	Substratos y Condiciones de Proceso	81
2.3.5.7	Reactores Fotosintéticos	83
2.3.5.8	<i>Rhodobacter Capsulatus</i>	89
2.4	ELECTRODO REVERSIBLE DE HIDRÓGENO	95
2.4.1	Electrodo Estándar de Hidrógeno	95
2.4.2	Electrodo Reversible de Hidrógeno	96
3.	MATERIALES Y MÉTODOS	98
3.1	GENERACIÓN DE HIDRÓGENO FOTOSINTÉTICO EN REACTOR	98
3.1.1	Bacterias y Medio de Cultivo	98
3.1.2	Curvas de Crecimiento	99
3.1.3	Reactores	100
3.1.4	Preparación de Experimentos de Generación de Hidrógeno	102
3.2	GENERACIÓN DE HIDRÓGENO CON SUERO DE LECHE DE VACA	108
3.2.1	Preparacion del Suero	108
3.2.2	Fermentacion Previa	108
3.3	ELECTRODO REVERSIBLE DE HIDRÓGENO	109
3.3.1	Reactivos	109
3.3.2	Características del RHE	109
3.4	DISEÑO DE REACTORES BIOLÓGICOS FOTOSINTÉTICOS	112
3.4.1	Reactor Plano de Flujo Continuo	112
3.4.1.1	Diseño y Construcción	112
3.4.1.2	Caracterización Hidrodinámica del Reactor	114
3.4.2	Reactor Solar de Lecho Empacado	118
3.4.2.1	Diseño del Reactor	118
4.	RESULTADOS Y DISCUSION	123
4.1	CURVAS DE CRECIMIENTO	123
4.2	GENERACIÓN DE HIDRÓGENO EN REACTOR FOTOSINTÉTICO	125
4.2.1	Producción de Hidrógeno por Tipo de Bacteria	125
4.2.2	Producción de Hidrógeno e Intensidad Luminosa	128
4.2.3	Producción de Hidrógeno con Filtros de Luz	132

4.2.4 Producción de Hidrógeno en Función de la Geometría del Reactor	134
4.3 PRODUCCIÓN DE HIDRÓGENO CON LUZ SOLAR	136
4.3.1 Generación de Hidrógeno Solar con <i>R. Capsulatus</i> B10/IR3	136
4.3.2 Efecto del Regimen de Iluminación	138
4.3.3 Interacción Fuente de Iluminación-Tipo de Bacteria	140
4.3.4 Efecto de la Temperatura	142
4.4 PRODUCCIÓN DE HIDRÓGENO CON SUERO DE LECHE	144
4.5 SENSOR DE HIDRÓGENO	147
4.5.1 Calibración del Electrodo Reversible de Hidrógeno (RHE), como Sensor de Hidrógeno	147
4.5.2 Aplicación del RHE para la Determinación de Parámetros Cinéticos de la Generación de Hidrógeno con Bacterias	150
4.5.3 Determinación del Tiempo de Respuesta del RHE en 1M H ₂ SO ₄	152
5. CONCLUSIONES	154
6. RECOMENDACIONES	156
7. BIBLIOGRAFÍA	157
8. PUBLICACIONES ANEXAS	169
o The Electrochemical Society, ECS Transactions, 33 (26) 87-94 (2011)	A1
o The Electrochemical Society, ECS Transactions, 33 (30) 23-30 (2011)	A2
o 2do Congreso Nacional de Estudiantes de Posgrado del Instituto de Ingeniería, Instituto de Ingeniería-UABC, Maestría y Doctorado en Ciencias e Ingeniería (2010).	A3
o 1er Congreso Nacional de Estudiantes de Posgrado del Instituto de Ingeniería, Instituto de Ingeniería-UABC, Maestría y Doctorado en Ciencias e Ingeniería (2009).	A4
o XIV Simposio en Ciencia de Materiales. Centro de Nanociencias y Nanotecnología, UNAM (2009).	A5
o Coloquio Nacional de Estudiantes de Posgrado del Instituto de Ingeniería, Instituto de Ingeniería-UABC, Maestría y Doctorado en Ciencias e Ingeniería (2008).	A6
o Coloquio Nacional de Estudiantes de Posgrado del Instituto de Ingeniería, Instituto de Ingeniería-UABC, Maestría y Doctorado en Ciencias e Ingeniería (2007).	A7

II. ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

FIGURAS

Figura 1. Evolución de las reservas petroleras mundiales totales, y por pertenencia a la OPEC (Organización de Países Exportadores de petróleo), [7].	9
Figura 2. Reservas mundiales de petróleo probadas, hasta el primero de enero del 2007(izquierda), y distribución geográfica por área de las mismas (derecha), [7].	10
Figura 3. 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 [7].	11
Figura 4. Reservas mundiales de gas natural (izquierda), y producción de gas natural (derecha), en trillones de pies cúbicos [7].	13
Figura 5. Reservas mundiales de carbón, hasta el primero de enero del 2003 [7].	13
Figura 6. Emisiones de dióxido de carbono a nivel mundial por región, relacionadas con la producción de energía en billones de toneladas métricas (izquierda). Emisiones de dióxido de carbono por tipo de combustible en billones de toneladas métricas (derecha), [7].	21
Figura 7. Evolución del uso de combustibles, de acuerdo a su estructura molecular. Con el paso del tiempo, la molécula de combustible ha perdido contenido de carbono, y se ha enriquecido de hidrógeno [9].	30
Figura 8. Automóvil Honda FCX Clarity, desplazado por un motor eléctrico que recibe energía de una celda de combustible de hidrógeno. Actualmente se ofrece en renta al público por \$600 USD al mes [20].	33
Figura 9. Distribución de la producción de hidrógeno por fuente de energía primaria [2].	37

Figura 10. Etapas habituales del proceso de obtención y purificación de hidrógeno [8].	38
Figura 11. Costos de las distintas tecnologías de producción de hidrógeno [2].	42
Figura 12. Des carbonización solar de combustibles fósiles [2].	43
Figura 13. Rutas de producción de H ₂ : termoquímicas y electroquímicas [2].	44
Figura 14. Disociación del agua con óxidos metálicos [2].	46
Figura 15. Electrolizador que funciona con energía eólica [2].	47
Figura 16. Producción distribuida de hidrógeno a partir de aerogeneradores [2].	50
Figura 17. Producción centralizada de hidrógeno a partir de aerogeneradores [2].	51
Figura 18. Comparación de costos utilizando tecnologías distribuida y centralizada [2].	51
Figura 19. Gasificación de equipos electrónicos fuera de uso [2].	55
Figura 20. Sistema procesador de bioetanol (SPB), [2].	58
Figura 21. Clasificación de bacterias productoras de hidrógeno [13].	63
Figura 22. Fotografía microscópica de la bacteria <i>Rhodobacter Capsulatus</i> [100].	91
Figura 23. Clasificación taxonómica de la bacteria <i>Rhodobacter Capsulatus</i> [100].	91

Figura 24 . Izquierda: Bacteria <i>Rhodobacter Capsulatus</i> variedad B10, cultivada en medio solido. Derecha: Cultivo en medio liquido de los tipos IR3 (izq.) y B10 (der) de la misma bacteria.	99
Figura 25. Reactores de vidrio utilizados para la generacion de hidrógeno fotosintetico. Reactor con geometria cilindrica a la izquierda, reactor plano a la derecha.	101
Figura 26 . Lamparas de filamento de tungsteno utilizadas como fuente de iluminacion artificial para el reactor fotosintetico. A la izquierda la configuracion de lampara de 75 W con deflector de aluminio. A la derecha la configuracion de dos lamparas de 75 W sin deflector.	101
Figura 27 . Interior de la incubadora con cuatro reactores de geometria plana, en posiciones con la misma intensidad luminosa incidente. La figura tambien muestra los filtros de colores utilizados en este estudio.	102
Figura 28. Reactor plano en un baño de temperatura controlada, durante la etapa de producción fotosintética de hidrógeno con luz solar.	104
Figura 29. Detalle de la inserción de aguja de calibre grueso para burbujeo de nitrógeno en el medio de cultivo, al lado de una aguja para desalojar nitrógeno así como los gases desplazados al exterior (arriba). Un recipiente de plástico conteniendo nitrógeno fue conectado a la aguja de burbujeo a través de una manguera de plástico transparente (abajo).	105
Figura 30. Vista general del acoplamiento del bioreactor con el sistema de medicion de hidrógeno para dos reactores (arriba) y para cuatro reactores (abajo). El liquido en la probeta esta saturado con hidroxido de calcio. El biogas generado en los reactores es burbujeadado en el seno de este liquido.	106
Figura 31. Detalle de la insercion de la manguera que conduce el biogas al interior del sistema medidor de hidrógeno.	107

Figura 32. Diseño del sistema experimental para la determinación del electrodo reversible de hidrógeno como sensor de hidrógeno.	111
Figura 33. Diseño del reactor fotosintético plano de flujo laminar, mostrando la vista frontal (arriba) y la vista lateral (abajo).	113
Figura 34. Imágenes del sistema de reactor en operación, junto con fuente de poder, lámpara y bomba magnética. En la figura de la izquierda es posible apreciar la capa delgada de flujo laminar de mayor exposición a la fuente luminosa.	114
Figura 35. Grafica de caracterización hidrodinámica del sistema de reactor.	115
Figura 36. Ecuaciones desarrolladas para el cálculo de la velocidad lineal y del tiempo de residencia de las bacterias en la placa interna del reactor.	116
Figura 37. Ecuaciones desarrolladas para el cálculo del número de Reynolds (a) y del tiempo de residencia de las bacterias el área de menor exposición a la luz dentro del reactor (b).	117
Figura 38. Esquema del reactor cilíndrico de lecho empacado con esferas de vidrio, mostrando la formación esperada de una biopelícula en la superficie de las esferas.	119
Figura 39. Esquema general del diseño del reactor fotosintético solar de producción de hidrógeno y sus subsistemas.	120
Figura 40. Detalle de la manguera multicapa que es parte del sistema de enfriamiento propuesto en este diseño.	121
Figura 41. Sistema de direccionamiento solar, el cual cambia de posición a medida que la posición del espejo con respecto al sol cambia en el transcurso del día.	122

Figura 42. Curvas de crecimiento de las bacterias <i>R. Capsulatus</i> tipo B10 e IR3, en función de la absorbancia de luz a 660nm. La evolución de burbujas de biogás comienza en la etapa estacionaria de crecimiento. La absorbancia del tipo B10 es mayor a la del tipo IR3 en esta etapa.	124
Figura 43. Curvas de crecimiento de las bacterias <i>R. Capsulatus</i> tipo B10 e IR3, en función de la biomasa. La evolución de burbujas de biogás comienza en la etapa estacionaria de crecimiento. La concentración de biomasa del tipo B10 es mayor a la del tipo IR3 en esta etapa.	124
Figura 44. Grafica de volumen generado de hidrógeno (ml), en función del tiempo (h), durante los experimentos realizados con lámpara de filamento de tungsteno como fuente de luz, para la bacteria tipo silvestre (izquierda), y la bacteria modificada(derecha). Los reactores fueron colocados a una distancia de 50 cm de la fuente de iluminación. Los datos muestran un volumen total de producción mayor para la bacteria tipo IR3.	126
Figura 45. Grafico de dispersión de la velocidad promedio de producción de hidrógeno (ml/hr), para la producción de hidrógeno de la bacteria silvestre (izquierda), y la modificada (derecha). Los reactores fueron colocados a una distancia de 50 cm de la fuente de iluminación. La velocidad máxima alcanzada es mayor con la bacteria silvestre, aunque la velocidad promedio es mayor con la bacteria modificada.	127
Figura 46. Grafica de volumen de hidrógeno producido por la bacteria modificada (IR3), en función del tiempo y de la distancia con respecto a la fuente de iluminación (lámpara de filamento de tungsteno de 75 W con deflector).	128
Figura 47. Datos promedio de conversión de substrato en hidrógeno, en función del tipo de bacteria y de la distancia de ubicación del reactor respecto a la fuente de luz.	130
Figura 48. Datos promedio de velocidad de producción de hidrógeno, en función de la distancia de ubicación del reactor respecto a la fuente de luz y del tipo de bacteria.	130

Figura 49. Grafica de volumen de hidrógeno generado por la bacteria IR3 en función del tiempo, realizada con el mismo tipo de reactor, con la misma intensidad luminosa, pero con diferente configuración de lámparas de filamento de tungsteno.	131
Figura 50. Producción comparativa de hidrógeno cuando se aplica un filtro de color a la superficie del reactor, con la bacteria IR3. El reactor sin filtro muestra un mejor desempeño.	133
Figura 51. Producción de hidrógeno comparativa para experimentos con la bacteria IR3, con una lámpara con filamento de tungsteno de 75W con deflector; variando la geometría del reactor. La geometría plana (rojo), muestra un mejor desempeño que la geometría cilíndrica.	134
Figura 52. Gráfica de evolución de hidrógeno con respecto al tiempo, en reactores planos con las bacterias tipo B10 e IR3, utilizando iluminación solar de día, e iluminación de lámpara durante la noche.	136
Figura 53. Gráfica de volumen de hidrógeno en función del tiempo para experimentos con ciclos de luz solar/foco, mostrando la separación de los datos en función de la fuente de luz. Las letras 'f' y 's' se refieren a 'foco' y 'solar' respectivamente.	138
Figura 54. Gráfica multivariable de la velocidad de producción de hidrógeno con ciclos luz solar/foco para bacterias B10 e IR3, durante diferentes periodos de producción. Los puntos cuadrados indican promedios de velocidad foco/sol para cada periodo, mientras los puntos romboides indican el promedio de velocidad de producción de hidrógeno de los tres periodos, para cada bacteria.	141
Figura 55. Gráfica de interacción entre el tipo de bacteria y la fuente de iluminación, con respecto a la velocidad de producción de hidrógeno fotosintético. Todos los puntos indican datos promedios para cada conjunto de condiciones.	142
Figura 56. Gráfica de producción de hidrógeno con ciclos de luz solar/lámpara en función del tiempo y de la temperatura.	143

Figura 57. Esquema que muestra el suero de leche utilizado como sustituto del medio de cultivo RCV descrito en la tabla 12. Ambos tipos de bacteria fueron capaces de utilizar el suero de leche esterilizado para desarrollarse.	145
Figura 58. Muestras de suero de leche inoculadas con bacteria tipo B10 (derecha) e IR3 (izquierda). Las muestras de suero de leche fueron previamente sometidas a un proceso de fermentación oscura con bacterias presentes en el suero. El color rojo desarrollado y las burbujas presentes en la superficie son característicos del desarrollo de la bacteria y la formación de biogás, respectivamente.	146
Figura 59. Gráfica de calibración del electrodo reversible de hidrógeno, para el reactor artificial generador de hidrógeno.	147
Figura 60. Volumen generado de hidrógeno en función del tiempo. Los datos de volumen fueron calculados con la ayuda de la curva de calibración, así como de los datos de potencial RHE, registrados durante la operación de un reactor de 10 ml, con la bacteria <i>Rhodobacter Capsulatus</i> variedad IR3, en un medio de cultivo RCV.	149
Figura 61. Curva de cinética de generación de hidrógeno, desarrollada a partir de los datos de cambios en el potencial del RHE, en un reactor de 10 ml conteniendo a la variedad IR3 de la bacteria <i>Rhodobacter Capsulatus</i> .	150
Figura 62. Potencial RHE vs. tiempo, durante la generación de H ₂ mediante la aplicación de pulsos cortos de voltaje.	151
Figura 63. Curva magnificada de la respuesta ascendente del RHE, obtenida mediante la aplicación de pulsos de voltaje en el electrodo generador de hidrógeno, dentro del reactor artificial.	152

TABLAS

Tabla 1. Producción petrolera en millones de barriles diarios, y relación reserva/producción petrolera en años, mostrando la duración pronosticada de las reservas al ritmo de consumo actual (datos del 2005), [7].	12
Tabla 2. Proyecciones de porcentaje de automóviles con tecnología de hidrógeno en Europa, y las reducciones en emisiones de dióxido de carbono, hasta el año 2040 [3].	23
Tabla 3. Propiedades físicas del hidrógeno, [18].	28
Tabla 4. Propiedades energéticas del hidrógeno, comparadas con otros combustibles [18].	28
Tabla 5. Características de una celda de combustible para generar electricidad a partir de hidrógeno [18].	34
Tabla 6. El hidrógeno y el automóvil con celda de combustible. Características de un auto impulsado con hidrógeno [18].	35
Tabla 7. Calculos "Wheel to Wheel". Los cálculos "wheel to wheel" toman en consideración las cantidades de dióxido de carbono emitidas durante la producción del combustible (hidrógeno o gasolina), y durante su uso en el vehículo. En este caso, el hidrógeno es producido por la reforma del metano, y distribuido en tuberías [18].	35
Tabla 8. Metas de la tecnología de celdas de combustible operadas con hidrógeno [18].	35
Tabla 9. Comparación de costos de producción de hidrógeno [2].	41
Tabla 10. Comparación de costos de producción de hidrógeno a partir de gas natural [2].	53

Tabla 11. Comparación del costo unitario del contenido energético del hidrógeno obtenido mediante procesos varios, así como de otros combustibles convencionales [11].	88
Tabla 12. Composición del medio de cultivo utilizado para reproducción y producción fotosintética de hidrógeno con la bacteria <i>Rhodobacter Capsulatus</i> , variedades B10/IR3.	98
Tabla 13. Condiciones de prueba durante los experimentos comparativos de producción fotosintética de hidrógeno entre los tipos B10 e IR3 de la bacteria <i>R. Capsulatus</i> , y entre la geometría cilíndrica y plana. Estos experimentos fueron iluminados con la configuración de lámpara de filamento de tungsteno de 75 W con deflector de aluminio.	103
Tabla 14. Condiciones de prueba durante los experimentos comparativos de producción fotosintética de hidrógeno entre los diferentes filtros aplicados alrededor del reactor plano, con la bacteria <i>R. Capsulatus</i> IR3. Estos experimentos fueron iluminados con la configuración de dos lámparas de filamento de tungsteno de 75 W sin deflector.	103
Tabla 15. Resultados de velocidad de producción, producción total y rendimiento de conversión de sustrato para las pruebas de producción de hidrógeno con luz de filamento de tungsteno y un deflector de luz. La bacteria modificada IR3 muestra un mejor desempeño con respecto a la bacteria silvestre B10.	127
Tabla 16. Resultados de velocidad de producción, producción total y rendimiento de conversión de sustrato para las pruebas de producción de hidrógeno con luz de filamento de tungsteno sin deflector de luz. Las pruebas fueron realizadas aplicando filtros de colores a la superficie de los reactores y solo con la bacteria modificada IR3. El reactor sin filtro mostro un mejor desempeño.	132
Tabla 17. Resultados de la producción fotosintética de hidrógeno con la bacteria <i>R. Capsulatus</i> tipo IR3, con dos diferentes geometrías de reactor.	135

Tabla 18. Volumen total de hidrógeno generado y rendimiento de conversión de sustrato en hidrógeno durante los experimentos con ciclos de luz solar/lámpara de filamento de tungsteno. 137

Tabla 19. Datos comparativos de velocidad de producción fotosintética de hidrógeno entre las bacterias *R. Capsulatus* tipos B10 e IR3, en función de los periodos alternados de luz solar/foco. 140

III. OBJETIVOS

Objetivo General

Comparación de la capacidad de los tipos B10 e IR3 de la bacteria Rhodobacter Capsulatus para generar hidrógeno mediante un proceso fotosintético solar y exploración de las condiciones experimentales optimas para obtener la máxima velocidad y volumen total de la producción de hidrógeno.

Objetivos Particulares

- I. Estudiar la influencia de los parámetros experimentales como: intensidad de la luz, longitud de onda de la luz, el tipo de fuente de luz (luz de sol y luz artificial), temperatura y geometría de reactor; en la velocidad de la producción de hidrógeno, con los tipos B10 e IR3 de la bacteria Rhodobacter Capsulatus.*
- II. Comparar el crecimiento de los tipos B10 e IR3 de la bacteria R. Capsulatus en un medio de cultivo RCV con lactato.*
- III. Evaluar la velocidad de la generación del hidrógeno con ambos tipos de bacteria, utilizando un régimen de iluminación combinado de luz solar durante el día y lámparas de filamento de tungsteno durante la noche.*
- IV. Desarrollar el tratamiento necesario del suero de leche de vaca, para su uso como medio de cultivo de los tipos B10 e IR3 de la bacteria R. Capsulatus; y para la generación de hidrógeno con este sustrato.*
- V. Evaluar la aplicación del electrodo reversible de hidrógeno como sensor de hidrógeno para la determinación en tiempo real de la velocidad de producción de hidrógeno biológico fotosintético con la bacteria R. Capsulatus tipo IR3.*

1. INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCION

Una gran proporción de las necesidades energéticas mundiales están siendo cubiertas por los combustibles fósiles, lo cual ha llevado a un consumo acelerado de estos recursos no renovables. Esto ha resultado tanto en el incremento en la concentración de CO₂ en la atmósfera, como en el rápido agotamiento de los recursos fósiles. El incremento del primero está considerado la causa principal del calentamiento global y cambio climático. El agotamiento de los recursos fósiles llevara a una crisis energética en el futuro cercano.

Aunado a esto, asuntos relacionados con la seguridad energética en diversas regiones del mundo han motivado a los gobiernos a buscar un sistema proveedor de energía sustentable, segura y ambientalmente amigable. En nuestro caso, la situación de México es crítica, ya que el propio gobierno ha reconocido que se cuenta con reservas probadas de petróleo para garantizar su autosuficiencia energética sólo para los próximos diez o veinte años. Por consiguiente, es urgente establecer estrategias y emprender acciones inmediatas que nos permitan asegurar en el futuro cercano ser autosuficientes para satisfacer la demanda en energía que nuestro país requerirá en el mediano y largo plazo.

Las fuentes de energía renovables han recibido una gran atención por parte de la comunidad internacional en la última década. Estas incluyen la energía solar, eólica, hidroeléctrica, biomasa, etc. Asimismo, han sido propuestos diversos combustibles para ayudar a disminuir la contaminación ambiental y proporcionar la demanda de energía requerida por la humanidad. Estos combustibles incluyen gasolinas reformuladas, etanol, metanol, líquidos sintéticos tal como el dimetil éter extraído del gas natural o del carbón, gas natural comprimido e hidrógeno. De todas estas alternativas el hidrógeno ofrece el más grande potencial para disminuir la contaminación ambiental y los más grandes beneficios para complementar la demanda de energía. Al igual que la energía eléctrica, el hidrógeno podría ser una fuente de energía versátil, ya que se puede producir de una

gran variedad de fuentes primarias de energía renovables (energía solar, eólica, hidroeléctrica, biomasa, etc.) y no renovables (petróleo, gas natural y carbón).

El hidrógeno es un combustible prometedor, ya que tiene un contenido energético por unidad de masa mayor al del petróleo (142 MJ kg^{-1} para H_2 versus 42 MJ kg^{-1} para el petróleo), y todos los combustibles conocidos.

Es el único combustible con un contenido de energía lo suficientemente alto para las necesidades de la exploración espacial, y su único subproducto es el agua, por lo cual es ambientalmente limpio. Puede ser transportado para consumo doméstico e industrial por métodos convencionales. Su manejo es más seguro que el del gas natural. Es el único combustible libre de carbono, cuya oxidación produce solamente agua y puede ser utilizado directamente en una máquina de combustión, o bien en una celda de combustible. Estas ventajas han generado un interés considerable en los vehículos de celda de combustible de hidrógeno entre los gobiernos y la industria automotriz.

Actualmente, el 40% del hidrógeno es producido a partir del gas natural, el 30% de fracciones pesadas del petróleo y nafta, el 18% del carbón, el 4% de la electrolisis y cerca del 1% es producido a partir de biomasa. El uso de métodos biológicos para la producción de hidrógeno deben reducir significativamente los costos de la energía, ya que estos procesos no requieren de calentamiento extenso o electricidad, como en las plantas de electrolisis o reformado térmico. Son operados usualmente a temperatura ambiente y presión atmosférica, además de que pueden utilizar fuentes de energía renovables. Además, son procesos que no involucran la emisión de gases contaminantes. Sin embargo, las velocidades reportadas de producción de biohidrógeno, la estabilidad de los sistemas y la eficiencia de estos procesos aun no son suficientes para hacerlos comercialmente viables.

La bacteria fotosintética *Rhodobacter Capsulatus* es capaz de producir H_2 con rendimientos importantes en la luz. Esta foto-producción de H_2 es debida a la enzima nitrogenasa, la cual en ausencia de substratos alternativos, es capaz de reducir protones a

hidrógeno gas. Tanto condiciones anaerobias como altas intensidades de luz son requeridas, en adición a un sustrato efectivamente metabolizado. También se ha demostrado que cultivos mutantes pueden ser aislados y que han mostrado capacidades mejoradas de producción de hidrógeno comparadas con el tipo silvestre. El tipo mutante IR3 de esta bacteria ha demostrado una capacidad aumentada de producción sobre otras variedades mutantes y sobre la misma variedad silvestre B10.

La producción continua competitiva de biohidrógeno aun no ha sido lograda hasta el momento. Uno de los obstáculos consiste en que la salida de hidrógeno representa una pérdida de energía para la célula, mientras que la red metabólica microbiana ha evolucionado para racionalizar el uso de energía. Sin embargo, es posible utilizar la luz solar; así como ciertos residuos industriales, con el objetivo de reducir los costos y crear un sistema de generación competitivo.

En este estudio, dos tipos distintos de bacterias fotosintéticas han sido evaluados en su capacidad productora de hidrógeno, *Rhodobacter Capsulatus* tipo silvestre (B10) y tipo modificado (IR3). Diversas condiciones de intensidad luminosa, geometría de reactor y temperatura han sido aplicadas en sistemas de producción de hidrógeno; con el objetivo de medir el volumen total de hidrógeno, así como la velocidad de producción y el rendimiento de producción.

La generación de hidrógeno utilizando luz solar también ha sido evaluada con ambos microorganismos, utilizando ciclos de iluminación solar/lámpara. Finalmente, un proceso para la generación de hidrógeno utilizando suero de leche como medio de cultivo ha sido desarrollado.

La utilización de sustratos derivados de desechos alimenticios, así como el aprovechamiento de la energía solar para la fotosíntesis bacteriana, tiene como consecuencia la reducción de costos de generación de hidrógeno, haciendo positivos los balances energético y financiero del sistema.

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1 SUMINISTRO DE ENERGÍA EN EL MUNDO

2.1.1 Situación Energética Actual

En 1939, había en el mundo 2 billones de personas. En el año 2000 había 6 billones. Para el 2035 se espera que la población alcance los 9 billones. Muchas de estas personas desearan calefacción en el invierno y aire acondicionado durante el verano. Desearan utilizar refrigeradores, automóviles, radio y televisión.

La pregunta es, ¿qué tipo de mundo habremos creado? Si continuamos basando nuestras economías en petróleo y carbón, crearemos un mundo lleno con aire tóxico, agua sucia y enfermedades debilitantes. El calentamiento global probablemente traerá sequías y huracanes, enfermedades tropicales e inundaciones en las costas.

Existe una alternativa. Podemos reemplazar el petróleo y el carbón con fuentes de energía limpia y renovable, que puedan generar electricidad, calentar edificios, y dar energía a los autos.

Las fuentes de energía renovable están disponibles en todo el mundo. La India está inundada con luz solar, mientras que el consumo energético actual de China podría ser proveído por el viento en el interior de Mongolia. En el medio oeste de los Estados Unidos también el viento es un recurso natural importante

Sin embargo, debemos recordar que la energía solar, eólica, así como la mayoría del resto de las fuentes de energía renovables, son intermitentes y regionales. Solo pueden convertirse en fuentes mayores de energía, si encontramos una forma de almacenar y transportar dicha energía eficientemente [1].

Desde los inicios de la era industrial, el abastecimiento energético se ha nutrido de los combustibles fósiles, empezando por el carbón, seguido por el petróleo y finalmente con el gas natural. A principios de este siglo los recursos energéticos primarios eran combustibles fósiles en un 80%, y la tendencia estimada por la Agencia Internacional de la

Energía viene a ser para el año 2030 del 88%. La oposición social a la energía nuclear y el bajo interés mostrado hacia las energías renovables por las grandes empresas tecnológicas energéticas, por su carácter aleatorio y elevado coste de producción, pueden llevar al planeta a una situación crítica ya que la tendencia actual de consumo energético está en contradicción con los deseos mostrados a escala mundial en el Protocolo de Kyoto.

Prescindiendo de este aspecto medioambiental hay otra circunstancia importante para tener en cuenta: las reservas existentes de los combustibles fósiles. A pesar del optimismo de consumo actual y de la tranquilidad mostrada por los científicos por el continuo descubrimiento de nuevos yacimientos, es evidente, que el petróleo y el gas natural podrían llegar a desaparecer antes de mediados de este siglo si no se introduce una nueva cultura de consumo. El uso del carbón puede ser distinto y alargar su vida durante un par de siglos más. En cualquier caso, el abastecimiento de energía primaria puede sufrir una crisis importante si no se produce un cambio drástico en este primer cuarto del siglo [2].

La demanda de energía mundial está creciendo a un ritmo alarmante. La Comisión Europea de Revisión de Políticas de Tecnología Energética Mundial y el Clima “World Energy Technology and Climate Policy Outlook” (WETO) predice un ritmo de crecimiento media de 1.8% per annum para el período 2000-2030 para primaria energía por todo el mundo. La demanda creciente se está cubriendo en gran parte por las reservas del combustible fósil que emiten ambos gases de efecto invernadero y otros agentes contaminadores. Esas reservas están disminuyendo y llegarán a ser cada vez más costosas. Actualmente, el nivel de CO₂ las emisiones per cápita para los países en desarrollo son los 20% de eso para las naciones industriales principales.

La seguridad energética es un tema importante. El combustible fósil, particularmente petróleo crudo, se confina a algunas áreas del mundo y la continuidad de la fuente es gobernada por factores políticos, económicos y ecológicos. Estos factores conspiran

forzar precios de combustible volátiles, a menudo altos mientras que, al mismo tiempo, la política medioambiental está exigiendo a reducción en gases de efecto invernadero y emisiones tóxicas [3].

Sin alterar los recursos energéticos ni los usos dados a la energía en todas las facetas para las que la sociedad actual demanda, existe un portador, hasta el momento no utilizado, que podrá llegar a ser un perfecto complemento de la electricidad, facilitando su almacenamiento, sin introducir problemas medioambientales y favoreciendo el uso flexible de la energía. Se trata del hidrógeno, que, siendo abundante en la naturaleza su consumo sólo produciría agua, compuesto químico del cual se obtiene [4].

La producción del hidrógeno consume energía que posteriormente se puede liberar en su reacción con el oxígeno. En relación con el otro gran problema de la energía, su almacenamiento, se puede afirmar que el hidrógeno jugará un importante papel en la economía energética del futuro, fundamentalmente como un medio de almacenamiento y transporte de otras fuentes energéticas. Sus propiedades físicas y químicas exigen una tecnología especial que aún requiere mucho desarrollo para ser utilizado en el transporte.

El empleo del hidrógeno en forma molecular como portador y almacén energético no se ha planteado hasta la segunda mitad del siglo pasado, entre otras cosas por el desconocimiento de la electroquímica y, por otro lado, por el insuficiente conocimiento de los materiales. Los avances conseguidos en la ciencia de los materiales y el dominio que se está logrando en las tecnologías microestructurales está permitiendo mejorar considerablemente los procesos de electrolisis del agua, el desarrollo de nuevos catalizadores y la utilización de nuevas estructuras materiales, conllevando todo ello el desarrollo de nuevas pilas de combustible que cada vez garantizan un mayor rendimiento de reacción.

Las pilas de combustible pueden ser el elemento fundamental para almacenar y producir energía en sistemas de generación distribuida como parte de las microrredes en apoyo de

las energías renovables y otros suministros energéticos. Lo que ya se conoce como la economía del hidrógeno exige un cambio cultural importante que lleva consigo la sustitución del sistema actual de producción centralizada de electricidad y combustibles líquidos por otro sistema de generación distribuida. Al mismo tiempo se dará la circunstancia que los generadores energéticos podrán ser los propios consumidores por lo que el sistema de distribución será completamente activo. Este sistema requerirá una red general de transporte que sirva como regulador de las numerosas minirredes particulares que existan [2].

Esta nueva cultura económico-energética requiere un tratamiento integral desde el principio. Hasta el momento sólo se ha empezado. El hidrógeno aún no ha entrado, por falta de cultura de la utilización del vehículo eléctrico, como uno de los pilares de la movilidad y como consecuencia del fuerte arraigo del ineficiente motor de combustión interna y el cómodo sistema de distribución existente de sus combustibles líquidos procedentes del petróleo. Las pilas de combustible aún requieren evolución tecnológica con una fuerte base en la ciencia de los materiales y que garanticen las altas eficiencias de conversión energética teórica que ofrecen y unos precios de mercado que las haga competitivas frente a otros desarrollos tecnológicos que existen en el presente.

Todas las tecnologías relacionadas con el hidrógeno requieren desarrollos apoyados en una potente experimentación que facilite su evolución, la verificación de los productos que se vayan consiguiendo, la certificación de elementos, componentes, sistemas y productos finales, y la demostración de sistemas y su integración en diferentes estructuras técnicas de aplicación. Este conjunto de iniciativas exige una complicitad importante entre todos los eslabones de la cadena productiva, desde los grupos universitarios de investigación hasta las propias empresas usuarias finales de las tecnologías, pasando por centros de investigación, centros tecnológicos, empresas tecnológicas y de ingeniería y empresas fabricantes.

En el panorama energético actual, la energía es un problema sociopolítico fundamental. El consumo se ha multiplicado más de cien veces desde la era industrial, existiendo grandes desigualdades entre las diferentes zonas geográficas, así como lugares que consumen 150 y 200 veces más que otros. Hay países muy desarrollados y también países que necesitan desarrollarse; y el motor fundamental de ese desarrollo es la energía. Por otro lado, el crecimiento esperado es muy considerable, y los países en vías de desarrollo son los que ahora demandan una gran parte de los combustibles, y no puede olvidarse, que suponen más del 80% de la población mundial [2].

2.1.2 Suministro y Seguridad Energética

De acuerdo al modelo de Hubbert acerca de la duración de las reservas petroleras, la cantidad de barriles producidos alcanzará un pico, para después decrecer a medida que se consumen las reservas, formando una gráfica en campana. Tomando datos de reservas reales y proyectadas del Departamento de Energía de los Estados Unidos, este modelo predice que la producción de barriles de petróleo alcanzará su máximo en el 2009, cayendo hasta cero en el 2090 [5].

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

Por otro lado, los combustibles utilizados actualmente, como el carbón y el petróleo, contribuyen a la generación tanto de partículas suspendidas, como de gases dañinos para la salud y el medio ambiente, que contribuyen al calentamiento global [4].

El impacto en la economía de los países importadores de petróleo, así como en el medio ambiente global, han llevado a países como Estados Unidos a iniciar programas como el 'Programa Hidrógeno' [6], bajo el cual se destinan recursos a la investigación en el

desarrollo de la tecnología de la producción, almacenamiento y uso del hidrógeno. Actualmente Estados Unidos importa el 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 [6].

La dependencia de una gran porción de países en el mundo en la importación del petróleo, hace que el conocer la disponibilidad futura del mismo sea de gran importancia. Las siguientes figuras ilustran las reservas petroleras, así como de gas y carbón a nivel mundial [7], utilizadas para realizar una predicción de agotamiento, las cuales coinciden con el modelo de Hubbert [5].

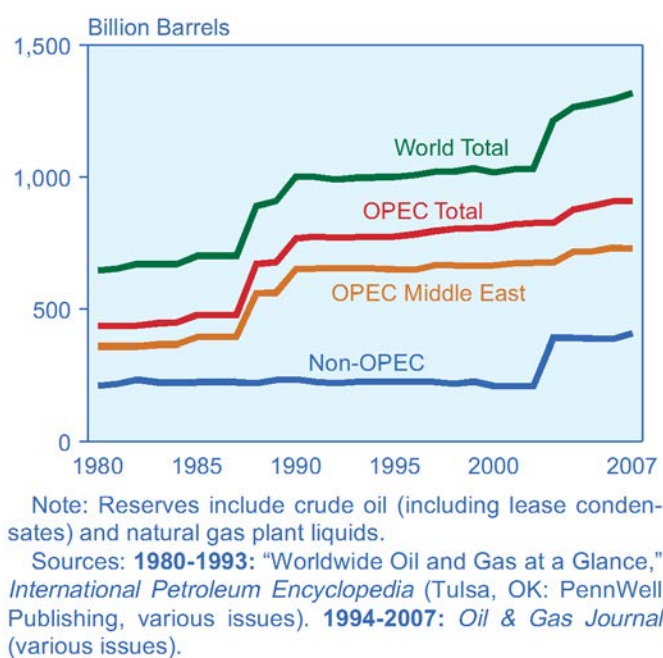


Figura 1. Evolución de las reservas petroleras mundiales totales, y por pertenencia a la OPEC (Organización de Países Exportadores de petróleo), [7].

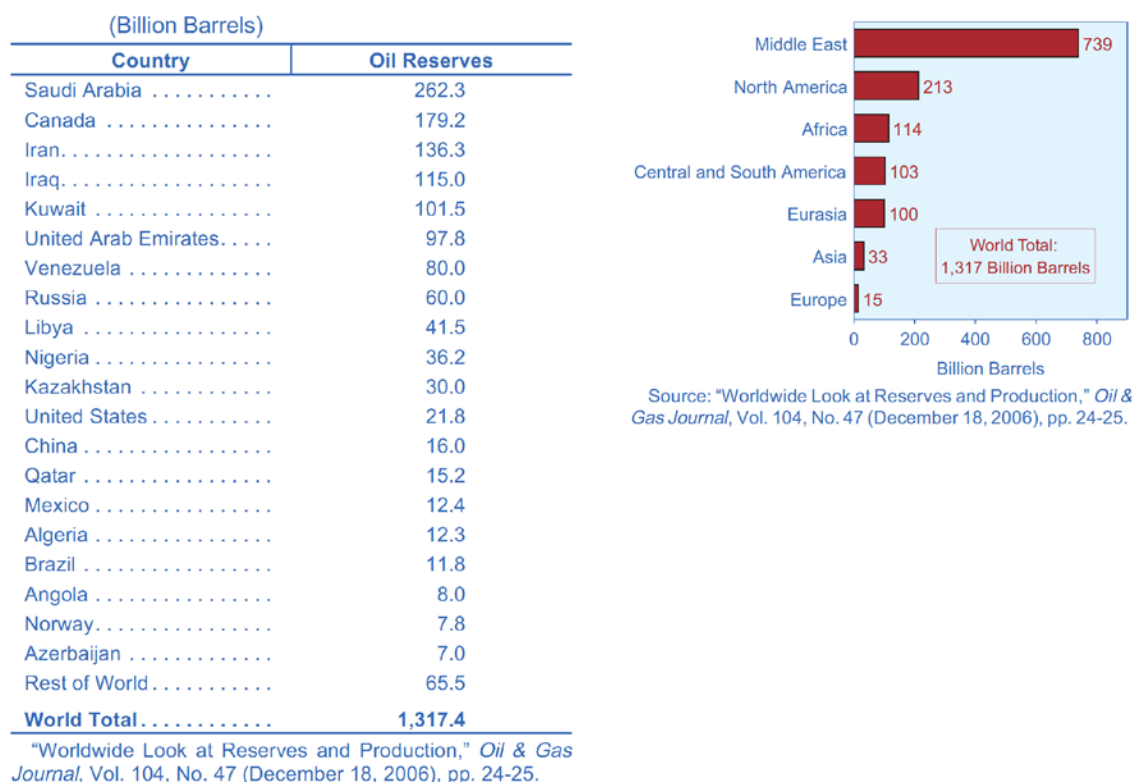


Figura 2. Reservas mundiales de petróleo probadas, hasta el primero de enero del 2007(izquierda), y distribución geográfica por área de las mismas (derecha), [7].

Como puede apreciarse en la *tabla 1*, tomando como referencia la producción actual de barriles de petróleo, las reservas del mismo se agotarían al término de este siglo, sin tomar en cuenta aun el posible incremento en el ritmo de consumo, de acuerdo a las proyecciones de la *figura 3*. De acuerdo a la *figura 1*, es posible encontrar un incremento en las reservas petroleras probadas, con la ayuda de la exploración. Sin embargo, en los últimos 17 años, las reservas mundiales solo se incrementaron en aproximadamente 300 billones de barriles.

En cuanto a otras fuentes importantes de energía, como el gas natural, la *figura 4* muestra las tendencias de reservas y producción de gas natural. El estimado mundial actual de la relación reserva/producción es de 65 años. Las estimaciones de reservas de gas natural no descubiertas dan una duración adicional de 40 años.

En el caso del carbón, la *figura 5* muestra las reservas de carbón, con una relación reserva/producción estimada de 164 años.

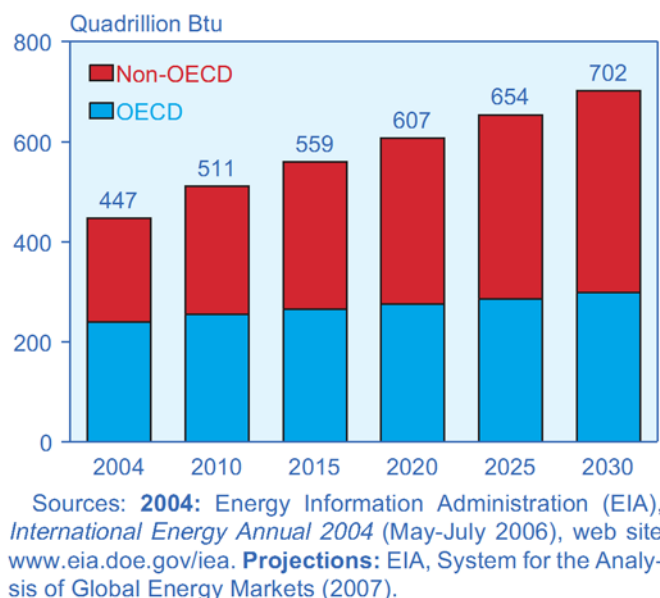


Figura 3. Proyección de demanda de energía para países miembros y no miembros de la Organización para la Cooperación Económica y el Desarrollo. La demanda energética incrementaría en un 57% para el 2030, respecto a la demanda del 2004 [7].

Las principales tres fuentes de energía, cuentan con un pronóstico de duración relativamente corto.

Por las razones económicas y ecológicas mencionadas, se ha convertido en una necesidad la investigación en el área de combustibles alternativos, sobre todo en el caso del hidrógeno. El departamento de energía de los Estados Unidos, por ejemplo, ha creado un programa llamado 'Hydrogen Program', a través del cual busca investigar, desarrollar y validar métodos de producción de hidrógeno, así como celdas de combustible para el siglo actual; con el fin de utilizarlo tanto en vehículos como en aplicaciones estacionarias en la generación de energía [6].

La sociedad de hoy depende de manera crucial de la disponibilidad ininterrumpida de los combustibles fósiles que, en el futuro, serán concentrados cada vez más en un número más pequeño de países - crear el potencial para la inestabilidad geopolítica y del precio. El

hidrógeno abre el acceso a una gama amplia de fuentes de energía primarias, incluyendo combustibles fósiles, energía nuclear y, cada vez más, fuentes de energía renovables (p. ej. viento, solar, océano, y biomasa). Así, la disponibilidad y el precio del hidrógeno como portador deben ser más estables que cualquier fuente de energía por sí sola. El hidrógeno y la electricidad también permiten flexibilidad en equilibrio centralizado y la energía descentralizada, para las posiciones remotas (p. ej. isla, y los sitios de la montaña), [3].

Tabla 1. Producción petrolera en millones de barriles diarios, y relación reserva/producción petrolera en años, mostrando la duración pronosticada de las reservas al ritmo de consumo actual (datos del 2005), [7].

Country	2005 Production (Million Barrels per Day)	2005 Share of World Production (Percent)	Reserve-to-Production Ratio (Years)
Saudi Arabia	9.55	13.3	75
Russia	9.04	12.6	18
United States	5.18	7.2	11
Iran	4.14	5.7	83
China	3.61	5.0	14
Mexico	3.33	4.6	12
Norway	2.70	3.7	9
Nigeria	2.63	3.6	37
United Arab Emirates	2.54	3.5	106
Kuwait	2.53	3.5	110
Venezuela	1.98	2.7	107
Iraq	1.88	2.6	168
Algeria	1.80	2.5	18
United Kingdom	1.65	2.3	7
Brazil	1.63	2.3	18
Libya	1.63	2.3	65
Canada	1.28	1.8	10
Angola	1.26	1.7	12
Indonesia	1.07	1.5	12
Kazakhstan	1.05	1.5	23
Qatar	0.84	1.2	50
Oman	0.77	1.1	19
Malaysia	0.75	1.0	11
Argentina	0.70	1.0	10
India	0.66	0.9	22

Sources: **2005 Production:** Energy Information Administration, *Short-Term Energy Outlook* (October 2006). **Reserves:** "World-wide Look at Reserves and Production," *Oil & Gas Journal*, Vol. 104, No. 47 (December 18, 2006), pp. 24-25.

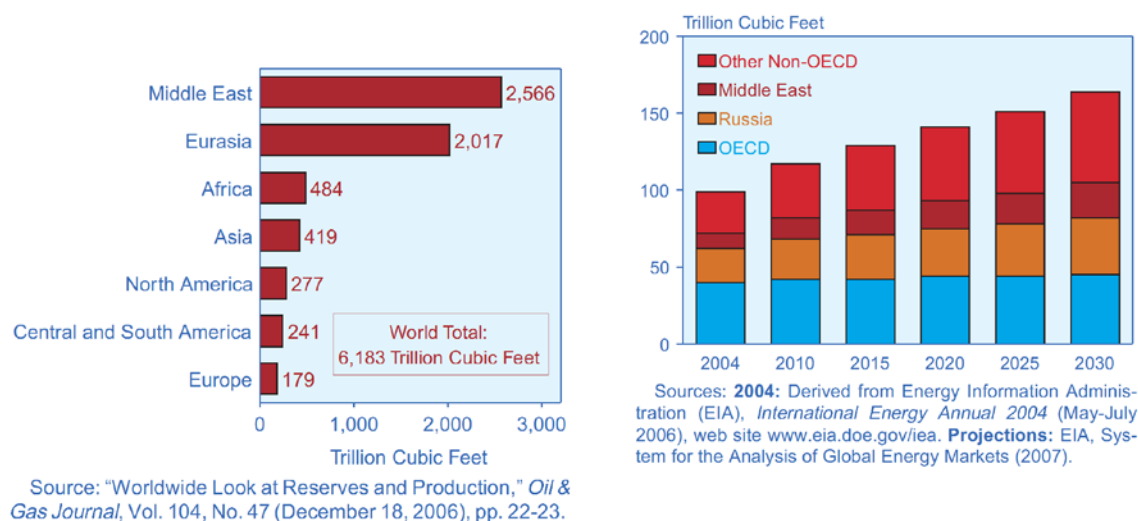


Figura 4. Reservas mundiales de gas natural (izquierda), y producción de gas natural (derecha), en trillones de pies cúbicos [7].

(Billion Short Tons)

Region/Country	Bituminous and Anthracite	Subbituminous	Lignite	Total
World Total	528.8	298.1	170.9	997.7
United States ^a	123.7	110.3	33.5	267.6
Russia	54.1	107.4	11.5	173.1
China	68.6	37.1	20.5	126.2
India	99.3	0.0	2.6	101.9
Other Non-OECD Europe and Eurasia	50.1	18.7	31.3	100.1
Australia and New Zealand	42.6	2.7	41.9	87.2
Africa	55.3	0.2	*	55.5
OECD Europe	19.5	5.0	18.8	43.3
Other Non-OECD Asia	1.4	2.0	8.1	11.5
Brazil	0.0	11.1	0.0	11.1
Other Central and South America	8.5	2.2	0.1	10.8
Canada	3.8	1.0	2.5	7.3
Other ^b	1.8	0.4	0.1	2.3

^aData for the United States represent recoverable coal estimates as of January 1, 2006.

^bIncludes Mexico, Middle East, Japan, and South Korea.

*Less than 0.05 billion short tons.

Sources: **United States:** Energy Information Administration, unpublished data from the Coal Reserves Database (April 2007). **All Other Countries:** World Energy Council, *2004 Survey of Energy Resources*, Eds. J. Trinnaman and A. Clarke (London, UK: Elsevier, December 2004).

Figura 5. Reservas mundiales de carbón, hasta el primero de enero del 2003 [7].

La energía descentralizada es atractiva tanto para asegurar energía de calidad, como para cubrir necesidades específicas del cliente, así como la reducción de la exposición al atentado terrorista. La capacidad de almacenamiento de energía del hidrógeno puede

ayudar más fácilmente con el equilibrio de la naturaleza intermitente de fuentes de energía renovable. El hidrógeno es también uno de los pocos portadores de energía que permite que fuentes renovables de energía se introduzcan en sistemas de transporte [3].

Existen dos fuentes primarias de energía para ser controladas y utilizadas para realizar trabajo. Una de ellas es la energía del 'capital' (como una cuenta de ahorro de energía y almacenamiento). La otra es la 'cuenta de ingresos de energía'. Los combustibles fósiles tomaron muchos millones de años de compleja reducción y conservación, progresando desde la captación de radiación solar en el crecimiento vegetal, mediante la fotosíntesis, hasta un almacenamiento profundo de energía, concentrado bajo la superficie terrestre.

Existe una sobreabundancia vasta de 'energía de ingreso', en muchos lugares alrededor del mundo, para producir billones de veces más que la energía que usa el hombre actualmente; si solo supiera como almacenarla cuando está disponible, para usarla cuando ésta no está disponible. Existen fuentes de 'energía de ingreso' extremadamente grandes disponibles, las cuales no siguen las leyes de auto-conservación de la naturaleza, en el caso de que algún día hagan falta.

Existen en el agua, en las mareas, en el aire y en la radiación solar en los desiertos. Los explotadores de los combustibles fósiles dicen que cuesta menos producir y quemar la 'cuenta de ahorros'. Esto es análogo a decir que requiere menos esfuerzo robar un banco que realizar el trabajo equivalente al dinero en el banco. La pregunta es ¿a quien le va a costar? ¿A nuestros tataranietos?, quienes no tendrán combustibles fósiles para accionar las maquinas. La aceptación ignorante de los líderes mundiales, así como la falta de pensamiento constructivo a largo plazo, pone en duda el futuro de la tierra [1].

Las siguientes son reflexiones adicionales a las de R. Buckminster Fuller, relativas a la economía del hidrógeno:

Las grandes potencias están intentando seriamente encontrar alternativas al petróleo, mediante la búsqueda de la extracción de energía del sol o el agua. Esperamos en dios que no tengan éxito rápidamente, ya que nuestra posición en ese caso sería dolorosa.

—Sheikh Ahmad Zaki Yamani, Ministro del Petróleo de Saudi Arabia, 1976 [1].

Creemos que los automóviles con energía de celdas de combustible de hidrógeno probablemente tendrán su gran aparición en el mercado automotriz a través de Europa y EU para el año 2005. Además, vemos potencialmente enormes oportunidades abriéndose para la flota domestica, autobuses y taxis, mientras el gobierno alienta el uso de alternativas limpias a los vehículos convencionales. Esta tendencia representa un reto real para una compañía como Shell, para desarrollar nuevos productos, nuevas tecnologías, y para preparar e informar a nuestros clientes sobre los cambios que están por delante...Puedo asegurarle que estaremos en esto en el largo plazo.

—Chris Fay, chief executive, Shell UK, London, 1998 [1].

Nuestra meta a largo plazo es muy simple: cero emisiones en el aire. Para cumplir esta meta, California está haciendo equipo con algunas de las mayores empresas automotrices y proveedoras de energía en el mundo, para desarrollar una excitante nueva tecnología que es ambientalmente segura y comercialmente viable.

—Gray Davis, Gobernador de California, 1999 [1].

2.1.3 Situación Energética en México

En la actualidad, la generación de energía con fuentes convencionales y su consumo desmedido forman parte de la grave e injustificada contaminación del agua, suelo, medio ambiente y de los sistemas ecológicos. Por cada átomo de carbón que se extrae del subsuelo y se transforma en energía, una molécula de algún óxido de carbono y de nitrógeno es emitido a la atmósfera. El abuso por la sobre-explotación y el uso de los combustibles fósiles han provocado serios daños al medio ambiente debidos a la emisión

de gases contaminantes de efecto invernadero. Algunos de los daños más severos que se pueden citar son el calentamiento global del planeta, derrames de combustible en el mar, contaminación ambiental en las ciudades, entre otros.

Por otra parte, las predicciones de los expertos señalan que los combustibles fósiles se agotarán en el presente siglo, no así el de los yacimientos mundiales de carbón, con lo que el pronóstico es que la emisión de los gases de efecto invernadero por el uso de los combustibles fósiles seguirá en aumento a lo largo del siglo XXI y tal vez de los venideros, debido a la creciente demanda de energía, ya sea por el aumento poblacional mundial o para satisfacer las necesidades de desarrollo de los países. La población mundial hoy en día supera los 6 mil millones de habitantes y su proyección hacia el 2050 espera que se duplique. Los consumos actuales de energía por año son alrededor de 500 EJ (500 X 10¹⁵Joules), y su proyección hacia el 2050 casi se triplicará.

La diferencia en el factor de multiplicación de ambos parámetros, obedece al hecho de que la proyección superlineal de la actividad económica mundial la marcará el sector industrial.

En nuestro caso, la situación de México es crítica, ya que el propio gobierno ha reconocido que se cuenta con reservas probadas de petróleo para garantizar su autosuficiencia energética sólo para los próximos diez o veinte años. Las reservas petroleras de México ya no son cuantiosas y los pronósticos anuncian que en 10 años más México comenzará a ser importador neto de petróleo. Por consiguiente, es urgente establecer estrategias y emprender acciones inmediatas que nos permitan asegurar en el futuro cercano ser autosuficientes para satisfacer la demanda en energía que nuestro país requerirá en el mediano y largo plazo. Nuestro país se encuentra en un letargo energético mientras el mundo cambia a su alrededor, es hora de despertar y ponernos a la vanguardia del desarrollo científico y tecnológico para poder encarar de frente los retos que tendremos a corto, mediano y largo plazo. El incremento de la demanda energética requiere de nuevos desarrollos en la capacidad de generación de energía, que sea segura, diversificada, disponible y limpia.

En base a lo anterior, existen razones económicas y ambientales para fomentar el uso de fuentes alternas de energía siendo las energías renovables, limpias y disponibles las que representen una prioridad política de los gobiernos de los países desarrollados o en vías de desarrollo. El cambio climático global relacionado a la emisión de gases contaminantes de efecto invernadero y la necesidad de diversificar las fuentes primarias de energía han hecho que un número creciente de países en el mundo aprovechen la oportunidad ambiental y económica que representan la utilización de las fuentes renovables de energía. México no puede ser ajeno a esta realidad mundial. A través del desarrollo de fuentes de energías renovables, se tiene la oportunidad de contribuir al esfuerzo internacional no sólo de cuidar el medio ambiente, sino en lograr la autosuficiencia energética y al mismo tiempo obtener beneficios económicos y sociales con base en el uso de estas nuevas tecnologías que están revolucionando la forma en que producimos y consumimos la energía [8].

2.2 EFECTOS ADVERSOS DE LOS COMBUSTIBLES

2.2.1 Efectos de los Combustibles en la Naturaleza

Los fundamentos del calentamiento del planeta son como sigue: El dióxido de carbono (CO_2) es producido por el quemado de combustibles fósiles así como por el ciclo de carbón de la naturaleza.

Los seres humanos y los animales lo exhalan en la atmósfera como parte de su proceso metabólico; las plantas verdes lo absorben y le dan vuelta en el CO_2 de la materia de la planta. El metano y otros gases actúan como un invernadero en la atmósfera: dejan la radiación solar a través de la atmósfera calentar la superficie de la tierra, pero previenen la retransmisión de algo de esa energía nuevamente dentro de espacio, por lo tanto atrapando calor.

Una cierta colocación de trampas del calor es buena; si no nunca nos hubiéramos desarrollado en primer lugar, o nosotros nos congelaríamos hasta la muerte. Pero si se atrapan más gases de efecto invernadero que se están reuniendo alrededor de la atmósfera, más calor.

Debido a disminuciones de los bosques del mundo y disminuciones consiguientes de la absorción global del CO_2 , y (más importante) debido a la quema cada vez mayor de combustibles fósiles en nuestra maquinaria, el contenido del CO_2 ha estado yendo para arriba constantemente y cada vez mayor desde el principio de la Revolución industrial.

Además el clima completa un ciclo cada mil o diez mil años (tales como edades de hielo, creídas el producto de cambios en manchas solares y por lo tanto más allá de la capacidad del hombre de influenciar). El clima de la tierra ha sido razonablemente estable por 10.000 años.

Pero este equilibrio está siendo trastornado por las emisiones de carbono artificiales. La pregunta es cuánto. Opiniones, suposiciones básicas sobre el curso futuro del clima y la

cantidad de aumento previsto del calor, suposiciones estrechamente vinculadas sobre el desarrollo económico global, y la fe en la computadora compleja los modelos que intentan pronosticar progresos del clima varían extensamente incluso entre la mayoría de los expertos que creen que nuestro planeta está haciendo frente a una crisis sin precedente [1].

Como más calor se está atrapando, y como las temperaturas han aumentado por todas partes del mundo, la opinión actual entre los expertos del clima del panel intergubernamental de las naciones unidas en el cambio de clima (IPCC), predice impactos extensos y drásticos en los ecosistemas, recursos hídricos, alimento y producción de la fibra, costas, y salud humana: los casquetes glaciares polares derretirán, los niveles del mar se levantarán, los estiramientos grandes de las costas (algunas incluyendo de las ciudades más grandes del mundo) serán inundados, y las cuentas de las islas en el Pacífico pueden desaparecer. Los patrones agrícolas podrían cambiar. El centro y las altas latitudes pueden llegar a ser más productivos porque las plantas absorben un CO₂ más disponible. Se espera que las producciones agrícolas que las zonas tropicales y subtropicales disminuyan. El cambio de clima podría producir más muertes con el aumento del calor, extensión de enfermedades tropicales, y contaminación atmosférica urbana mayor. En un suplemento especial dedicado a la conferencia global del cambio de clima del diciembre de 1997 en Kyoto, New York Times divulgó a ese grupo de trabajo de un IPCC había resumido sus resultados como sigue: “Comparado con la carga total de la mala salud, estos problemas no son probables de ser grandes”.

Sin embargo, los impactos directos e indirectos del cambio de clima en salud humana hacen que constituya un peligro a la salud de la población humana, especialmente en los países en vías de desarrollo en las zonas tropicales y el subtrópico. Un estudio reciente que miraba la generación de ozono en cuatro zonas metropolitanas (Sacramento, Chicago, St. Louis, y Los Ángeles) concluyó que una duplicación futura del CO₂ atmosférico global daría lugar probablemente a temperaturas diarias más altas, que alternadamente “dominarían las correlaciones meteorológicas con altas concentraciones

de ozono troposféricas” - en otras palabras, temperaturas más altas aumentarían las concentraciones de ozono. Más ozono, alternadamente, aumentaría la incidencia de la mortalidad prematura, admisiones de hospital para las enfermedades respiratorias, y los síntomas respiratorios. Pero algunos aspectos, especialmente la relación entre los niveles del ozono y la mortalidad prematura, todavía están en investigación. En el caso de Los Ángeles, se esperaba que las concentraciones dobladas del CO₂ aumentaran la temperatura máxima diaria del promedio anual del caso bajo 20.7°C a 24.9°C y del mínimo diario del promedio anual de 14.1°C a 18.2°C. En Chicago, el CO₂ doblado aumentaría el máximo correspondiente de 13.5°C a 19.3°C y el mínimo de 3.78°C a 10.0°C.

Para Los Ángeles, una tabla de salud anticipó el costo anual de servicios de salud como consecuencia del incremento en la temperatura. El cálculo fue de \$2.552 mil millones (dólares, 1990) para la mortalidad prematura, \$14.19 millones para las admisiones de hospital, y \$168.000 dólares por días del síntoma respiratorio concerniente a las mismas categorías de coste por un último año típico. Para Chicago, los números correspondientes eran \$979 millones, \$2.38 millones, y \$28.000 dólares.

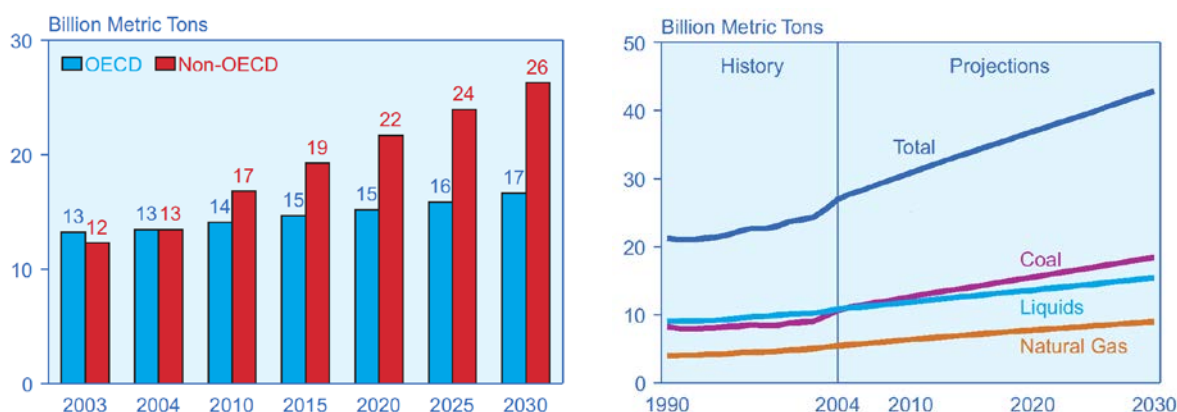
Gasolina, combustible diesel, aceite pesado, keroseno del jet-grado, el gas natural, la madera, la biomasa, y el carbón impulsan los aeroplanos, los coches, los trenes y las naves, las plantas del funcionamiento, y los hogares del calor, las oficinas, los hospitales, y las escuelas. El hidrógeno, también una forma de energía química, puede hacer todas esas cosas, y puede hacerlas esencialmente sin la contaminación [1].

2.2.2 Pronósticos de concentración de dióxido de carbono

Analizando los estudios que han hecho los geólogos en los que se recoge cuál es la temperatura media y las concentraciones medias de CO₂ en la atmósfera, y remontando 400.000 años atrás, está muy clara la correlación entre las variaciones de temperatura y las concentraciones de CO₂ en la atmósfera. Se observan ciclos en estos 400.000 años:

épocas frías y épocas calientes. Evidentemente, actualmente se podría estar en uno de estos ciclos, pero nunca, históricamente, se ha llegado a pasar de las 300 ppm de CO₂ en la atmósfera. Centrándose en la situación actual y observando los treinta últimos años, se puede ver muy claramente cuál es la variación de las concentraciones de CO₂ en la atmósfera y cómo se han incrementado, así como el paralelismo que existe con las emisiones de CO₂ producidas por la utilización de combustibles fósiles [2].

La *figura 6* muestra que para el 2030, las emisiones de dióxido de carbono relacionadas con los combustibles se incrementarían aproximadamente en un 60% del nivel actual [6].



OECD: Organización para la Cooperación Económica y el Desarrollo.

Claves: Coal(carbón), liquids(petróleo y derivados), natural gas(gas natural).

Proyecciones basadas en análisis globales de mercados energéticos.

Figura 6. Emisiones de dióxido de carbono a nivel mundial por región, por año, relacionadas con la producción de energía en billones de toneladas métricas (izquierda). Emisiones de dióxido de carbono por tipo de combustible por año, en billones de toneladas métricas (derecha), [7].

Por otro lado, en el caso del impacto ambiental de estos combustibles, la *figura 6* muestra que para el 2030, las emisiones de dióxido de carbono relacionadas con los combustibles se incrementarían aproximadamente en un 60% del nivel actual [6].

En la actualidad casi se alcanzan las 400 ppm de concentración de CO₂. Eso provoca una mayor absorción de la energía de la radiación solar, y, por tanto, un incremento de temperatura. Este incremento de temperatura implica actualmente una disminución de la

superficie de los glaciares, una retirada de los hielos polares y cómo se pronostican elevaciones del nivel del mar que pueden llegar a metros en algunos lugares, y que se supone que dentro de no muchas decenas de años éstas zonas estarán inundadas, o que provocará que algunas islas desaparecerán del mapa [2].

2.2.3 Políticas de reducción del gas de efecto invernadero

El hidrógeno se puede producir de fuentes de energía libres de carbono o de los combustibles fósiles con la captura y el almacenaje (secuestro) del CO₂. Así, el uso del hidrógeno podría eliminar eventuales emisiones de gases de efecto invernadero del sector de energía.

Las pilas de combustible pueden generar energía eléctrica eficiente y limpia de una gama de combustibles. Pueden también ser localizados cerca del punto del uso final, permitiendo la explotación del calor generado en el proceso. La *tabla 2* ilustra cómo, en una economía madura orientada al hidrógeno, la introducción de vehículos movidos por hidrógeno podría reducir las emisiones de gases de efecto invernadero medias de la flota europea de vehículos de pasajeros, comparada con el nivel medio de CO₂ de 140g/km (1) proyectado para 2008.

La última columna demuestra las cantidades correspondientes de emisiones de CO₂ que podrían ser evitadas. Esto se puede comparar al nivel total proyectado de 750-800 Mt de emisiones de dióxido de carbono para el transporte terrestre en 2010. Los números para los automóviles movidos por hidrógeno son el resultado de una suposición basada en un examen de los expertos en energías alternativas, pero no una predicción de producción o ventas futuras [3].

Tabla 2. Proyecciones de porcentaje de automóviles con tecnología de hidrógeno en Europa, y las reducciones en emisiones de dióxido de carbono, hasta el año 2040 [3].

AÑO	% de autos nuevos movidos por H ₂	% de flotillas movidas por H ₂	% de reducción de CO ₂ (todos los autos, g/km)	CO ₂ evitado por año (ton. métrica)
2020	5	2	2.8	15
2030	25	15	21	112
2040	35	32	44.8	240

2.3 HIDRÓGENO

2.3.1 Importancia Estratégica del Hidrógeno

A nivel de energía primaria, el 80% de la energía proviene de combustibles fósiles. El 50% de petróleo y el otro 30% están repartidos entre carbón y gas natural. Esta situación va cambiando año a año. Desde principios de 2000 el uso del carbón ha disminuido, ha aumentado el del gas natural, y también se ha reducido el aporte de la energía nuclear, al no aumentar el número de instalaciones disponibles en la red.

Diferentes instituciones elaboran proyecciones basadas en escenarios diferentes. Por ejemplo, el gobierno británico ha establecido un plan de acciones con las que se pretende lograr reducir las emisiones de CO₂ en un 60% para el año 2050 en la generación eléctrica. Por otro lado, se presume que debido a la presión social la energía nuclear se irá abandonando, desapareciendo su aporte en el año 2030.

Ante este escenario es preciso analizar si se dispondrá de otras fuentes de energía para remplazar la energía nuclear. Actualmente, la única fuente de energía de que se dispone son los combustibles fósiles: carbón y gas natural, fundamentalmente. Concienciados de que estos combustibles fósiles tampoco se pueden utilizar, tienen que entrar en operación sistemas de captura. Es decir, se puede contemplar la utilización de los combustibles fósiles, siempre y cuando integren procesos de captura de CO₂. De este modo se implementaría la utilización del carbón, que ha estado totalmente fuera de los planes de las compañías eléctricas, pero que ha vuelto a entrar en la posible cesta energética del futuro, aunque dotándolo de tecnologías de captura y el almacenamiento de CO₂.

En la actualidad se están desarrollando proyectos a nivel de investigación y desarrollo, que permitan demostrar esta viabilidad. Y se está contemplando que cualquier instalación que se pueda montar a partir de 2020 utilizando combustibles fósiles tendrá que permitir

la captura de CO₂. Para que esto sea una realidad primeramente habrá que desarrollar dónde se va a almacenar. Dentro de este escenario las energías renovables necesitan un desarrollo y una implementación enormes, pues estarían llamadas a superar el 40% de las necesidades de abastecimiento energético.

Es aquí donde entra el hidrógeno. La distribución del consumo energético está actualmente entre un 35 y 40% para el transporte, y el 65% para electricidad, vapor, industrias y servicios. Esto supone varios aspectos. En la actualidad, lo que se está contemplando para eliminar las emisiones de CO₂ a la atmósfera, y como resultado de los Protocolos de Kyoto, es abordar los grandes focos de emisiones. Ahora bien, el sector de los transportes aporta un 40% de las emisiones de CO₂ a la atmósfera, por lo que no es una cantidad despreciable.

En los últimos años, el parque automovilístico ha crecido mucho, pero no han crecido en proporción las emisiones de CO₂ a la atmósfera procedentes del sector de los transportes, porque, evidentemente, se ha hecho un gran esfuerzo para ello: se han mejorado mucho las tecnologías de los motores, los consumos de combustible específicos de un motor han disminuido y se ha llegado a alcanzar alrededor de un 40% de lo que era hace 15 años. No obstante, este sector sigue produciendo un 40% de las emisiones. El hidrógeno se propone, en este caso, como un acercamiento de la energía renovable hacia el sector de los transportes. Otra herramienta es evidentemente el ahorro energético, que ha de ser fomentado [2].

Si miramos la historia de los combustibles en los últimos 2000 años, el uso se ha movido constantemente en la dirección de un combustible más limpio: madera → carbón → petróleo → propano → hasta el hidrógeno (*figura 7*). Con el tiempo, la molécula del combustible ha llegado a ser más pequeña, más magra en carbón, y más rica en hidrógeno. El movimiento principal pasado estaba al metano, cuya combustión es mucho más limpia que la gasolina. Se espera que el movimiento futuro sea al hidrógeno, que

tiene el potencial para solucionar ambos los peligros para el medio ambiente hechos frente por la humanidad [9].

Se han propuesto una variedad de combustibles para ayudar a disminuir la contaminación ambiental y proporcionar la demanda de energía requerida por la humanidad. Estos combustibles incluyen gasolinas reformuladas, etanol, metanol, líquidos sintéticos tal como el dimetil éter extraído del gas natural o del carbón, gas natural comprimido e hidrógeno. De todas estas alternativas el hidrógeno ofrece el más grande potencial para disminuir la contaminación ambiental y los más grandes beneficios para complementar la demanda de energía. Al igual que la energía eléctrica, el hidrógeno podría ser una fuente de energía versátil, ya que se puede producir de una gran variedad de fuentes primarias de energía renovables (energía solar, eólica, hidroeléctrica, biomasa, etc.) y no renovables (petróleo, gas natural y carbón). Si el hidrógeno se obtiene de la descarbonización de algún combustible fósil, el CO_2 que se produce podría ser capturado y almacenado de forma segura para no contaminar [8].

El hidrógeno tiene otros usos varios, los cuales pueden ser divididos en las siguientes categorías:

- a) Como reactante en procesos de hidrogenación.
- b) Como removedor de trazas de oxígeno para evitar oxidación y corrosión.
- c) Como combustible de cohetes.
- d) Como refrigerante en generadores eléctricos.

Estos usos del hidrógeno corresponden al 3% del consumo de energía actualmente y se espera que crezca significativamente en los próximos años [10].

2.3.2 Hidrógeno como combustible

Las fuentes de energía renovables han recibido una gran atención por parte de la comunidad internacional en la última década. Estas incluyen la energía solar, eólica, hidroeléctrica, biomasa, etcétera [11].

El hidrógeno es un combustible prometedor, ya que tiene un contenido energético mayor al del petróleo (142 MJ kg^{-1} para H_2 versus 42 MJ kg^{-1} para el petróleo), [12].

Es el único combustible con un contenido de energía lo suficientemente alto para las necesidades de la exploración espacial, y su único subproducto es el agua, por lo cual es ambientalmente limpio [13].

El hidrógeno tiene el mayor contenido energético por unidad de masa de todos los combustibles conocidos (142 kJ/g o 61000 BTU/lb) y puede ser transportado para consumo doméstico e industrial por métodos convencionales. Su manejo es más seguro que el del gas natural. Es el único combustible libre de carbono, cuya oxidación produce solamente agua y puede ser utilizado directamente en una máquina de combustión, o bien en una celda de combustible [11, 14, 15]. Estas ventajas han generado un interés considerable en los vehículos de celda de combustible de hidrógeno entre los gobiernos y la industria automotriz [16].

Cuando es quemado en un motor de combustión interna (pistón, rotatorio, o gas para turbina), el hidrógeno no produce como emisión virtualmente nada, sino el vapor de agua inofensivo (más, obviamente, las emisiones de cantidades minúsculas de lubricantes del motor que se oxidan en el proceso, y algunos óxidos de nitrógeno).

Cuando el hidrógeno se quema con oxígeno atmosférico en un motor, no se emite el monóxido de carbono o el dióxido de carbono, entre otras emisiones dañinas para el medio ambiente. El hidrógeno tiene un desempeño incluso mejor en las pilas de combustible (motores electroquímicos, combinando el hidrógeno y el oxígeno en un proceso sin llama, generando electricidad, calor y agua destilada pura).

En forma contraria a los motores de combustión interna, las pilas de combustible no producen ningún óxido de nitrógeno. Las pilas de combustible no tienen ninguna pieza móvil. Casi silenciosas, pueden ser tanto como 2.5 veces más eficientes que los motores de combustión interna. En los años 90 se difundieron extensamente y fueron reconocidas públicamente como una tecnología de vanguardia que puede poner en marcha la economía del hidrógeno [1, 17].

Las *tablas 3 y 4*, ilustran las propiedades físicas y de energía del hidrógeno. El contenido energético del hidrógeno triplica al de la gasolina.

Tabla 3. Propiedades físicas del hidrógeno, [18].

Masa molar	2.016 g/mol
Contenido en el aire	0.5 ppmv
Temperatura de ebullición	-252.8°C
Temperatura de solidificación	-259°C
Factor de compresibilidad	1.001 (to 1.013 bar and 21°C)
Masa de hidrógeno líquido por unidad de volumen	70.973 kg/m ³ (to 1.013 bar and -252,8°C)
Masa de hidrógeno líquido por unidad de volumen	0.085 kg/m ³ (to 1.013 bar and 15°C)
Volumen específico de hidrógeno gas	11.986 m ³ /kg (to 1.013 bar and 15°C)

Tabla 4. Propiedades energéticas del hidrógeno, comparadas con otros combustibles [18].

Densidad de energía del hidrógeno	120 MJ/kg
Densidad de energía de la gasolina	42.7 MJ/kg
Densidad de energía del metano	50.4 MJ/kg

Se han propuesto una variedad de combustibles para ayudar a disminuir la contaminación ambiental y proporcionar la demanda de energía requerida por la humanidad. Estos combustibles incluyen gasolinas reformuladas, etanol, metanol, líquidos sintéticos tal como el dimetil éter extraído del gas natural o del carbón, gas natural comprimido e

hidrógeno. De todas estas alternativas el hidrógeno ofrece el más grande potencial para disminuir la contaminación ambiental y los más grandes beneficios para complementar la demanda de energía [19]. Al igual que la energía eléctrica, el hidrógeno podría ser una fuente de energía versátil, ya que se puede producir de una gran variedad de fuentes primarias de energía renovables (energía solar, eólica, hidroeléctrica, biomasa, etc.) y no renovables (petróleo, gas natural y carbón). Si el hidrógeno se obtiene de la descarbonización de algún combustible fósil, el CO₂ que se produce podría ser capturado y almacenado de forma segura para no contaminar.

El hidrógeno puede ser usado como combustible en un motor de combustión interna con una alta eficiencia de conversión, o transformarse electroquímicamente en una pila de combustible. El uso de pilas de combustible en un ciclo cerrado con el aprovechamiento de una energía renovable es la base del término denominado “Economía del Hidrógeno”.

El término “Economía del hidrógeno” se maneja con el fin de describir un panorama diferente, donde los problemas de contaminación sean resueltos y nuestras necesidades energéticas sean cubiertas en forma permanente y segura, sin dañar el medio ambiente. La transición hacia una economía del hidrógeno puede poner fin a la dependencia del petróleo. Es importante independizar al mundo de la economía energética de los combustibles fósiles para limitar las emisiones de CO₂ y mitigar así los efectos del calentamiento global sobre la ya castigada biosfera de la tierra. La creación de redes energéticas descentralizadas de hidrógeno entre usuarios finales hará posible el establecimiento de asentamientos humanos más dispersos y más sostenibles en relación con los recursos medioambientales y regionales existentes.

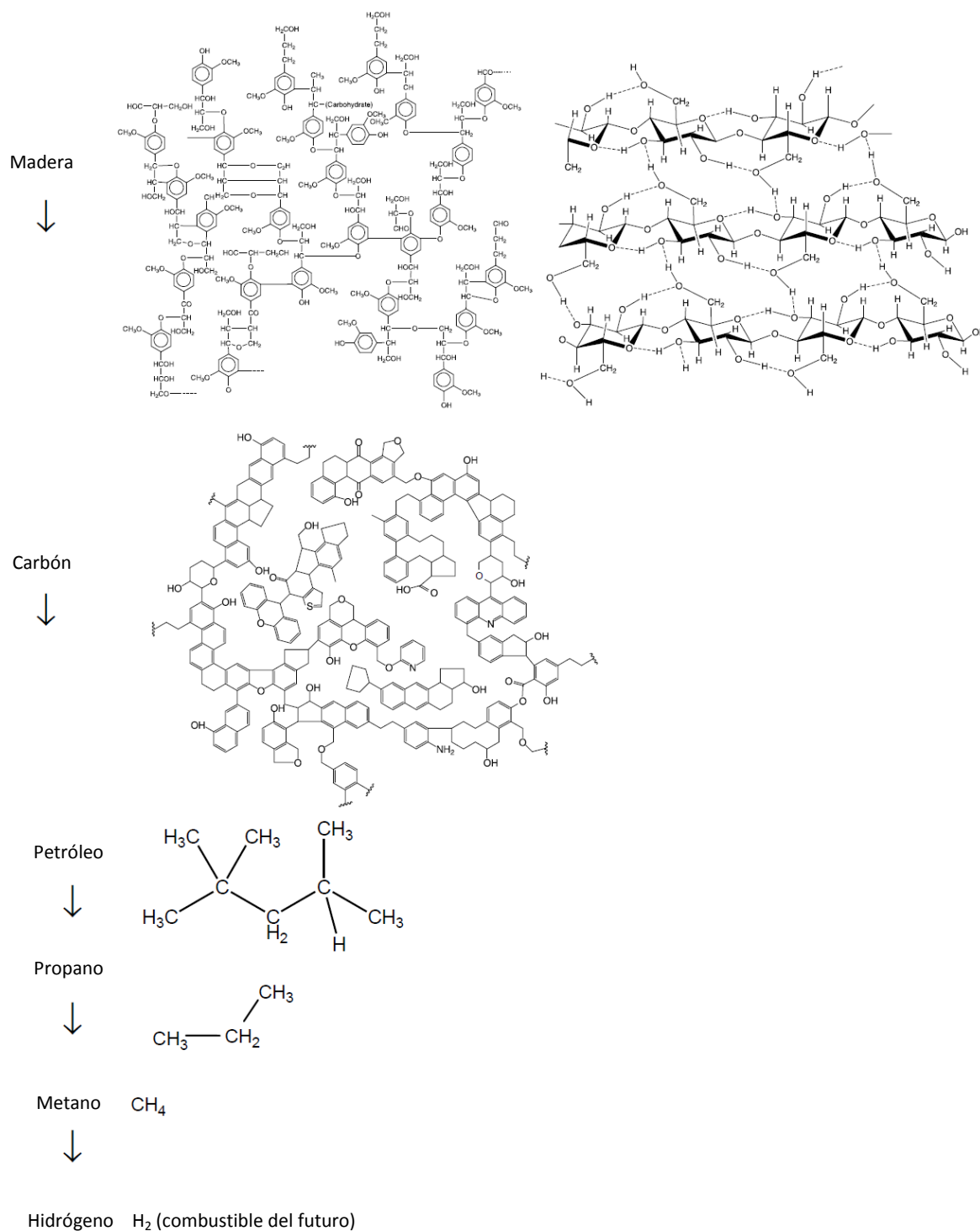


Figura 7. Evolución del uso de combustibles, de acuerdo a su estructura molecular. Con el paso del tiempo, la molécula de combustible ha perdido contenido de carbono, y se ha enriquecido de hidrógeno [9].

2.3.3 Aplicaciones actuales del hidrógeno como combustible

Los vehículos de celda de combustible (FCV) han emergido recientemente como una alternativa de cero emisiones a los vehículos de batería eléctrica (EV). Tal como los vehículos EV, los vehículos FCV no producen emisiones contaminantes, y también tienen el potencial de ser considerados cero emisiones en un ciclo completo de combustible, cuando este sistema se acopla a un sistema de fuentes de energía renovables. Sin embargo, en contraste con el auto eléctrico de batería, el vehículo FCV puede ser llenado con hidrógeno a velocidades comparables a la de la gasolina [16].

En Estados Unidos, el estado de California ha sido líder en la implementación de programas de vehículos con celda de combustible de hidrógeno. Muchos fabricantes de automóviles han hecho convenios con empresas públicas para el empleo de flotillas de autos FCV, como parte del proceso de implementación de esta tecnología. La agencia de autobuses AC Transit, la cual opera en la región de la bahía este y Oakland, ha utilizado unidades desplazadas con hidrógeno en rutas selectas por varios años [16]. Flotillas de autobuses están siendo ya utilizados en ciudades europeas.

Algunas compañías, como Honda, DaimlerChrysler, Ford Motor Company, General Motors Corporation/Opel, Hyundai Motor Company, Kia Motors Corporation, la alianza Renault SA y Nissan Motor Corporation y Toyota Motor Corporation están desarrollando proyectos relacionados con los vehículos de hidrógeno. Algunas de ellas incluso han apostado estratégicamente por un futuro energético basado en las tecnologías de hidrógeno, una corriente que ha dado lugar al concepto de Sociedad del Hidrógeno, que a menudo se intercambia con el de economía del hidrógeno. Por ejemplo, el fabricante de automóviles japonés Honda, la única firma que ha obtenido la homologación para comercializar su vehículo impulsado por pila de combustible de hidrógeno, el FCX Clarity [20], en Japón y Estados Unidos, ha desarrollado también la Home Energy Station, (HES), un sistema autónomo y doméstico que permite obtener hidrógeno a partir de energía solar para repostar vehículos de pila de combustible y aprovechar el proceso para generar electricidad y agua caliente para el hogar.

A día de hoy (noviembre 2009), Honda es la única firma que ha obtenido la homologación para comercializar su vehículo impulsado por este sistema en Japón y Estados Unidos. El FCX Clarity empezó a comercializarse en Estados Unidos en julio de 2008 y en Japón en noviembre del mismo año. De momento, la compañía no ha anunciado planes de comercializarlo en Europa, aunque sí se sabe que en el centro de I+D de Honda en Alemania ya trabajan con el FCX Clarity.

En el discurso estratégico de Honda, el reto de desarrollar el FCX Clarity se ha convertido en un símbolo del futuro por el que la compañía ha apostado: la Economía del Hidrógeno. La compañía ha reiterado en numerosas ocasiones que considera la pila de combustible como la tecnología del futuro inmediato, que sustituirá los sistemas híbridos que actualmente produce. Al generar la energía que lo impulsa a partir de una pila de combustible de hidrógeno, lo único que emite el FCX Clarity (*figura 8*) al ambiente es vapor de agua. En septiembre de 2009, diferentes compañías (Honda, Daimler AG, Ford Motor Company, General Motors Corporation/Opel, Hyundai Motor Company, Kia Motors Corporation, la alianza Renault SA y Nissan Motor Corporation y Toyota Motor Corporation), firmaron un acuerdo para homogeneizar el desarrollo y la introducción al mercado de vehículos eléctricos impulsados con pila de combustible, lo que se consideró un gran paso hacia la producción en serie de vehículos de emisión cero. En el acuerdo, las compañías anticipaban que a partir del año 2015 una cantidad significativa de vehículos eléctricos con pila de combustible podrían ser comercializados

El Honda FCX Clarity tiene unas prestaciones prácticamente comparables a las de los vehículos convencionales. Mediante la utilización de la pila Honda V Flow, en combinación con una batería de iones de litio y un depósito de hidrógeno, que impulsa el motor eléctrico del vehículo, puede alcanzar los 160 km/h y tiene una autonomía de 460 kilómetros. La electricidad que carga la batería e impulsa el vehículo proviene de la reacción química que se produce en la pila de combustible entre el combustible, hidrógeno, y el oxígeno de la atmósfera, cuyo resultado es únicamente vapor de agua. Los excedentes de energía procedente de la pila y de la energía cinética, que se obtiene del

frenado y de la desaceleración, se almacena en la batería, y se utiliza para complementar la potencia de la pila de combustible cuando es necesario [20].



Figura 8. Automóvil Honda FCX Clarity, desplazado por un motor eléctrico que recibe energía de una celda de combustible de hidrógeno. Actualmente se ofrece en renta al público por \$600 USD al mes [20].

El Honda FCX Clarity representa una importante mejora en eficiencia energética, ya que aprovecha el 60% de la energía generada a partir del combustible, frente al 30% de los híbridos y el 19% de los vehículos de gasolina. El FCX Clarity ofrece una mejora del 20% en economía de combustible (2-3 veces el consumo de combustible de un vehículo de gasolina, y una 1,5 veces el de un vehículo híbrido de tamaño y rendimiento similar). Además, con este vehículo Honda ha superado retos tan complejos como conseguir que el sistema de pila de combustible de hidrógeno funcione a temperaturas por debajo de los -30°C [20].

Desde hace más de 30 años, Honda ha estado trabajando para reducir el impacto medioambiental de los automóviles. Los logros de Honda en este campo incluyen la

primera certificación para un vehículo de pila de combustible de la Environmental Protection Agency (EPA) en 2003 [2] y de la California Air Resources Board (CARB) en Estados Unidos (2002); el primer leasing de un vehículo de pila de combustible (2002); y el primer y único en ser entregado a un cliente particular (2005, 2007).

En otras aplicaciones, existen proyectos vigentes para realizar vuelos en aviones movidos con hidrógeno [21]. El avión X-43 de la NASA es uno de ellos, aunque se espera que en el futuro el uso de este combustible se extienda a aviones de carga, y posteriormente a aviones de pasajeros. El ejército de los Estados Unidos ya tiene prototipos de vehículos movidos con hidrógeno, los cuales tienen el beneficio añadido de que no dejan huella de calor, como los vehículos de combustión.

Finalmente, hoy día el hidrógeno continúa siendo un combustible muy importante en la exploración aeroespacial. Cabe recordar que desde la infancia del programa aeroespacial de los E.U., el hidrógeno comenzó a ser utilizado por su baja densidad y su alto poder energético. No solamente es utilizado en la propulsión, sino también para proveer energía a los sistemas en el interior de los vehículos, a través de celdas de combustible. El agua con alto grado de pureza, proveniente de la operación de las celdas de combustible es utilizada para consumo de los astronautas. Cuando el hidrógeno es usado también como refrigerante.

Las tablas 5, 6 y 7 muestran las características de una celda de combustible de hidrógeno, así como de un automóvil desplazado con este tipo de dispositivo.

Tabla 5. Características de una celda de combustible para generar electricidad a partir de hidrógeno [18].

Voltaje en terminales	0.6 volt
Amperaje	0.6 a 0.8 Amperes por cm ²

Tabla 6. El hidrógeno y el automóvil con celda de combustible. Características de un auto impulsado con hidrógeno [18].

Consumo	~ 1 kg H ₂ /100 km
Autonomía	500 km
Tanque de 5 kg de H ₂	125 l H ₂ gas a 700 bar, 75 l H ₂ liq. a -253°C
Estación de servicio	1 kg H ₂ /min., completamente lleno en 5 minutos
Emisiones de un automóvil movido por H ₂ .	0 g CO ₂ /km y 90 g H ₂ O/km
Emisiones de un automóvil movido por gasolina (7 l/100 km)	160 g CO ₂ /km y 75 g H ₂ O/km

Tabla 7. Calculos “Wheel to Wheel”. Los cálculos "wheel to wheel" toman en consideración las cantidades de dióxido de carbono emitidas durante la producción del combustible (hidrógeno o gasolina), y durante su uso en el vehículo. En este caso, el hidrógeno es producido por la reforma del metano, y distribuido en tuberías [18].

Emisión “Well-to-wheel” de un auto desplazado por H ₂	90+0 = 90 g CO ₂ /km
Emisión “Well-to-wheel” de un auto desplazado por gasolina (7l/100 km)	30 + 160 = 190 g CO ₂ /km
Rendimiento de producción del hidrógeno	58%
Rendimiento de producción de la gasolina	88%
Desempeño de un motor de combustión interna desplazado por gasolina	19%
Desempeño de un motor eléctrico desplazado por celda de combustible	50%
Eficiencia energética de un auto movido por gasolina	88 x 19 = 17%
Eficiencia energética de un auto movido por hidrógeno	58 x 50 = 29%

Tabla 8. Metas de la tecnología de celdas de combustible operadas con hidrógeno [18].

Cost of the fuel cell	\$30/kW (or €2,200 for 100 HP)
Life span	5000 hr. (250,000 km for an average speed of 50 km/h)
Cost(2) of hydrogen	€3 to €5 (excluding tax)/kg, or €3 to €5 for 100 km
Cost of gasoline	€3.5 (excluding tax) to drive 100 km (7l/100 km, €1.5/l, 66% taxes)

2.3.4 Producción de Hidrógeno

2.3.4.1 Métodos clásicos

La producción de hidrógeno a partir de la gasificación de combustibles consiste en tres pasos:

1) Obtención del gas de síntesis por gasificación. Se parte de un compuesto carbonoso – como carbón, oxígeno y agua– que da una serie de productos que, al final, mayoritariamente, están compuestos fundamentalmente de monóxido de carbono, hidrógeno e impurezas. Dependiendo del combustible base y del proceso de gasificación que se utilice, las impurezas serán unas u otras. Por ejemplo, si se utilizan procesos de lecho arrastrado de alta temperatura, no habrá impurezas solidas de carbono; si se utiliza coque de petróleo o carbón con azufre, tendremos muchas impurezas de azufre; si se utiliza gas natural, no habrá cenizas y las impurezas serán mucho menores. En general, todos los procesos son similares.

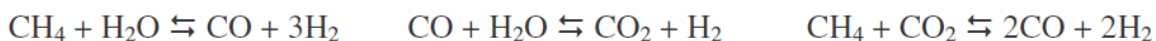
Una reacción con oxígeno controlado viene a producir un gas de síntesis, que hace cien años se conocía como gas ciudad (mezcla de monóxido de carbono e hidrógeno, con variaciones de la proporción según el combustible primario que utilizemos).

2) Shifting de monóxido de carbono o la reacción gas-agua, que consiste en transformar el monóxido de carbono a partir de vapor de agua en CO_2 e hidrógeno, de modo que al final, después de haber limpiado el gas de síntesis y haber hecho el shifting, queda una mezcla de CO_2 e hidrógeno.

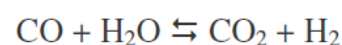
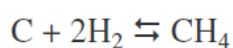
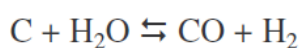
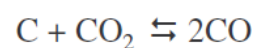
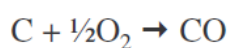
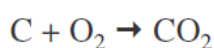
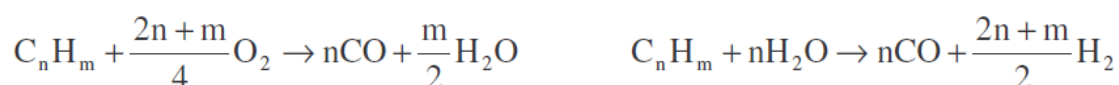
3) Separación del CO_2 e hidrógeno. Esta técnica de gasificación de gas de síntesis para producir hidrógeno conlleva que se obtengan dos productos: hidrógeno y CO_2 . Se puede obtener hidrógeno descarbonatando, el combustible fósil, con las nuevas técnicas de captura y almacenamiento geológico de CO_2 . Es decir, se unen las últimas tendencias de cómo evolucionar en la producción y distribución de energía de forma limpia [2].

En la actualidad, aproximadamente el 96% de la producción mundial de hidrógeno se obtiene a partir de materias primas fósiles (*figura 9*). Todos estos métodos pasan por la obtención de gas de síntesis mediante alguno de los siguientes procesos, cuyas reacciones principales se describen a continuación:

- Reformado con vapor de gas natural o naftas ligeras



- Oxidación de fracciones petrolíferas pesadas y (gasificación) carbón



Como se puede ver, el gas de síntesis consiste en mezclas de hidrógeno, monóxido de carbono (productos principales), dióxido de carbono, vapor de agua añadido en exceso y otros productos formados en reacciones secundarias. La proporción entre los distintos componentes depende tanto de las materias primas empleadas como del proceso de obtención.

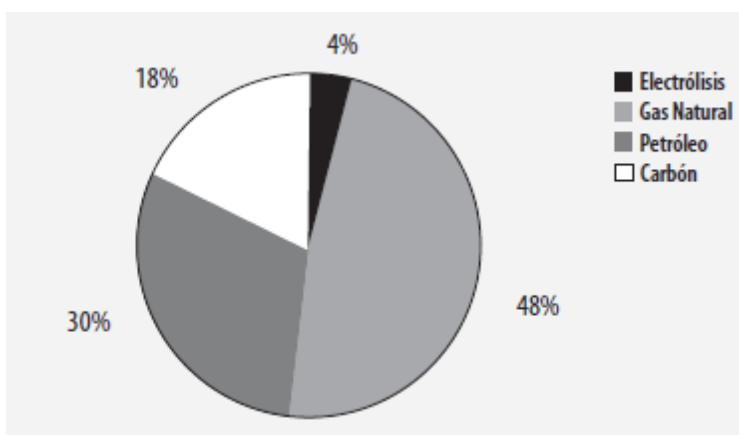


Figura 9. Distribución de la producción de hidrógeno por fuente de energía primaria [2].

Es necesario eliminar los componentes restantes hasta conseguir el hidrógeno de suficiente pureza para las posteriores aplicaciones, que pueden ser tan exigentes como algunas células de combustible que requieren valores muy altos.

En la *Figura 10* se muestra un diagrama de bloques donde se resumen las etapas habituales del proceso global de purificación. En la última de ellas se recogen las dos operaciones habituales, metanación y PSA (pressure swing adsorption), aunque recientemente se ha desarrollado la oxidación selectiva de CO.

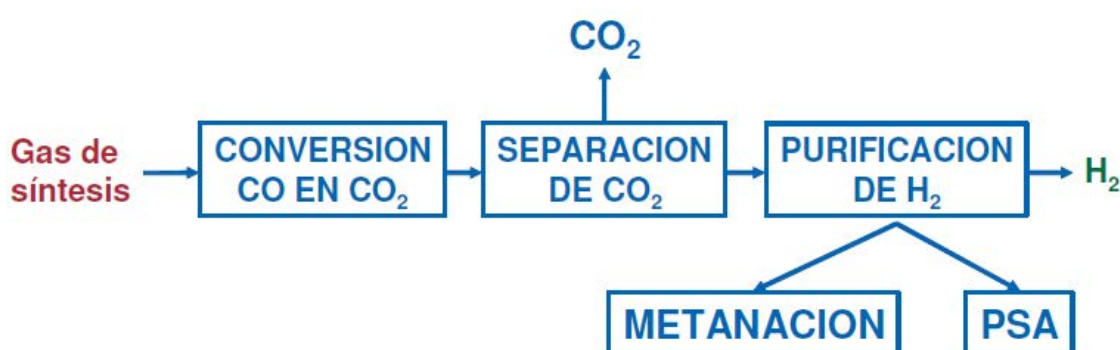
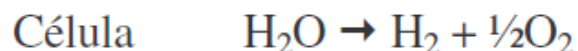
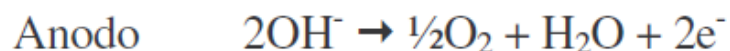
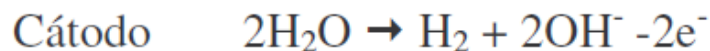


Figura 10. Etapas habituales del proceso de obtención y purificación de hidrógeno [8].

Un proceso alternativo que actualmente supone el 4% de la producción mundial de hidrógeno es mediante electrolisis del agua. No obstante, se prevé un aumento importante de esta vía, ya que actualmente se pretende que el hidrógeno sustituya a los combustibles fósiles como fuente de energía. Por tanto, es lógico intentar desligar completamente el hidrógeno de dicho tipo de materias primas. Un factor a considerar son los recientes desarrollos de aplicar energías baratas a la electrolisis del agua, como la fotovoltaica [11].

Los equipos utilizados más habituales son los electrolizadores alcalinos, que emplean como electrolito una disolución alcalina, típicamente disoluciones de hidróxido potásico. Las reacciones que tienen lugar en estos sistemas son las siguientes:



Una línea que está despertando especial interés en EE.UU. es la producción fotoelectroquímica. Este sistema es capaz de dividir la molécula de agua en hidrógeno y oxígeno, usando sólo la luz solar. A diferencia de los sistemas fotovoltaicos, éstos no necesitan cableado o convertidores externos. El sistema de recolección de radiación solar es capaz de generar suficiente voltaje para descomponer el agua [2].

2.3.4.2 Gasificación de biomasa con posterior conversión

En la misma línea de independizar la obtención del hidrógeno de las materias primas fósiles, la biomasa, al ser renovable, es una de las fuentes más prometedoras. Los estudios más avanzados se basan en su gasificación combinada con conversión basada en la reacción de desplazamiento de monóxido de carbono ($\text{CO} + \text{H}_2\text{O} \leftrightarrow \text{CO}_2 + \text{H}_2$).

Este planteamiento está en consonancia con las líneas de investigación potenciadas por los gobiernos de las principales potencias mundiales. Así, en el Sexto Programa Marco de la Unión Europea se fija como objetivo “el desarrollo de tecnologías eficaces energética y económicamente para la producción de gases ricos en hidrógeno a partir de distintas biomasa, incluyendo los residuos procedentes de biomasa”. Por su parte, el Departamento de Energía de Estados Unidos (DOE) dentro del programa Visión 21 está financiando proyectos dirigidos a la separación de hidrógeno de mezclas de gases obtenidas en diferentes procesos industriales, siendo un ejemplo de los mismos la gasificación [2].

Como la biomasa tiene un mayor contenido en volátiles (70-86% en base seca) que el carbón (hasta un 30%), la primera etapa de pirólisis de la gasificación juega un papel más

importante con la biomasa. Se produce el craqueo térmico de la fase gaseosa formada, reduciendo los niveles de alquitrán, que se gasifica en la segunda etapa del proceso mediante reacciones con oxígeno, vapor e hidrógeno. Parte del alquitrán sin convertir puede quemarse para liberar el calor necesario para las reacciones de pirólisis endotérmicas.

En la *tabla 9* se resume el estudio elaborado por la Agencia Internacional de la Energía durante 2003, haciendo previsiones de los costes de la producción de hidrógeno para el año 2020. Se observa que el más económico era la obtención de hidrógeno a partir de gas natural, con captura de CO₂, ya que, a pesar de incluir los costes de separación de CO₂, el coste de producción se esperaba que fuera más barato que los otros métodos. El segundo sistema era a partir del carbón, con un GICC (Gasificación Integrada en Ciclo Combinado), también con captura y almacenamiento de CO₂. Se estimaba este coste. En ese estudio se estimaron los precios que se iban a alcanzar para el gas natural para el año 2020, estos precios se alcanzaron en 2006. Es decir, que la evolución del precio del gas natural es una gran incógnita; no así la del carbón, que fue bastante estable (aumentaron los precios, pero dentro de las cifras previstas).

Desde el punto de vista económico, el GICC con captura de CO₂ parece ser un método adecuado para conseguir unos precios equivalentes, óptimos o razonables en cuanto a la producción de hidrógeno; al menos de forma transitoria, mientras se avanza en energías renovables u otras fuentes de energía [2].

2.3.4.3 Tecnología GICC. Gasificación Integrada en Ciclo Combinado

La planta de GICC de Puertollano, España, es la mayor planta de este tipo que existe en el mundo. Es una planta de gasificación integrada en Ciclo Combinado Convencional que puede funcionar con gas natural o con gas sintético o de síntesis. Para el gas sintético se necesita una cadena de producción que permite preparar el combustible, un gasificador, que por la integración en el enfriamiento del gas se aprovechan los vapores generados en

el ciclo combinado, hay una separación de cenizas, un lavado húmedo y una separación de azufre [2].

De este modo, se obtiene una mezcla de monóxido de carbono e hidrógeno.

Tabla 9. Comparación de costos de producción de hidrógeno [2].

Producción de hidrógeno	€/GJ H ₂ , previsión para año 2020
H ₂ de gas natural con captura de CO ₂	5,6 – 8,9*
H ₂ de carbón - GICC con captura de CO ₂	6,5 – 8,9
H ₂ de biomasa (gasificación)	8,1 – 14,5
H ₂ de energía nuclear	12,1 – 16,2
H ₂ de energía eólica	13,7 – 18,6
H ₂ de energía termosolar	21,8 – 28,3
H ₂ de energía solar fotovoltaica	38,0 – 60,6

*Los precios considerados para el 2020 se alcanzaron en 2006

2.3.4.4 Producción de hidrógeno con energía solar

No se sabe si va a existir una economía del hidrógeno o no, ni cuándo va a llegar, pero resulta evidente que si hay hidrógeno y se quiere que ese hidrógeno sea sostenible en una economía del hidrógeno desarrollado, al final tendrá que tener una componente importante de hidrógeno solar.

¿Qué valor añadido puede tener el hidrógeno? En primer lugar, permite, de alguna manera, pensar hasta cierto punto en hacer energía solar más flexible, es decir, tratar de conseguir que el hidrógeno permita que la energía solar penetre en la red de una manera más flexible; pero también hay otras opciones. El hidrógeno no es, ni mucho menos, el más atractivo de los productos que se pueden utilizar en la actualidad.

2.3.4.5 Rutas básicas de producción de hidrógeno vía solar

Para obtener hidrógeno a partir de la energía solar se disponen principalmente de tres tecnologías: por vía electroquímica, mediante energía solar termoeléctrica, o mediante fotovoltaica. Si se utiliza el aprovechamiento térmico, se puede utilizar el componente fotónico, e incluso las características espectrales de la radiación solar para hacer desarrollos más avanzados vía fotoquímica, fotocátalisis o fotoelectroquímica.

En la *figura 11* se ve reflejado con datos de la Agencia Internacional de la Energía (AIE). En el caso de la energía solar termoeléctrica, cuyas primeras plantas comenzarán a aflorar en los próximos años, sobre todo en España y en California, de una electricidad que se obtiene a un precio tres veces superior al de mercado, y en el caso de la fotovoltaica, hasta seis veces por encima. Evidentemente, producir hidrógeno a partir de un producto tan caro, a corto plazo no parece que tenga mucha lógica [2].

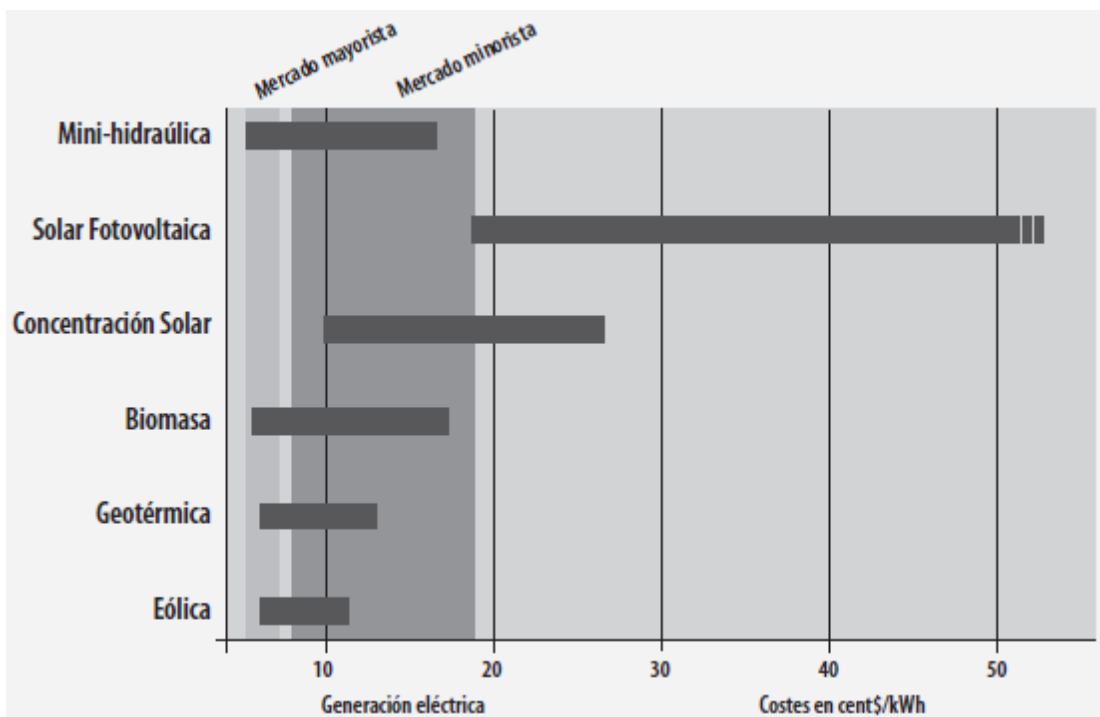


Figura 11. Costos de las distintas tecnologías de producción de hidrógeno [2].

2.3.4.6 Descarbonización solar de combustibles fósiles

La energía solar puede tener en una o dos décadas cierto impacto si se apuesta por ella en dos ramas: en la producción con ciclos termoquímicos; y por otro lado, a corto plazo, en ciertas oportunidades de descarbonización, que consiste en incorporar procesos alotérmicos en los cuales se puede utilizar la energía solar, para emplear únicamente el combustible fósil como reactivo químico y como fuente de hidrógeno, y dejar a otra fuente energética que aporte la energía necesaria para el proceso (*figura 12*).

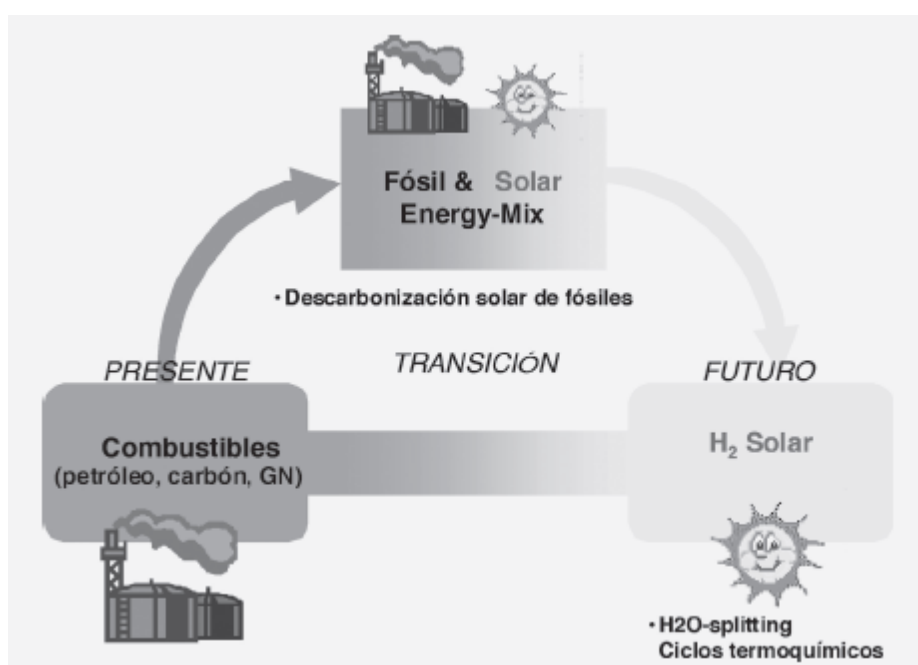


Figura 12. Descarbonización solar de combustibles fósiles [2].

En la *figura 13* se observa que la energía solar puede estar en medio, a diferencia del grupo inferior, que son fuentes energéticas con la capacidad de asociarse con transducción directa a electricidad, y de ahí a hidrógeno; o a diferencia de las fuentes energéticas que per se ya son suministradoras de hidrógeno. Es decir, tiene la capacidad de integrarse en los procesos marcados en rojo y en los marcados en azul, bien mediante la producción de electricidad o bien mediante la incorporación a procesos

termoquímicos. El inconveniente que tiene la disociación de la molécula de agua es que requiere muchísima más energía; se necesita seis veces más energía para romper el enlace y liberar el hidrógeno en el caso de un hidrocarburo, como puede ser el gas natural, frente a la molécula de agua; 240 kJ frente a menos de 50 kJ. Por eso, se necesita tener fuentes de energía muy baratas si se quiere emplear seis veces más energía.

La energía solar podría entrar en algunos procesos como la energía solar combinada con el reformado de metano, la energía solar combinada con la fotocatálisis, o la electrolisis. Pero también se pueden tener procesos en los cuales la energía solar entre en la parte de producción a partir de agua en procesos termoquímicos. Hay una justificación del sentido de algunos procesos híbridos, ya que se podría tener durante algunas décadas procesos más baratos en términos de producción de hidrógeno.

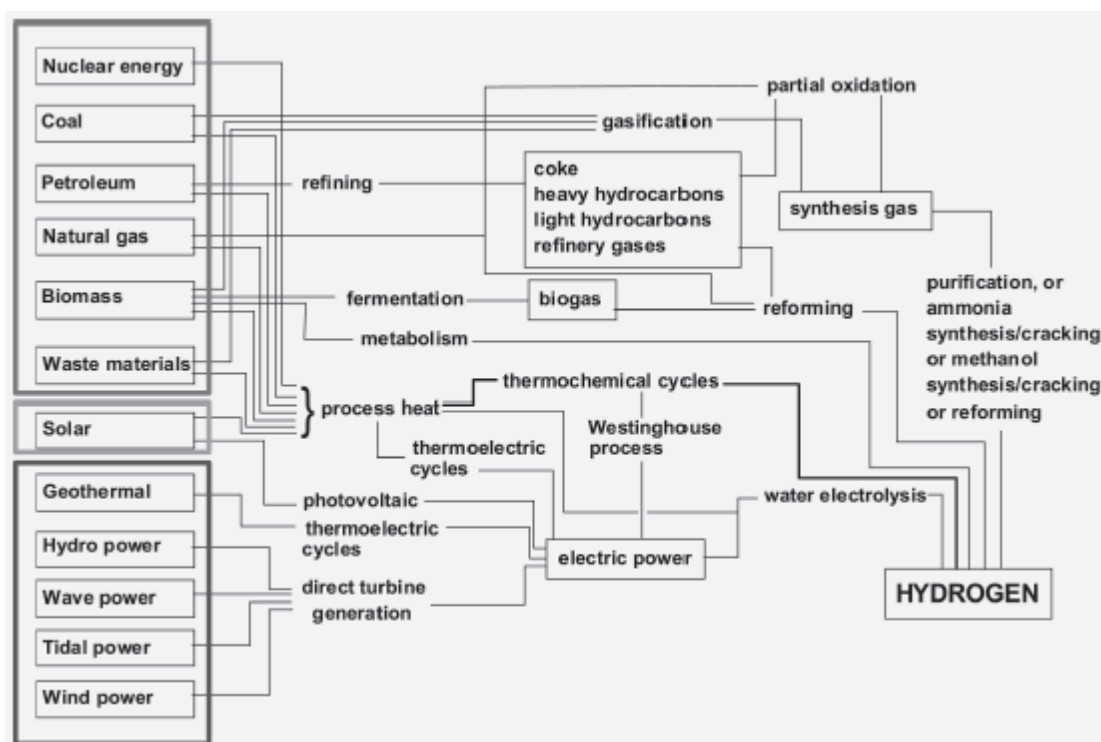


Figura 13. Rutas de producción de H_2 : termoquímicas y electroquímicas [2].

La ventaja que tiene analizar la aplicación de la energía solar para la producción y aplicación de hidrógeno al final en una pila de combustible es que se puede aplicar todo el análisis que se aplica normalmente a la energía solar cuando se produce electricidad. Si se aísla todo, lo que se tiene es una máquina térmica. Se está introduciendo energía térmica a una temperatura H y una energía Q , y al final lo que se está produciendo es trabajo.

Si se quiere hacer este tipo de aplicación se tiene que concentrar mucho, a procesos de altas temperaturas, que en muchos casos superan los 1.000°C y, por lo tanto, se tiene que ir a concentraciones solares de 1.000 a 5.000 veces. En la actualidad se están investigando sistemas de este tipo, de receptor central. Un ejemplo es el del CIEMAT en Almería y en algunas plantas de producción de electricidad.

En la actualidad existen tecnologías de reactores y existen concentradores que ya están permitiendo trabajar en sistemas de varias decenas de MW a temperaturas por encima de los 1.000°C . En Almería se ha llegado a los 1.200°C y por encima de los 2 MW/m^2 [2].

2.3.4.7 Hidrógeno solar y rutas termoquímicas

Existen dos tipos de rutas: unas asociadas a la descarburación de combustibles, que son las que podrían permitir que las tecnologías de concentración se aplicasen a procesos existentes ya, como son reformado, cracking, gasificación, etc.: todas estas tecnologías podrían adaptarse a trabajar con energía solar. En cuanto a las rutas asociadas a la disociación de agua, éstas están asociadas a procesos más a largo plazo, basados en la descomposición de óxidos metálicos, volátiles o no volátiles, o bien en el uso de ciclos que están desarrollando en el sector nuclear, basados en sulfuros.

El interés actual de la energía solar se centra especialmente en los óxidos metálicos (*figura 14*), en los llamados HT H_2O -Splitting Cycles. Se trabaja principalmente con óxidos volátiles, como el óxido de zinc, que exige muy altas temperaturas, pero que tiene una

química muy sencilla, u óxidos no volátiles, fundamentalmente los basados en ferritas mixtas y espinelas.

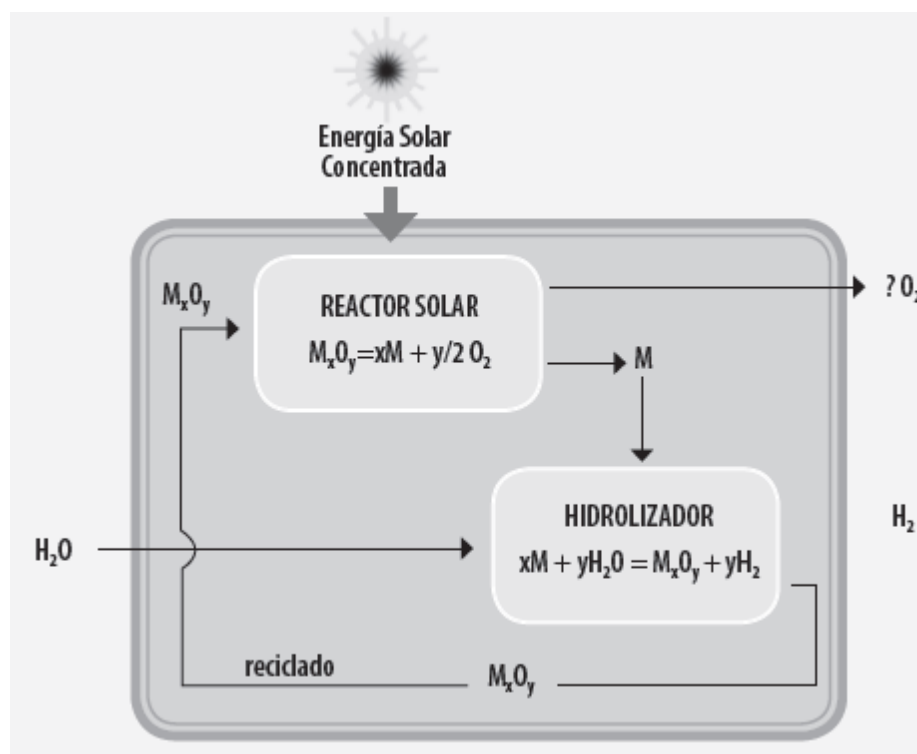


Figura 14. Disociación del agua con óxidos metálicos [2].

2.3.4.8 Energía eólica e hidrógeno

La energía eólica es la energía renovable más desarrollada. Mundialmente, la potencia instalada supera ya los 74 GW. Pero que sólo supone el 0,5% del consume eléctrico mundial. El 70% de esta potencia eléctrica está instalada en Europa, donde se es líder en energía eólica. Dentro de Europa, tras Alemania, que es el país que va en cabeza, España es el segundo país, con más de 11.000 MW instalados en la actualidad, con puntas de cobertura de demanda de más del 30%, con un objetivo muy ambicioso del PER (Plan de Energías Renovables) que es tener instalados en 2010 más de 20.000 MW [2].

En cuanto a las ventajas de la energía eólica, éstas son innumerables. Es una fuente de energía gratuita e inagotable, no contaminante, de un enorme potencial, apta para la

generación distribuida, genera grandes beneficios socio-económicos tanto a nivel rural como a nivel industrial, y goza de una madurez tecnológica muy importante con un 97% de disponibilidad de los aerogeneradores en la actualidad. Entre sus desventajas, se incluyen los costes de inversión, que todavía siguen siendo superiores a los de otras fuentes de generación, la afección paisajística o el ruido, aunque su mayor inconveniente no es otro que su naturaleza aleatoria y discontinua.

El vector hidrógeno puede mitigar el efecto negativo de la naturaleza aleatoria de la energía eólica. A partir de energía eólica y agua, mediante un proceso de electrólisis en un electrolizador, se puede obtener hidrógeno *Figura 15*. Las eficiencias de estas células se estiman entre el 75 y el 90% dependiendo de los tipos de electrolizadores, ya que hay alcalinos, de membrana, de intercambio protónico y óxidos sólidos que se encuentran en un estado de desarrollo muy incipiente [2].

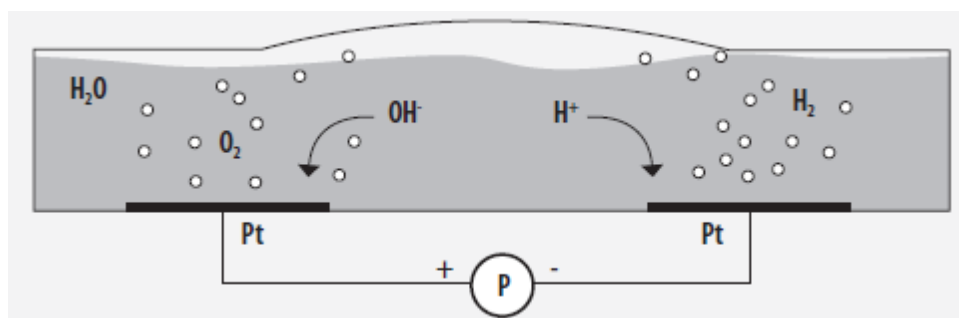


Figura 15. Electrolizador que funciona con energía eólica [2].

Los electrolizadores alcalinos son los que tienen como electrolito una disolución normalmente de hidróxido de potasio para permitir la transferencia de iones, y tienen también una membrana separadora para impedir que los gases generados vuelvan a recombinarse.

Los electrolizadores PEM de membrana polimérica, como su nombre indica, cuentan como electrolito con una membrana sólida, un sólido polimérico. Si se comparan los aspectos más relevantes de ambos sistemas, en cuanto al grado de desarrollo, los

electrolizadores alcalinos cuentan con un mayor grado de desarrollo que los electrolizadores PEM. Los costes de inversión de los electrolizadores alcalinos son inferiores que los de los electrolizadores PEM, en gran medida por su mayor grado de desarrollo, y en cierta medida por otros factores, como puede ser que los electrolizadores PEM cuentan con metales nobles como catalizadores. Los costes de operación y mantenimiento son, sin embargo, inferiores en los electrolizadores PEM, debido a que en los electrolizadores alcalinos el electrolito es corrosivo y esto supone importantes costes de operación y mantenimiento. En cuanto al potencial de reducción de costes, dado que el grado de desarrollo de los electrolizadores PEM es inferior, tienen un mayor potencial de reducción.

La presión a la que se genera el hidrógeno es también un aspecto muy importante de cara a la eficiencia global del proceso de producción de hidrógeno. Los electrolizadores alcalinos generan unas presiones inferiores, que oscilan entre la presión atmosférica y una presión de alrededor de 30 bar en los casos de los modelos más avanzados de tipo bipolar. Y los electrolizadores PEM cuentan, sin embargo, con la ventaja de que generan a presiones superiores, de alrededor de los 70 bares.

En cuanto al volumen de generación de hidrógeno, los electrolizadores alcalinos cuentan con ventaja de nuevo. En el mercado se pueden encontrar electrolizadores con volúmenes de generación en torno a los 400 normal m³/h, frente a los electrolizadores PEM, con los que lo máximo que se puede obtener es unos 10 normal m³/h, y los fabricantes están encontrando grandes dificultades para escalar estos tamaños [2].

En cuanto a la eficiencia, los electrolizadores PEM tienen una eficiencia ligeramente superior a los alcalinos. En durabilidad, los alcalinos tienen una durabilidad mayor. Los fabricantes de electrolizadores alcalinos, en la actualidad, garantizan entre 15 y 20 años de vida para estos equipos, mientras que para los electrolizadores PEM, aunque se les estima una vida de 100.000 horas, los fabricantes ni siquiera pueden garantizarlo.

Otro aspecto importante de cara a su integración con renovables, debido a la naturaleza discontinua, es la adaptabilidad a variaciones de corriente, y en este sentido los electrolizadores PEM cuentan con ventaja respecto a los alcalinos.

En cuanto al volumen de producción de hidrógeno que se puede esperar a partir de energía eólica, si se realiza una estimación, considerando que en 2020 en la UE habrá tres millones de vehículos propulsados por hidrógeno, 12 GW eléctricos de generación estacionaria, y 6 GW para aplicaciones portátiles, considerando que en la actualidad la electricidad en Europa es un 1% de origen eólico, si se traslada ese porcentaje a lo que puede suponer la producción de hidrógeno a partir de energía eólica, esto lleva a obtener la cifra de que se necesitarían más de 20.000 MW eólicos para producir el 1% del hidrógeno necesario en la UE en 2020, y 5.000 MW en electrolisis [2].

Esto supone que para conseguir una optimización, para llegar a estos objetivos, es necesario que se lleve a cabo una integración de ambos sistemas: del electrolizador y del aerogenerador, lo que supone grandes retos tecnológicos, desde la adaptación de electrolizadores a esos regímenes de corriente variable, hasta la posibilidad de generación a altas presiones, la adaptación del aerogenerador, porque puede ser interesante la generación en continua, electrolizadores reversibles con electrolizador- pila de combustible, etc. Existen innumerables retos tecnológicos que afrontar para conseguir una integración óptima.

2.3.4.9 Esquemas de producción eólica y su utilización

En cuanto a los esquemas de producción, se puede considerar un primer sistema de producción distribuida (*figura 16*) en el que la electrolisis está asociada a un solo parque eólico. Se produciría el hidrógeno, se almacenaría y de ahí se transportaría, vía carretera o vía gasoducto, a los centros de utilización, e igualmente se podría emplear introduciéndolo en una pila de combustible o motor de combustión interna para la generación eléctrica y la gestión energética.

Otro esquema de producción posible sería la producción centralizada (*figura 17*), en la que el centro de electrolisis no estaría asociado a un solo parque eólico, sino que estaría asociado a varios parques eólicos, que enviarían una señal de control al centro que indicaría cuándo se debe realizar la producción. Con este sistema se ahorrarían los costes de transporte, ya que el almacenamiento se localizaría en los propios centros de consumo, y sólo habría que considerar los costes de distribución. Igualmente, podríamos introducirlo en una pila de combustible o un motor de combustión interna para realizar labores de gestión eléctrica.

Si se comparan los costes de ambos esquemas, se observa que, considerando un coste de electricidad de 33 euros por MW/h, el coste de la electricidad es el factor más determinante a la hora de definir el coste de producción de hidrógeno, tanto lo que cuesta producir esa electricidad como lo que se deja de ingresar por no emplear esa electricidad en verterla a la red (*figura 18*).

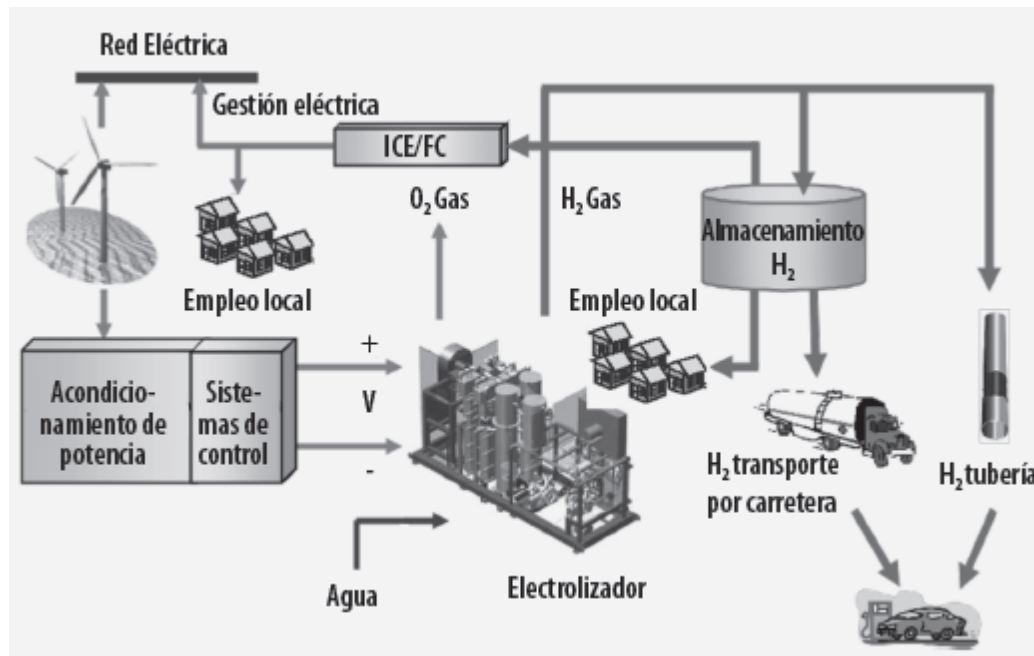


Figura 16. Producción distribuida de hidrógeno a partir de aerogeneradores [2].

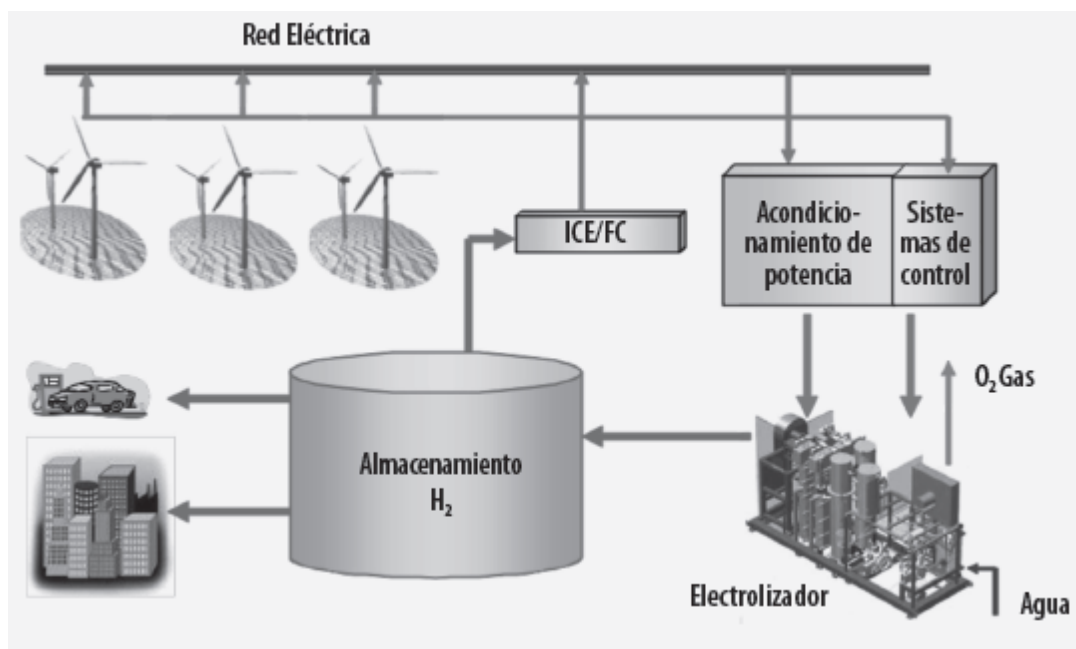


Figura 17. Producción centralizada de hidrógeno a partir de aerogeneradores [2].

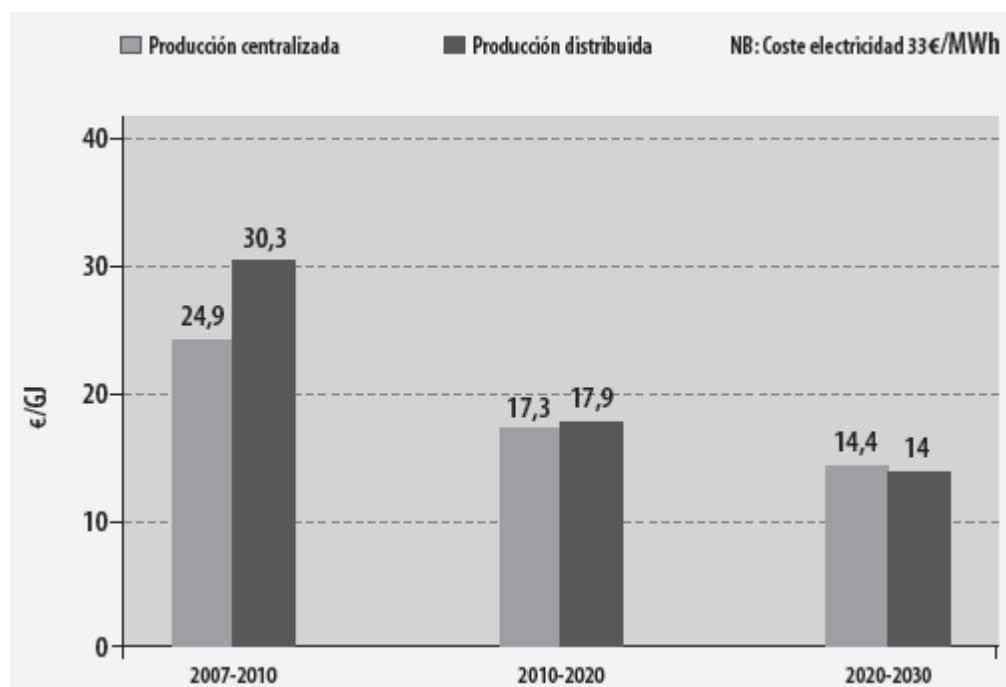


Figura 18. Comparación de costos utilizando tecnologías distribuida y centralizada [2].

Si se comparan ambos sistemas, se observa que la producción centralizada cuenta con unos costes considerablemente inferiores, a los que hay que añadir que esos costes no necesitarían el añadido de los costes de transporte. El principal factor que determina esto es el coste de la electrolisis; el electrolizador en la actualidad supone un coste muy importante en el porcentaje de distribución de los costes de producción del hidrógeno, y ese mayor factor de utilización que se conseguiría con la producción centralizada se refleja en una reducción de costes. Si avanzamos al medio, e incluso a largo plazo, se observa que, debido a la reducción de los costes de la electrolisis, esas diferencias se reducirían, aunque habría que tener en cuenta que, en un caso, habría que añadir después los costes de transporte, mientras que en el otro, los costes de transporte estarían incluidos.

En la *tabla 10* se muestra la comparación de los costes de producción con los de gas natural, considerando que estuviesen disponibles las tecnologías de secuestro, se iría a un sistema de producción con captura y secuestro. A pequeña escala se estaría en un margen más competitivo; a gran escala no se encontraría en un margen competitivo. Esto significa que, si se quiere incentivar la producción de hidrógeno de manera renovable, con los beneficios económicos y estratégicos que esto supone, hay que internalizar esos costes para que puedan ser competitivos con los de otras fuentes de producción convencionales.

Es importante destacar que la energía eólica parece que, a corto o medio plazo, será la energía renovable predominante en la producción de hidrógeno verde. Las sinergias existentes entre la energía eólica y el hidrógeno utilizado como sistema de almacenamiento intermedio, la necesidad de I+D en la integración de sistemas para un mayor desarrollo tecnológico y un desarrollo tecnológico que, junto con la internalización de los beneficios medioambientales y estratégicos que supone la producción de hidrógeno a partir de energía eólica, pueden conseguir que la producción de hidrógeno a partir de energía eólica se sitúe en márgenes competitivos con respecto a otras fuentes de producción.

Tabla 10. Comparación de costos de producción de hidrógeno a partir de gas natural [2].

	Pequeña escala	Gran escala
Precio gas natural (€/GJ)	3,2	2,4
Coste H ₂ (€/GJ)	11 (actual)	4,4 (actual)
Sin captura y secuestro de CO ₂	8 (futuro)	3,9 (futuro)
Coste H ₂ (€/GJ)	14 (actual)	5,4 (actual)
Con captura y secuestro de CO ₂ (gran escala)		4,4 (futuro)
Con impuesto CO ₂ (50€/t) (pequeña escala)	11 (futuro)	

2.3.4.10 Sistema de producción de hidrógeno mediante un convertidor de plasma PCS y un filtro StarCellTM

Éste es un proyecto en el que Materiales Renovados trabaja para el Departamento de Energía de EE.UU. desde 2003, y que lo que trata de hacer es ver la consistencia de la utilización de un sistema de tratamiento de residuos mediante arco de plasma con otro sistema que es un filtro de hidrógeno específico para este tipo de producción. En las dos últimas décadas se comenzó a experimentar con la idea de utilizar la tecnología de plasma en aplicaciones para tratamiento de residuos. Basándose en esta idea Startech Environmental Corporation ha desarrollado el Sistema de Convertidor de Plasma para el tratamiento de residuos [2].

Se utiliza la antorcha de plasma porque para el rango de temperaturas en que Materiales Renovados trabaja la transferencia de energía es mucho mayor y la disponibilidad de energía transferida al residuo es mucho mayor. El plasma permite trabajar a temperaturas mucho más altas, y además genera en el modelo de antorcha una distribución masiva del calor y los electrones, que hace que esa reacción sea más eficiente.

En el diagrama de flujo el sistema básicamente se compone de un sistema de alimentación, que se puede alimentar con sólido, líquido o gaseoso, o mezcla de sólido,

líquido o gaseoso. No es necesario separar ni clasificar los residuos para su tratamiento. A continuación, en la etapa 2, en la cámara PCS se genera el arco de plasma.

La intensidad del plasma excita y rompe los enlaces moleculares, produciéndose la “disociación molecular”, reciclando así residuos y convirtiéndolos en materias primas: un gas de síntesis, metales y silicato. La antorcha está motorizada para generar una distribución esférica del arco de plasma, y obtener electricidad por la parte superior y por la parte inferior se recogen los elementos más pesados, donde se tiene una base de silicio fundido, de silicatos variados, que son extraídos, obteniéndose un silicio completamente amorfo en el que hay incluidos diferentes metales, tierras raras, etc. En la parte media se obtiene la fracción ligera de esa gasificación, en la que básicamente está el gas de síntesis: monóxido de carbono e hidrógeno, algunos metales ligeros si los hubiera, como el mercurio o el cromo, y el cloro y el flúor, que también salen, y que suelen estar presentes en los residuos.

De esta etapa el gas sale como a unos 1,450°C, por lo que en la etapa 3 se hacen circular los gases por un intercambiador-recuperador de calor de alta velocidad, donde se realiza un enfriamiento ultrarrápido para llevarlo a 200°C, y recuperar energía en forma de calor, a continuación en la 4ª etapa, se pasa por un filtro de mangas para intentar recuperar los metales y las partículas que se pueden obtener en ese arrastre del gas; y por último en la 5ª etapa se pasan por torres de lavado o filtros de neutralización para neutralizar el cloro y el flúor con aporte de NaOH, que están en forma de ácido clorhídrico y ácido fluorhídrico, obteniéndose finalmente un gas limpio. Todo este sistema está movido por un aspirador, un ventilador que mantiene en una ligera depresión todo el circuito.

2.3.4.10.1 Cámara del sistema convertidor de plasma

La cámara de plasma es un crisol cerrado, en el que se trabaja a presión atmosférica y totalmente en continuo; éste se puede alimentar lateral o superiormente. El tener la antorcha con esa disposición y motorizada asegura que no sale ningún gas que no haya pasado por el arco de plasma, y, por lo tanto, asegura la destrucción total y reversible de cualquier tipo de material que se tenga en la cámara.

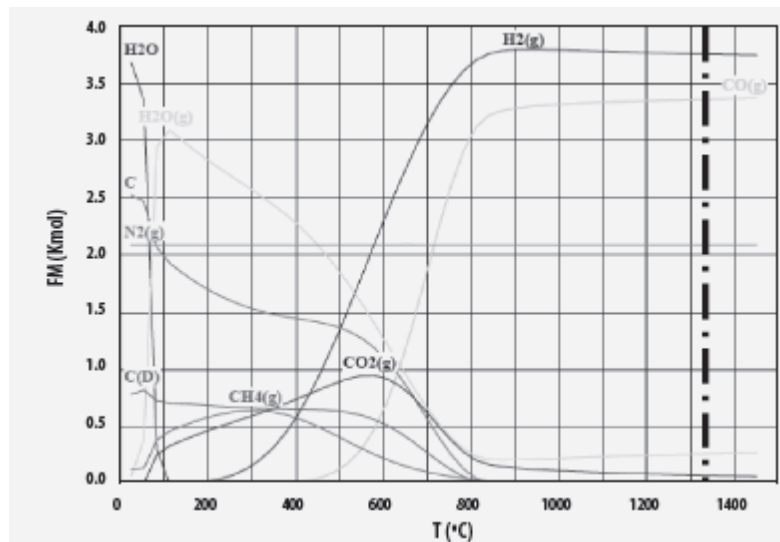


Figura 19. Gasificación de equipos electrónicos fuera de uso [2].

La pregunta que se siempre se plantea es si esta Tecnología consume mucha energía y la respuesta es positiva pero la energía que se obtienen en forma de gas de síntesis es mayor que la aportada y en un modo mucho más utilizable. Si se quemase un residuo, se obtendría una energía calorífica; si se convierte es un gas de síntesis, se pueden realizar aplicaciones más interesantes. Si se utilizan neumáticos, por ejemplo, se está obteniendo un rango de poder energético del gas de 12:1 respecto al consumo, y para la fracción seca del residuo sólido urbano, del orden de 4:1.

En la *figura 19* se muestra la gasificación de equipos electrónicos fuera de uso: placas. Lógicamente hay una variabilidad en el tiempo, porque los residuos no son tan

homogéneos como otras cosas. Se controla y procura obtener un gas de síntesis lo más de síntesis posible, es decir, con la mayor cantidad de monóxido de carbono e hidrógeno posible. Y para ello, se regula añadiendo o no añadiendo vapor de agua. Cuando el dióxido de carbono sube, se corta la aportación de vapor. Si se está en los niveles aceptables no se aporta, y si se observa que el dióxido está muy por debajo para potenciar la curva de crecimiento del monóxido y del hidrógeno, se aporta vapor de agua. El gas portante, la antorcha, no es ni más ni menos que un electrodo que salta un arco eléctrico de fuera a dentro, y se procura hacer pasar por medio de ese tubo un gas que hace un efecto de vórtice, que normalmente es oxígeno, pero que no es muy importante. Lo más importante es que tenga mucha presión. El consumo de oxígeno es pequeño.

2.3.4.10.2 Filtro de hidrógeno. StarCell

Una vez que se tiene el gas de síntesis, se llega a la parte industrial. Lo que se empezó desarrollando en 2003 fue un filtro de hidrógeno a medida del sistema. El primer desarrollo era un bloque muy sencillo, en cuyo interior únicamente había tres tubos, con los que se conseguía filtrar aproximadamente el 95% del hidrógeno que contenía ese gas.

En el último desarrollo, hay más filtros y se ha aumentado la presión al principio. Ahora mismo se está trabajando con temperaturas de 200°C y 10 bares de presión y la membrana da unos resultados satisfactorios. El proyecto actual tiene una continuidad hasta 2010.

El hidrógeno, inicialmente, estaba concebido para motores de combustión interna, puesto que era un hidrógeno no muy adecuado para las pilas de combustible normales.

En la actualidad existen coches en EE UU que se alquilan para probar el hidrógeno de combustión interna. El reto era conseguir hidrógeno más adecuado para las pilas de combustible más exigentes, es decir, para las que llevarían los coches [2].

2.3.4.11 Producción de hidrógeno con bioetanol

2.3.4.11.1 Reformado de etanol

Normalmente, cuando se habla de reformadores de bioetanol, se prefiere utilizar la palabra “procesadores”; esto es debido a que esta palabra incorpora tanto lo que sería realmente el reactor de reformado –reacción que produce una síntesis a partir del bioetanol– más una serie de bloques de purificación que aumentan la cantidad de hidrógeno y disminuyen la cantidad de venenos por la pila de combustible.

Una reacción de reformado es un proceso químico en el que, a través de una reacción con vapor de agua, y en presencia de un catalizador, se genera hidrógeno. En el caso del etanol se puede plantear la reacción de reformado mediante tres posibilidades: reformado sólo con presencia de agua, sólo en presencia de oxígeno, o en presencia de ambos, de tal manera que se tendrán diferentes composiciones a la salida. A la primera reacción se la conoce como reacción de vapor de agua (endotérmica), la segunda es una oxidación parcial (exotérmica) y la tercera es autotérmica (no requiere ni un aporte de calor ni tiene un excedente de calor en la reacción). Éstas son tres reglas básicas de reformado que se podrían plantear también, por ejemplo, con gas natural, o gasolina o diesel. Evidentemente, si se complican las cadenas de hidrocarburos, se complican las reacciones de reformado. Para que se produzcan estos procesos es necesario controlar las temperaturas, las presiones, y tener un catalizador que promueva esa reacción. Además, al no ser condiciones ideales, teóricas, esta reacción no se da por sí misma sino que se dan otros componentes que, en algunos casos, será necesario eliminar porque pueden llegar a ser veneno para las pilas de combustible, como son el metano y el monóxido de carbono. El monóxido de carbono, a niveles de partes por millón, es capaz de envenenar el combustible, con lo que hay que reducirlo por debajo de diez o veinte partes por millón.

En la *figura 20* se muestran las distintas reacciones que se producen en el sistema procesador. Después de la reacción de reformado, se produce una segunda reacción que

consiste en añadir agua para que el monóxido de carbono que esté presente en el gas de salida se convierta en dióxido de carbono y en hidrógeno.

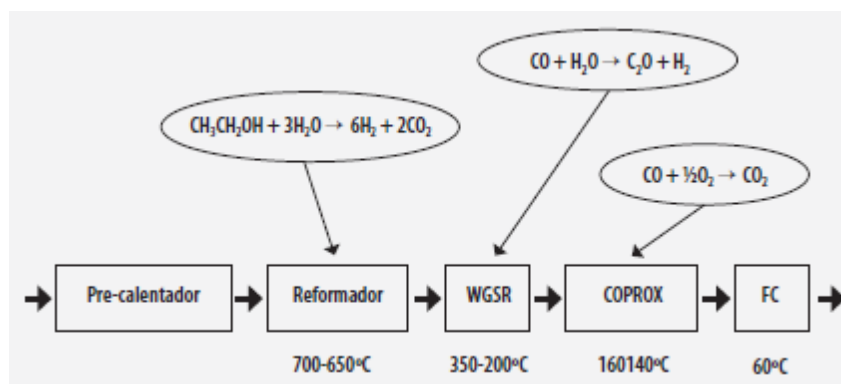


Figura 20. Sistema procesador de bioetanol (SPB), [2].

En la siguiente reacción, lo que se hace es añadir oxígeno para convertir el monóxido de carbono en dióxido de carbono. Al final, lo que se intenta es obtener a la salida es únicamente hidrógeno y dióxido de carbono.

Como se observa, las temperaturas varían entre 700 y 650 grados centígrados, van disminuyendo normalmente las temperaturas a medida que se van purificando en la siguiente etapa entre 350 y 200°C, 160 y 140°C y finalmente 60°C para una pila de combustible polimérica pues no tolera temperaturas muy por encima de los 60 grados centígrados.

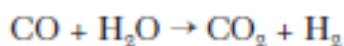
Se podrían utilizar otro tipo de pilas de combustibles. Pero son las poliméricas las que se están contemplando en la actualidad para el transporte y en las que se piensa que puede haber un mayor mercado a corto plazo. Si se utilizasen pilas de combustible de alta temperatura el proceso se detendría en etapas anteriores, debido a que las pilas de combustible de alta temperatura, tanto de óxido sólido como de carbonatos fundidos, e incluso con ácidos fosfóricos, pueden eliminar la parte de COPROX, pues estas tecnologías admiten esas ligeras impurezas de monóxido de carbono que aparecen.

La reacción de reformado sería la siguiente:



Es una reacción endotérmica hay que aportar calor que se aporta normalmente o bien quemando parte del combustible –se quema parte del etanol y la otra parte se reforma– o, si hay una pila de combustible en la aplicación, la salida de esa pila de combustible se puede quemar. Ése gas de salida puede contener metano que atraviesa la pila de combustible polimérica, y como es un inerte, a la salida se puede recuperarlo, aumentando así la eficiencia global del sistema.

La reacción del desplazamiento con vapor de agua (WGS) es la siguiente:



Es una reacción exotérmica. Consta de dos etapas (alta y baja temperatura) con refrigeración intermedia. En esta etapa se disminuye la concentración de CO y se aumenta la concentración de H₂.

La reacción de oxidación selectiva:



Esta reacción como en el caso anterior es exotérmica, desprende calor. Esta parte es muy importante porque todo el calor que se puede recuperar, siempre se tratará de aplicar donde haga falta, o mejor dicho, facilitar en lo posible la reacción de reformado que era la endotérmica [2].

2.3.5 Hidrógeno Biológico

Diversas tecnologías para la conversión de combustibles primarios y secundarios en hidrógeno, están siendo investigadas extensamente. Entre ellas se encuentran la electrolisis, gasificación de carbón, reforma del gas natural, oxidación parcial de aceite combustible, craqueado térmico solar, gasificación de biomasa y síntesis fotobiológica. La producción biológica de hidrógeno se distingue por ser un proceso libre de impacto ecológico, en el cual se utilizan fuentes renovables y condiciones de operación ambientalmente amigables [22, 19].

El hidrógeno es una opción atractiva como combustible alternativo a los convencionales porque no genera contaminantes. Sin embargo, la manera más productiva de obtener hidrógeno en nuestros días involucra procesos que demandan altas cantidades de energía, la cual se obtiene de la combustión de sustancias fósiles, por lo que finalmente no es conveniente a gran escala. Surge así la necesidad de estudiar procesos medioambientalmente limpios y basados en recursos renovables para la producción de hidrógeno [19].

La naturaleza presenta importantes ejemplos para ello y ha sido necesario comenzar investigaciones que permitan comprender, utilizar y escalar estos sistemas biológicos. El hidrógeno obtenido a partir de procesos biológicos se denota como biohidrógeno y comprende dos orígenes distintos: los que suceden en células vivas y los que utilizan sustancias biológicas extraídas de organismos. En el primer caso es común encontrar organismos unicelulares, como bacterias o microalgas.

La producción de biogás energético es el resultado de un fenómeno microbiológico de descomposición de materias orgánicas por vía anaeróbica [23].

La producción biológica de hidrógeno (biohidrógeno), utilizando microorganismos es una nueva área de la tecnología que ofrece el potencial de producción de hidrógeno partiendo de diversas fuentes renovables [24].

Por otro lado, pueden utilizar diversos productos de desecho, lo cual facilita el reciclado de los mismos [10, 11, 14, 15].

Estos sistemas, además, pueden utilizar la luz solar como fuente de energía primaria. Las eficiencias de conversión menores, respecto a la de las celdas solares, puede ser compensada por sus requerimientos de energía más bajos, así como por su menor inversión inicial [25].

Todos los procesos de producción biológica de hidrógeno dependen fundamentalmente en la presencia de una enzima que lo produzca. Las enzimas que producen hidrógeno catalizan una de las reacciones químicas más simples: $2\text{H}^+ + 2\text{e}^- \leftrightarrow \text{H}_2$.

Dos tipos de enzimas pueden catalizar la reducción de protones a H_2 , nitrogenasa e hidrogenasa. A pesar de los esfuerzos en dilucidar la estructura, regulación y expresión genética de estas enzimas, no existe un proceso práctico y económicamente competitivo para la producción continua de biohidrógeno, que haya sido puesto en el mercado.

Una de las razones principales es que la salida de H_2 representa una pérdida energética para la célula, mientras que las rutas metabólicas microbianas han evolucionado para la racionalización del uso de energía y la optimización de la velocidad de crecimiento [26].

Sin embargo, Levin y colaboradores [24], encontraron que teóricamente los sistemas acoplados de producción de hidrógeno con celdas de combustible, pueden proveer la energía necesaria para cumplir con los requerimientos energéticos de una casa habitación en Canadá. Los volúmenes de reactores varían desde los 500 l hasta los 17,000 l, dependiendo del sistema biológico utilizado y sus condiciones de operación.

Las celdas de combustible son dispositivos electroquímicos capaces de crear un flujo de electrones usando iones cargados. Una gran variedad de sistemas de celdas de combustible han sido desarrollados, los cuales difieren en el tipo de electrolito usado, condiciones de operación, rango de densidad de potencia, etc.

Una multitud de microorganismos han desarrollado la habilidad para derivar energía a partir del hidrógeno. Sin embargo, existen circunstancias bajo las cuales los microorganismos no tienen otra opción para ganar energía, que la de liberar hidrógeno al ambiente. El estudio de este fenómeno comenzó a principios del siglo pasado, pero el biohidrógeno (hidrógeno producido biológicamente), permaneció como curiosidad académica antes de la crisis de combustible de la década de 1980. Una mayor preocupación por los asuntos energéticos en la opinión pública y en las agendas políticas, así como nuevos descubrimientos científicos han contribuido al desarrollo de la tecnología del biohidrógeno [13].

El uso de métodos biológicos para la producción de hidrógeno deben reducir significativamente los costos de la energía, ya que estos procesos no requieren de calentamiento extenso (o electricidad, como en las plantas de electrolisis, [12, 27].

Hoy en día, los procesos de producción de H_2 han adquirido una mayor importancia principalmente por dos razones: (1) pueden utilizar fuentes de energía renovables y (2) son operados usualmente a temperatura ambiente y presión atmosférica. Sin embargo, las velocidades reportadas de producción de biohidrógeno, la estabilidad de los sistemas y la eficiencia de estos procesos aun no son suficientes para hacerlos comercialmente viables.

Por otro lado, pueden utilizar diversos productos de desecho, lo cual facilita el reciclado de los mismos [10].

2.3.5.1 Bacterias Productoras de Hidrógeno

La capacidad para la producción de biohidrógeno está asociada con la actividad de las enzimas hidrogenasa y nitrogenasa, pero son pocas las clases que pueden llevar a cabo la producción de este biogás. Entre ellas están las bacterias fermentativas y las bacterias fotosintéticas. La forma en la cual producen hidrógeno se muestra en la *figura 21*. Los mecanismos de la producción de biohidrógeno dentro de estos grupos es diversa, pero pueden realizarse algunas generalizaciones. La primera, la producción de biohidrógeno es

estrictamente un fenómeno anaerobio, ya que las enzimas hidrogenasa y nitrogenasa son destruidas por el oxígeno. La segunda, las circunstancias bajo las cuales ocurre la producción, siempre impone un reto a la célula, ya sea el disponer de mayor energía, de aceptar una sustancia tóxica o de tolerar la falta de algún nutriente importante [13].

Estos sistemas, además, pueden utilizar la luz solar como fuente de energía primaria. Las eficiencias de conversión menores, respecto a la de las celdas solares, puede ser compensada por sus requerimientos de energía más bajos, así como por su menor inversión inicial [25].

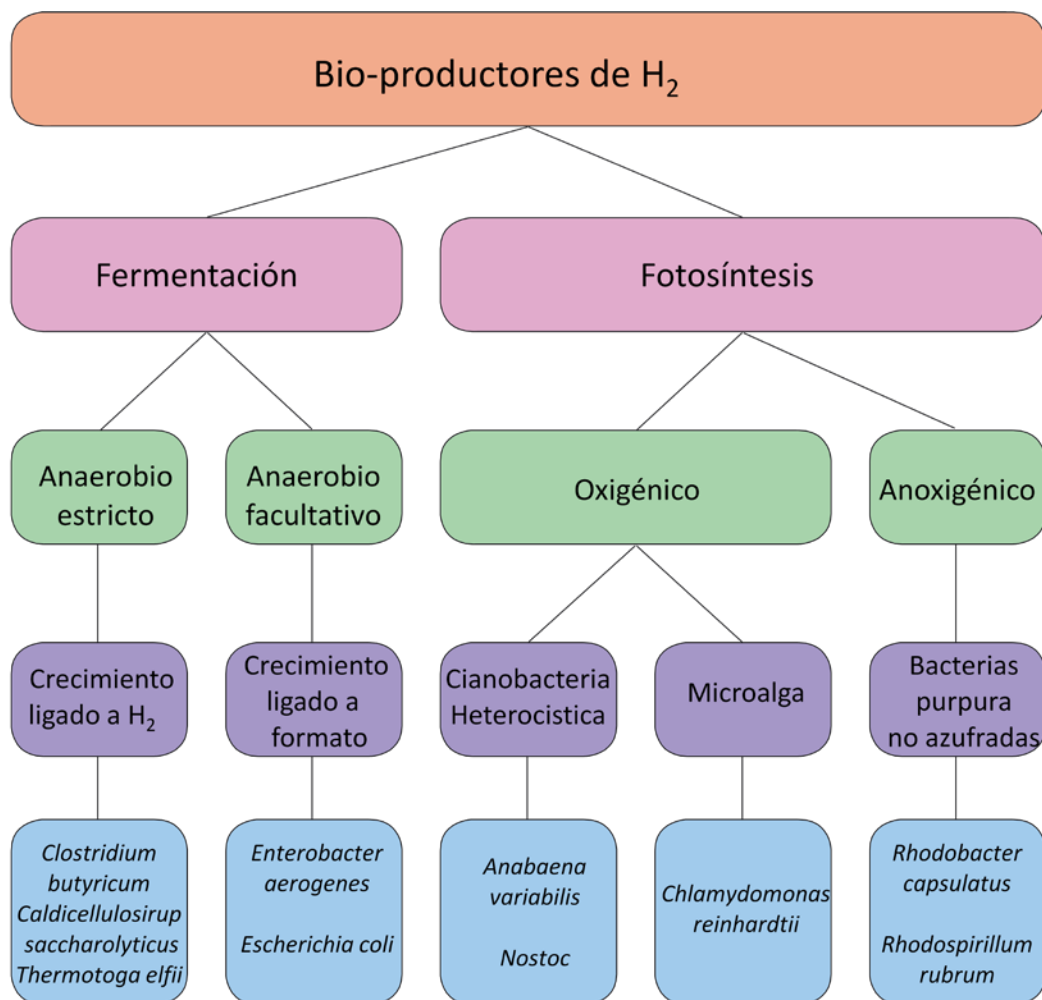


Figura 21. Clasificación de bacterias productoras de hidrógeno [13].

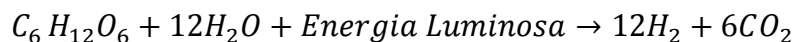
La producción biológica de hidrógeno puede ser clasificada como sigue [10]:

1. Biofotólisis del agua, utilizando algas y cianobacterias.
2. Fotodescomposición de compuestos orgánicos mediante bacterias fotosintéticas.
3. Producción fermentativa de hidrógeno de compuestos orgánicos.
4. Sistemas híbridos que utilizan bacterias fotosintéticas y fermentativas.

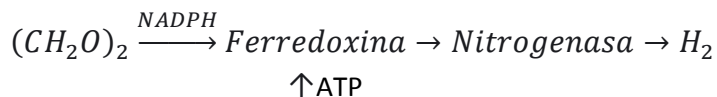
Uno de los mayores obstáculos para obtener una producción sostenida de H_2 en la biofotólisis del agua, es la producción de oxígeno, el cual desactiva irreversiblemente los sistemas productores de hidrógeno y soporta el proceso de consumo del H_2 [10].

2.3.5.1.1 Fotodescomposición de Compuestos Orgánicos

Este proceso es también llamado fotofermentación y a las bacterias involucradas se les llama fototróficas, las cuales están indicadas en la literatura como los sistemas microbianos más prometedores para la producción de hidrógeno [10, 28]. La producción de H_2 por bacterias purpuras sin azufre, es principalmente debida a la presencia de nitrogenasa bajo condiciones deficientes de oxígeno, usando energía luminosa y compuestos reducidos (ácidos orgánicos). La reacción es como sigue:



La ruta bioquímica global para la fotofermentación puede ser expresada de forma siguiente



Las bacterias fototróficas requieren una fuente de electrones orgánica o inorgánica, para iniciar la fotosíntesis. Pueden utilizar un amplio rango de compuestos económicos [11].

El acceso a energía luminosa permite a los microorganismos fotosintéticos vivir mediante reacciones químicas endotérmicas, las cuales podrían no soportar la vida en la oscuridad. Por ejemplo las bacterias fotosintéticas anoxigénicas (APB), pueden derivar carbono para su crecimiento de sustratos relativamente inaccesibles, incluyendo ácidos orgánicos, como los que se forman durante el proceso de fermentación en la oscuridad [13].

Estas bacterias fotoheterotróficas han sido investigadas por su disponibilidad para convertir la energía luminosa en hidrógeno utilizando desechos orgánicos como sustrato, tanto en procesos batch, cultivos continuos, y sistemas de células inmovilizadas utilizando matrices sólidas como 'carrageenan', agar gel, vidrio poroso y poliuretano espumado [11].

Los mayores cuellos de botella en el proceso involucran eficiencias fotoquímicas bajas (3-10%). Más aun, la distribución no homogénea de la luz en el interior del reactor también contribuye a la disminución de la eficiencia global de conversión de la luz.

Estos obstáculos pueden ser superados:

- 1) Utilizando combinación de bacterias que tengan diferentes características de utilización de la luz,
- 2) Mejorando el diseño del foto-bio-reactor, con una mayor capacidad de difusión de la luz,
- 3) Manteniendo una actividad máxima de nitrogenasa, y una actividad mínima de la hidrogenasa,
- 4) Manteniendo una relación molar de la fuente de carbono sobre la fuente de nitrógeno.

Otro problema para la aplicación práctica de este proceso es la gran área superficial requerida para coleccionar la energía luminosa, ya que la construcción de tales biorreactores con una relación superficie/volumen alta, pueden incrementarse. Una posible alternativa podría ser la utilización de colectores solares [11].

Las bacterias fototróficas presentan las siguientes ventajas:

- Rendimientos teóricos de conversión altos.
- No producen oxígeno, simultáneamente con la producción de hidrógeno (fotosíntesis anoxigénica); 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.
- Capacidad de utilizar un amplio espectro de luz. 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.
- Capacidad de consumir substratos orgánicos derivados de productos de desecho y por lo tanto, su capacidad de acoplarse a un sistema de tratamiento de aguas. Entre las numerosas fuentes de carbono que utilizan tanto para desarrollarse, como para producir hidrógeno; estas se encuentran disponibles en los efluentes industriales.
- La producción de hidrógeno es continua, aun cuando el medio de cultivo está saturado en hidrógeno, contrariamente a la producción con algas y cianobacterias. [10, 23].

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 substratos de carbono de desechos industriales [23].

2.3.5.1.2 Producción Fermentativa de Hidrógeno

Aunque se le ha puesto menor atención, esta presenta diversas ventajas:

- 1) Producción alta de hidrógeno.
- 2) Producción continua durante día y noche.

- 3) Buena velocidad de crecimiento de microorganismos para abastecer el sistema de producción.

Estas características le proporcionan ventajas sobre la producción fotoquímica. Sin embargo, el hidrógeno producido también puede contener, además de dióxido de carbono, monóxido de carbono, metano y sulfuro de hidrógeno, los cuales a ciertos niveles pueden constituir un veneno para las celdas de combustión [24, 29].

2.3.5.1.3 Sistemas híbridos

Algunos investigadores han propuesto el uso de un cultivo mixto [28, 30, 31, 32, 33], generalmente bacterias fototróficas con bacterias fermentativas, con el objetivo de incrementar las cantidades de hidrógeno producidas.

En general, las bacterias involucran metabolismos fermentativos, en los que unas sustancias químicas son transformadas por diferentes rutas en ausencia de oxígeno para producir energía y otras sustancias. En algunos casos se forma hidrógeno como un producto secundario que es liberado por los microorganismos. Las microalgas, que son algas unicelulares, tienen un metabolismo más complejo, en tanto que captan la energía luminosa del Sol para producir sustancias químicas necesarias para sus procesos vitales. Este proceso, que también lo llevan a cabo las plantas y algunas bacterias, lo conocemos como fotosíntesis. Existen rutas fotosintéticas que también pueden derivar a la formación de hidrógeno como un producto secundario no utilizado por estos organismos [8].

Tanto en los procesos fermentativos como en los fotosintéticos, la formación de hidrógeno, así como todas las reacciones bioquímicas que suceden dentro de las células, son catalizadas (o aceleradas) por unas sustancias conocidas como enzimas. Las enzimas son proteínas funcionales que son sintetizadas por los propios organismos para el control de su metabolismo. Existen métodos de laboratorio para extraer enzimas de las células y utilizar los biocatalizadores en reacciones químicas controladas sin necesidad de los

organismos vivos. Este método es también explotado para la producción de biohidrógeno. Dos clases generales de enzimas, las hidrogenasas y las nitrogenasas, son las involucradas en este tipo de procesos, aunque sus funciones no son en sí las de producir hidrógeno, pues este gas es más bien un subproducto de las reacciones enzimáticas involucradas [29].

Todos estos procesos de obtención de biohidrógeno están aún lejos de ser económicamente viables y sustituir las fuentes convencionales de energía. Sin embargo, es una necesidad imperiosa su estudio profundo para encontrar métodos convenientes de obtener hidrógeno de una manera que no dañe la ecología de la Tierra y que estén asegurados por la utilización de recursos naturales renovables. Finalmente, no está de más recordar que el petróleo y otros combustibles fósiles, así como la madera y el gas metano, son productos que de manera indirecta se derivan de la fotosíntesis y, más aún, de la energía solar. Otras fuentes alternativas de energía como las celdas fotovoltaicas y las turbinas eólicas también son consecuencia del aprovechamiento, directo o indirecto, de la radiación solar. Sin embargo, a diferencia de estos métodos que producen energía eléctrica o térmica, nuestra sociedad requiere de combustibles y los obtenidos de fuentes renovables presentan una gran esperanza para el futuro energético del mundo. Así, además del bioetanol y el biodiesel, el biohidrógeno es una opción que debe investigarse en la actualidad como alternativa a los combustibles fósiles [8].

2.3.5.2 Mecanismos de la producción de hidrógeno biológico

En la actualidad, la producción de hidrógeno se puede dividir en métodos fisicoquímicos y biológicos. Entre los métodos fisicoquímicos de producción convencional de hidrógeno se encuentran el reformado de metano (SRM) y el reformado de otros hidrocarburos fósiles (SRH), la oxidación parcial no-catalítica de combustibles fósiles (POX) y el reformado autotérmico, que es una combinación de SRM y POX. Sin embargo, la producción fisicoquímica de hidrógeno no puede ser considerada como una fuente de energía libre de contaminación, debido a las emisiones generadas por los procesos involucrados en su

obtención. De esa manera, si se busca una producción sostenible de energía, la obtención de hidrógeno por métodos biológicos representa un proceso particularmente libre de contaminación y ahorrador de energía [8].

De acuerdo a la dependencia de luz, es común clasificar a los procesos de producción biológica de hidrógeno en: heterotróficos (comúnmente conocido como fermentación oscura) y foto-heterotróficos (fermentación luminosa). Para la producción heterotrófica de hidrógeno, los microorganismos sólo necesitan la energía química obtenida del sustrato para su metabolismo; mientras que en un proceso foto-heterotrófico se usa la radiación solar como una fuente adicional de energía [34].

En el proceso de obtención biológica de hidrógeno por fermentación, la producción de biohidrógeno se verifica en la segunda y tercera etapas de la degradación anaeróbica (acidogénesis y acetogénesis). De ahí que las bacterias metanogénicas deberían ser inhibidas para evitar el consumo de H_2 que necesitan para la producción de metano (CH_4). La producción fermentativa de biohidrógeno es menos compleja que la fotofermentación (en la que siempre está involucrada la producción anaeróbica dependiente de luz), convirtiendo los compuestos orgánicos a ácidos orgánicos, hidrógeno (H_2) y dióxido de carbono (CO_2). Las ventajas de la producción fermentativa de hidrógeno es el amplio espectro de sustratos que se pueden usar, así como los altos rendimientos de producción de hidrógeno. Otra de las grandes ventajas del proceso es que se pueden usar materiales residuales de bajo valor comercial o que incluso sólo se desechan representando un factor adicional a la contaminación ambiental [8].

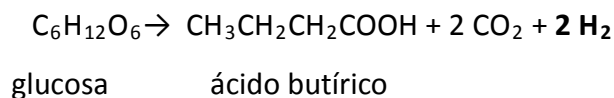
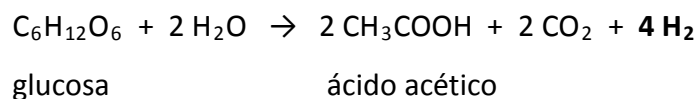
Actualmente, existen cinco rutas viables para obtener biohidrógeno: biofotólisis directa e indirecta, fotofermentación, síntesis mediante bacterias fotoheterótrofas y fermentación oscura.

La biofotólisis es un proceso de disociación biológica del agua por efecto de la luz y se refiere a la conversión de agua a hidrógeno y oxígeno a través de microorganismos como microalgas y cianobacterias utilizando la energía solar como fuente energética [35]. A

pesar de que la producción biológica de hidrógeno por microorganismos ha recibido gran atención del sector científico por más de 20 años, la producción industrial de hidrógeno se ha realizado por hidrólisis eléctrica de agua o por reacciones químicas como el reformado de metano. Tanto la hidrólisis directa de agua como el reformado de combustibles fósiles son procesos bien conocidos y caracterizados, mientras que la producción biofotolítica requiere aún de un gran desarrollo científico y tecnológico. Según las características en las cuales el proceso biofotolítico se desarrolle, se puede tener una biofotólisis directa o indirecta.

En la fotofermentación se aprovechan las vías catabólicas de las bacterias no sulfuradas fotoheterótrofas para obtener hidrógeno a partir de residuos de compuestos orgánicos. También hay otras bacterias pertenecientes a la familia *Rhodospirillaceae* que pueden desarrollarse en ausencia de luz usando monóxido de carbono para generar adenosina trifosfato (ATP), liberando hidrógeno molecular y dióxido de carbono [8, 11]. Una de ellas es la *Rhodospirillum rubrum* [36,37].

Finalmente, la fermentación oscura es un proceso de reciente exploración para la producción de hidrógeno. En este proceso el piruvato celular reacciona para formar acetil-coenzima A y dióxido de carbono. En esta reacción, la ferredoxina actúa en una primera etapa como un agente oxidante; en la siguiente etapa, la ferredoxina es oxidada a su forma original con lo que se forma hidrógeno molecular (H_2) como un producto. Las reacciones involucradas en este proceso son:



Como se ha mencionado previamente, el hidrógeno es un producto intermediario en la digestión anaeróbica de sustratos orgánicos. Su formación se lleva a cabo a través de la fermentación de moléculas simples, como azúcares y almidones, durante la etapa de acidogénesis y la posterior oxidación de los productos obtenidos de esta etapa hasta ácido acético a través de las bacterias acetogénicas. La desaparición o consumo del hidrógeno producido como intermediario se debe a la formación de ácido acético y de metano en la etapa de metanogénesis a través de la acción de bacterias homoacetogénicas e hidrógenotróficas, respectivamente.

Así, la producción de hidrógeno se puede mejorar inhibiendo la acción de las bacterias consumidoras de hidrógeno. El mejor método para ello, es mediante la aplicación de tratamientos térmicos, ya que se ha observado que con tratamientos de calor se consigue la eliminación de las bacterias metanogénicas e hidrógenotróficas. En conclusión, el medio más efectivo para la destrucción de las bacterias consumidoras de hidrógeno, sin obtención de metano como producto final de la anaerobiosis, es la simple aplicación de un tratamiento térmico [8].

Otro parámetro importante a ser considerado en la producción biológica de hidrógeno es el valor del pH del medio, ya que a pesar de que la mayoría de los sistemas anaeróbicos productores de hidrógeno pueden operar aún sin control del pH en el medio, se ha observado que cuando se opera un sistema biológico controlando el pH, aumenta la producción de hidrógeno en comparación con un sistema en el que no se ha controlado el pH del medio [8].

2.3.5.3 Procesos enzimáticos

Como se ha mencionado previamente, las enzimas involucradas en los procesos que se verifican en los mecanismos de generación de hidrógeno a partir de microorganismos y bacterias son las hidrogenasas y las nitrogenasas.

2.3.5.3.1 Hidrogenasas

Las hidrogenasas son un grupo de enzimas que catalizan la reacción reversible de oxidación del compuesto químico más simple: la molécula de hidrógeno (bihidrógeno). Esto se verifica a través de la conversión de la molécula de bihidrógeno (H_2) en sus partículas constituyentes elementales que son dos protones y dos electrones.

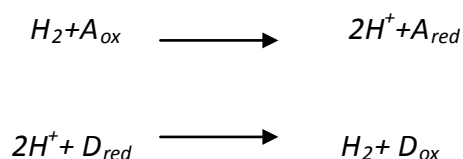
Las hidrogenasas son un factor central del metabolismo del hidrógeno que es esencial para muchos microorganismos, entre los que destacan los metanogénicos (formadores de metano), los acetogénicos (formadores de ácido acético), los fijadores de nitrógeno, los fotosintéticos y las bacterias sulfato-reductoras. La mayoría de los organismos pertenecientes al género procariótico, así como unos pocos eucarióticos, contienen hidrogenasas y por tanto son capaces de metabolizar hidrógeno. El papel de las hidrogenasas se resume a la oxidación de la molécula biatómica de H_2 para proporcionar una fuente de compuestos reductores fuertes a un organismo vivo o a la generación de hidrógeno para consumir el exceso de electrones en un ambiente biológico determinado [8].

Es posible distinguir cuatro tipos de hidrogenasas en función del tipo de metales que forman parte de su estructura: el primer grupo incluye a aquellas enzimas que contienen hierro [Fe], el segundo grupo a las que además de hierro contienen un átomo de níquel [Ni-Fe], un grupo más que contiene hierro, níquel y selenio [Fe-Ni-Se] y finalmente están las hidrogenasas que no disponen de ningún metal de transición enlazado a su estructura.

En determinaciones recientes de la estructura cristalina de las proteínas obtenidas por difracción de rayos X de varias hidrogenasas conteniendo [Fe] y [Ni-Fe] se observó que el centro activo de la enzima (donde tiene lugar la rotura heterolítica del hidrógeno molecular), está formado por un complejo bimetálico de Ni-Fe con dos moléculas del aminoácido cisteína en la estructura de la proteína que hacen el papel de ligandos.

Las hidrogenasas juegan un papel vital en el metabolismo anaeróbico. En éste, la asimilación de hidrógeno (oxidación de H_2) se encuentra acoplada a la reducción de

moléculas aceptoras de electrones tales como oxígeno, nitrato, sulfato, dióxido de carbono o fumarato; mientras que la reducción de los protones (proceso de formación de H₂) es esencial para que se verifique el proceso de fermentación de piruvato (compuesto que se sintetiza a partir del metabolismo de carbohidratos y proteínas) y para la disposición del exceso de electrones. Los compuestos que pueden actuar como donadores de electrones (D) o aceptores (A) en las hidrogenasas son compuestos de bajo peso molecular o proteínas tales como ferredoxinas y citocromo [8].



La hidrogenasa fue descubierta en la década de 1930 y en años posteriores se observó que dichas enzimas contienen como centros activos átomos de hierro (Fe) y en algunas ocasiones níquel (Ni) y selenio (Se). Se ha determinado que las variedades de enzimas que contienen níquel suelen encontrarse en microorganismos que consumen hidrógeno mientras que los microorganismos productores de hidrógeno tienen enzimas con solo hierro como sitio activo.

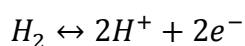
Como es sabido, el hidrógeno es un compuesto ampliamente usado en la industria química y que actualmente ha sido considerado como un combustible de gran potencial. Es producido por organismos fermentativos tales como *Clostridium*, los cuales degradan (oxidán) azúcares y otra materia orgánica a través de piruvato a CO₂ y acetato. Para que este proceso se lleve a cabo, se deben generar electrones oxidantes, tales como los generados en la proteína ferredoxina, para que la molécula orgánica adyacente se pueda degradar. Con el protón deficiente como aceptor de electrones la ferredoxina es oxidada a través de la producción de hidrógeno por la hidrogenasa.

El hidrógeno es en realidad un producto intermediario del metabolismo y es muy raro que llegue a escapar de un sistema anaeróbico puesto que los protones intervienen en una multitud de procesos de generación de energía para el desarrollo del

microorganismo. Dependiendo del ambiente, varios tipos de microorganismos anaerobios consumidores de hidrógeno obtienen energía usando los electrones obtenidos para producir metano o acetato a partir de CO₂, sulfuro a partir de sulfatos, o nitrógeno y nitritos a partir de nitrato. El hidrógeno también se puede usar para reducir dióxido de carbono a bloques de construcción celular, en algunos casos para reducir nitrógeno a amoníaco. Así, cualquier molécula de hidrógeno que alcanza ambientes aeróbicos tenderá a ser consumida por bacterias que obtienen energía usando la reacción de hidrógeno y oxígeno para producir agua [8].

La hidrogenasa productora de hidrógeno purificada a partir de la bacteria *Clostridium*, es una molécula con forma de hongo de 60 kDa de masa. Está formada por subunidades que contienen cinco distintos cúmulos de [Fe-S] covalentemente unidos a la proteína. El arreglo espacial de la enzima denota que los cinco cúmulos se encuentran implicados en la transferencia de electrones inter- e intra-proteína. La hidrogenasa recibe a los electrones obtenidos a partir de la oxidación de piruvato (catalizada por la enzima que contiene al menos dos cúmulos [Fe₄S₄]) a través de la ferredoxina (que contiene dos cúmulos [Fe₄S₄]).

A pesar de que la reacción química que representa la formación de hidrógeno, catalizada por la hidrogenasa, aparenta ser muy simple el mecanismo es sumamente complejo.



Los electrones no están libres, como se observa en la ecuación, sino que se encuentran enlazados al cúmulo metálico. De la misma manera, los protones no se encuentran disponibles para los sitios activos catalíticos de la enzima para producir hidrógeno. La estructura de la enzima hidrogenasa involucra también residuos de moléculas polares de las proteínas que se utilizan como medio de transporte y enlace de los protones. Así los

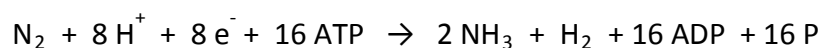
protones se desplazan a través de la estructura de las proteínas hacia los alrededores del cúmulo de H donde pueden interactuar con los electrones para terminar en la agregación de la molécula de hidrógeno [8].

2.3.5.3.2 Nitrogenasas

En la producción de hidrógeno mediante cianoobacterias se involucra una etapa de fijación de nitrógeno en la que las nitrogenasas juegan un papel relevante. Las nitrogenasas son un grupo de enzimas que algunos organismos utilizan para fijar el nitrógeno gaseoso (N_2) atmosférico, para que pueda ser asimilada en su metabolismo [35].

La molécula diatómica de nitrógeno (N_2) es relativamente inerte, ya que cada átomo de nitrógeno tiene tres orbitales incompletos en su capa de electrones más externa, lo que les confiere la capacidad de enlazarse con otro átomo. Todas las nitrogenasas tienen un cofactor que puede estar formado por hierro (Fe) o azufre (S), además de un átomo heterometálico en el sitio activo. Este heteroátomo es por lo general molibdeno (Mo), aunque algunas veces puede ser vanadio (Va) o hierro (Fe).

La nitrogenasa es una enzima que convierte al nitrógeno atmosférico a amoníaco de acuerdo con la siguiente reacción [8]:



Las nitrogenasas rompen el triple enlace de la molécula de nitrógeno por efecto de electrodonación de cada uno de los tres enlaces y entonces se unen con los átomos de nitrógeno a los átomos de hidrógeno. El proceso es bastante complejo ya que cada enlace se rompe individualmente y hasta el momento, no ha sido discernido en su totalidad. Las nitrogenasas requieren de las proteínas que contienen molibdeno y hierro en su centro activo y de ATP, las cuales le proporcionan la energía necesaria para llevar a cabo la ruptura del triple enlace de la molécula biatómica de nitrógeno (N_2). Las

nitrogenasas enlazan cada átomo de nitrógeno a tres átomos de hidrógeno para formar amoníaco (NH_3) y el amoníaco es enlazado a glutamato que después se convierte en glutamina para posteriormente formar ácidos nucleicos. La nitrogenasa se asocia con una segunda proteína y cada ciclo transfiere un electrón a partir de un electrodonador, el cual es suficiente para romper uno de los enlaces químicos de nitrógeno. Sin embargo, no se ha probado que exactamente tres ciclos sean suficientes para fijar un átomo de nitrógeno.

La enzima por tanto requiere de una gran cantidad de energía química obtenida a partir de la hidrólisis de ATP, y agentes reductores tales como diatironita in vitro o ferredoxina in vivo. La enzima está compuesta por la proteína heterotetramérica [MoFe] que está transitoriamente asociada a con la proteína homodimérica Fe. La nitrogenasa proporciona poder de reducción cuando está asociada con la proteína homodimérica.

La nitrogenasa se provee de energía reductora cuando se asocia a la proteína homodimérica Fe nucleótido-enlazada. El heterocomplejo experimenta ciclos de asociación y disociación para transferir un electrón, que es el paso limitante del proceso. El ATP provee la energía reductora.

El mecanismo exacto de catálisis es desconocido debido a la dificultad de obtener cristales de nitrógeno enlazados a la nitrogenasa, lo que no ha permitido realizar estudios analíticos que aseguren un mecanismo. Esto es debido a que en el estado de reposo de la proteína [MoFe] no se enlaza al nitrógeno y también requiere de al menos tres transferencias electrónicas para iniciar la catálisis.

Debido a las propiedades oxidativas del oxígeno, la mayoría de las nitrogenasas son irreversiblemente inhibidas por oxígeno, lo cual oxida degradando paulatinamente a los cofactores [Fe-S]. Esto requiere de mecanismos para fijar nitrógeno y evitar oxígeno in vivo. A pesar de este problema, muchos usan oxígeno como un aceptor terminal de electrones para la respiración. Se conocen excepciones: una nitrogenasa descubierta recientemente de *Streptomyces thermoautotrophicus* no es afectada por la presencia de

oxígeno. Las azobacterias son las únicas en su habilidad de emplear una nitrogenasa lábil al oxígeno bajo condiciones aeróbicas [8].

2.3.5.4 Producción de biohidrógeno “in vitro”

Cuando se habla de procesos in vitro, normalmente se hace referencia a un proceso biológico que normalmente sucede en algún organismo vivo, pero que se reproduce fuera de este organismo, es decir, en las condiciones controladas de laboratorio. Las enzimas, por ejemplo, pueden ejercer su función catalítica tanto dentro como fuera de las células, siempre y cuando se satisfagan las condiciones que favorezcan su actividad. Las hidrogenasas no son la excepción y se han propuesto procesos in vitro muy interesantes para la producción de hidrógeno.

En teoría, es posible obtener una gran cantidad de hidrógeno a partir de materia prima renovable, como la glucosa; sin embargo, los rendimientos estequiométricos típicamente obtenidos con métodos biológicos, se encuentran apenas entre el 16 y el 24%, esto es, entre 1.9 y 2.4 moles de H_2 por cada mol de glucosa. Actualmente, se han desarrollado métodos enzimáticos que permiten obtener hasta un 97% de rendimiento estequiométrico de producción de hidrógeno a partir de glucosa-6-fosfato (G6F), es decir, 11.6 moles de H_2 por cada mol de G6F. Para conseguir lo anterior, se utilizan enzimas del ciclo oxidativo pentosa-fosfato acopladas a hidrogenasas purificadas mediante bacterias de tipo *Pyrococcus furiosus*, una de las pocas hidrogenasas que usan $NADP^+$ como electrón portador. Aunque se trata de resultados en laboratorio, este alto porcentaje representa un avance significativo en la producción de hidrógeno por que la producción enzimática de G6F es factible a escala industrial.

Esta vía de generación de hidrógeno es altamente eficiente desde el punto de vista energético. Por otro lado, en el ciclo oxidativo pentosa-fosfato se generan 6 moles de CO_2 por mol de glucosa, una cantidad menor en relación a la generada por combustibles fósiles, lo que hace de este proceso una alternativa ambientalmente amigable [8].

En años recientes, se han propuesto otros procesos en los que se aprovecha la clorofila extraída de las microalgas del género *Spilurina* para captar la energía solar, misma que es utilizada para realizar una serie de reacciones químicas que conducen a la producción de hidrógeno catalizada por platino (Pt). Aunque no participan directamente las hidrogenasas en esta serie de reacciones, estas enzimas y otras llamadas celulasas son utilizadas en la producción de la materia prima (la misma G6F mencionada anteriormente) a partir de extractos hidrolizados de celulosa, un polímero natural formado por moléculas simples de glucosa y que tiene una función estructural siendo el componente principal de las fibras de madera y de las plantas.

El estudio del proceso fotosintético a nivel micro ha permitido un mayor conocimiento de las estructuras fotosintéticas, como la PSI, considerada por algunos investigadores como la maquina nano-fotoquímica más eficiente en la naturaleza [38].

2.3.5.5 Microorganismos fotosintéticos

Los microorganismos (organismos unicelulares) tienen una vida muy simple. Cada célula tiene todas las funciones metabólicas necesarias para su desarrollo, independientemente de las otras células alrededor. Tienen la virtud de crecer y reproducirse utilizando un conjunto básico de alimentos llamados sustratos, pero también generando sustancias de desecho. Todas estas conversiones no son más que reacciones químicas reguladas a través de las moléculas proteicas conocidas como enzimas y relacionadas unas con otras a través de rutas metabólicas. En el laboratorio, los microorganismos pueden cultivarse utilizando normalmente una solución acuosa o un gel, enriquecidos con nutrientes. Cada especie requiere de sustratos específicos para su desarrollo y de condiciones características de crecimiento. Estos sustratos consisten principalmente de agua y una fuente de carbono, además de nitrógeno, fósforo y azufre, así como de cantidades ínfimas de algunos minerales [33, 39, 40].

Los organismos fotosintéticos, que incluyen las plantas verdes, las algas y varios microorganismos, contienen en sus células un sistema fisiológico especializado para llevar a cabo el complejo proceso de la fotosíntesis. Este sistema permite, por medio de dos fases, la captación de la energía luminosa y del CO_2 del medio ambiente para su conversión a carbohidratos. Estos son sustancias conocidas como una fuente de energía para las células, tanto de origen vegetal como animal, que permite el desarrollo de sus actividades metabólicas. La primera fase de la fotosíntesis consiste en un grupo de reacciones que comienzan con la captación de la energía solar. En la segunda fase, que no está acoplada inmediatamente a la primera, esta energía permite la transformación del dióxido de carbono a monosacáridos como la glucosa que pueden utilizarse directamente o bien convertirse en almidón u otros polímeros de carbohidratos para almacenamiento y su posterior uso [8].

Los microorganismos no fotosintéticos requieren una fuente de carbohidratos en el medio de cultivo para desarrollarse. En la práctica, esto conduce a dos complicaciones durante su cultivo: el costo adicional del nutriente y el riesgo a la contaminación por otros microorganismos oportunistas que pueden introducirse al reactor. Este último problema puede controlarse bastante bien utilizando sistemas esterilizados [8].

La capacidad biológica de tomar o producir hidrógeno molecular es probablemente exclusiva de los sistemas microbiológicos de la biosfera. Este fenómeno es especialmente prevaeciente entre los microorganismos fotosintéticos. La mayoría de las bacterias fotosintéticas, las cianobacterias y las algas eucariotas llevan a cabo estas funciones de consumo y formación de hidrógeno. El proceso de fotosíntesis es el punto de partida para todos los métodos de producción de biohidrógeno utilizando la luz del sol. La fotosíntesis puede dividirse en dos casos sustanciales: mientras que en las algas, las cianobacterias y las plantas se produce O_2 durante el proceso, este gas no se obtiene en las llamadas bacterias púrpuras y en las verdes [41]. En condiciones normales, ambos procesos utilizan el hidrógeno para la síntesis de compuestos vitales en el funcionamiento celular. Sin embargo, en condiciones anaerobias (sin oxígeno) muchos organismos han desarrollado

un mecanismo de supervivencia que produce hidrógeno como un producto secundario [35, 42].

En comparación con los procesos fermentativos, algunas bacterias púrpuras y las verdes tienen una alta eficiencia de conversión de sustrato a hidrógeno y pueden usar una gran variedad de sustratos para su crecimiento y para la producción de hidrógeno.

En condiciones anaerobias y en ausencia de nitrógeno, las enzimas llamadas nitrogenasas son las responsables de la producción de hidrógeno. En la actualidad, el proceso más económico involucra el uso de aguas residuales ricas en carbohidratos obtenidas de la industria alimentaria para la fermentación de este tipo de bacterias [43, 44].

Para la producción de biohidrógeno, los géneros *Rhodospirillum* y *Rhodobacter* representan ejemplos de bacterias púrpuras mientras que la especie *Chlorobium vibrioforme* corresponde a una bacteria verde [8].

Las cianobacterias son organismos que producen hidrógeno mediante dos clases de enzimas: nitrogenasas e hidrogenasas. Las nitrogenasas, como en las bacterias púrpuras y verdes, están relacionadas con la fijación de nitrógeno por lo que en comparación con las hidrogenasas su rendimiento para producir hidrógeno es bajo. La activación de hidrogenasas, por otro lado, se puede llevar a cabo bajo tres mecanismos distintos: (i) la ruta fotosintética en la que la fuente de hidrógeno es el agua y se hace uso completo de la fotosíntesis, (ii) la ruta fermentativa en la que se fermenta sin luz un sustrato producido durante la fotosíntesis, y (iii) la ruta fotofermentativa en la que se mezclan procesos fermentativos y procesos fotosintéticos. En todo caso, las hidrogenasas requieren de condiciones anaerobias para ser activadas, aunque algunas hidrogenasas son más tolerantes que otras a la presencia de oxígeno. Los géneros *Oscillatoria* y *Anabaena* son dos ejemplos de cianobacterias productoras de hidrógeno [35].

Algunas microalgas han desarrollado la habilidad adicional de producir hidrógeno a partir de agua, aunque en realidad se conocen pocas especies de algas que producen este gas. Las hidrogenasas en estos microorganismos tienen mayores capacidades de conversión

que otras hidrogenasas. Se ha encontrado que la producción de hidrógeno se favorece aún más en condiciones de carencia de azufre en el medio de cultivo. La mayoría de las propuestas para la producción de biohidrógeno a partir de microalgas se centran en una sólo especie de agua dulce, cuyo nombre científico es *Chlamydomonas reinhardtii*. Sin embargo, actualmente se buscan también otras microalgas que produzcan el gas de manera más efectiva [8].

Actualmente proyectos de ingeniería bioquímica y genética están siendo desarrollados, con el objetivo de obtener organismos con una mayor capacidad productora de hidrógeno [45].

2.3.5.6 Substratos y Condiciones de Proceso

Algunos medios de cultivo han sido diseñados para la producción de hidrógeno fotosintético, dependiendo de los requerimientos específicos del microorganismo. Además de bases minerales, han sido utilizadas fuentes de carbono tales como lactato [22, 23, 26, 46], y acetato [47].

Algunos estudios evalúan los efectos de ciertas vitaminas, tales como el ácido nicotínico, la vitamina B1 y la biotina; en la capacidad de generación de hidrógeno fototrófico [48].

Diversos medios de cultivo, comúnmente productos de desecho han sido también propuestos [49]. Entre otros están el uso de desechos de la industria lechera [50, 51], rastrojo de maíz [52], olote de maíz [53], almidón [54]; aceite de palma [55], aceite de oliva [56, 57], desechos municipales [58], glucosa [28], papa [59], refinería de azúcar [43], curtidurías [44], estiércol de vaca [60] y rastros [61, 62]. No solamente las fuentes de carbono han sido investigadas, sino también fuentes de nitrógeno tales como glutamato [22] y aminoácidos [63].

Cuando efluentes industriales son utilizados, puede ser necesaria la inclusión de un proceso de fermentación en oscuridad, previo al proceso de fotofermentación [28, 34, 40, 53, 59, 62, 64, 65].

La utilización de efluentes industriales para la producción de hidrógeno gaseoso mediante bacterias fotosintéticas es posible, aunque estos cultivos prefieren ácidos orgánicos como fuentes de carbono [49, 66]. Uno de los principales problemas en el uso de efluentes industriales es el color de los desechos, lo cual puede limitar la penetración de la luz. La concentración alta de amoníaco puede ser otro problema, la cual inhibe a la enzima nitrogenasa, reduciendo la productividad de hidrógeno. Alto contenido de materia orgánica, así como la presencia de compuestos tóxicos en los efluentes industriales podrían requerir pretratamiento antes de la producción de hidrógeno [40, 49, 66].

Además de la generación de hidrógeno, el uso de efluentes industriales como sustratos ha llevado al diseño de sistemas que puedan ser integrados a un sistema de tratamiento de los mismos [65, 66].

Por otro lado, también ciertos parámetros de proceso como el pH [67, 68], temperatura [69, 70, 71], el tipo de luz y su intensidad [71, 72, 73, 74, 75], el flujo del sustrato y su concentración [76], han sido investigados.

Melis y Melnicki [33], utilizaron un cultivo mixto constituido en primer lugar de algas verdes, las cuales tienen la capacidad de captar la porción visible de la luz solar; y en segundo lugar de bacterias fotosintéticas anoxigénicas, las cuales pueden captar las emisiones solares cercanas al infrarrojo.

Además, métodos estadísticos y de diseño de experimentos han sido empleados con el objetivo de optimizar los rendimientos de hidrógeno [77, 78, 79]. La metodología de optimización con 'superficie de respuesta', también ha sido aplicada para el mejoramiento del rendimiento de hidrógeno fotosintético [80].

2.3.5.7 Reactores Fotosintéticos

La producción de biohidrógeno es un fenómeno que ha sido observado en microorganismos desde la primera mitad del siglo XX y puede decirse que en los últimos años se ha avanzado en la comprensión de los mecanismos moleculares involucrados. Estos conocimientos provienen de diversos estudios científicos que en la actualidad están concentrados en desarrollar sistemas de obtención de hidrógeno a escalas mayores. En este sentido, una nueva veta de investigación se abre hacia el desarrollo de fotobiorreactores [81].

Los reactores que permiten el cultivo de microorganismos y, en su caso, la subsecuente producción de sustancias de interés, se conocen como biorreactores. Existen biorreactores que permiten cultivos desde alrededor de un litro hasta millones de litros de medio de cultivo y principalmente se utilizan cuando existe el interés de una producción comercial, aunque se pueden utilizar también biorreactores pequeños para estudios básicos y como punto de partida para procesos de escalamiento a biorreactores de mayor tamaño. Cuando los microorganismos son fotosintéticos, una fuente luminosa es entonces requerida y se habla de fotobiorreactores [82, 83].

La fuente de luz puede ser artificial, por medio de lámparas incandescentes o fluorescentes [22, 23, 26, 84], aunque existen sistemas que utilizan la radiación solar, ya sea directamente o indirectamente a través de captadores y guías ópticas [34, 81, 82]. Otras fuentes de luz, como diodos de longitud de onda larga (LW-LED), han sido utilizados [85].

Un factor importante optimización en la producción de H_2 se encuentra en el diseño de biorreactores, los cuales maximicen la absorción de luz por parte de las bacterias; ya sea mediante agitación o mediante el incremento del área superficial con respecto al volumen del reactor [23]. Entre los diversos diseños se encuentran el reactor batch de secuenciación SBR [50]; microfiltración de membrana [31]; de flujo ascendente 'upflow' [86], fotobiorreactores de columna [33, 39, 87], fotobiorreactor flotante [25], células

inmovilizadas [37, 66], biopelículas [88], reactor tubular [89]. La mayor parte de fotobiorreactores desarrollados para la producción de hidrógeno son tubulares, de panel plano y de columna burbujeante [49]. También han sido utilizados sistemas de células inmovilizadas con matrices sólidas como 'carrageenan', agar, vidrio poroso y poliuretano espumado [11]. La eficiencia fotoquímica, la cual tiene un máximo teórico de 10%, juega un papel importante en la producción de hidrógeno [73]. Intensidades altas de iluminación provocan menores rendimientos de conversión de la luz, pero mayores velocidades de producción de H_2 . Sin embargo, la luz en exceso puede desencadenar una foto-inhibición, disminuyendo la velocidad de producción [49].

En relación a la producción solar de hidrógeno, la eficiencia de conversión de luz puede disminuir durante el mediodía, debido a la alta intensidad [72]. La inclusión de bandas de sombreado demostró un incremento en la eficiencia de producción solar de hidrógeno durante el mediodía, evitando la foto-inhibición [90]. Los ciclos de luz/oscuridad inducidos por el mezclado, cuando se encuentran en el rango de micro o milisegundos, pueden mejorar la eficiencia fotoquímica [73].

El medio de cultivo dentro del reactor adquiere una mayor turbidez a medida que la bacteria fotosintética se reproduce. Este incremento en la biomasa limita la penetración de la luz al interior del reactor. Una forma de combatir este fenómeno es mediante la sustracción de una porción del medio de cultivo ya utilizado, y su reemplazo con medio de cultivo fresco, manteniendo la densidad óptica como variable de control [22, 91].

El reemplazo de medio de cultivo es importante también por el hecho de que la cinética de formación de biomasa y de generación de hidrógeno son dependientes de la concentración de biomasa y sustrato [22, 92].

Ya que el hidrógeno producido debe ser colectado, el fotorreactor debe ser un sistema cerrado. Debe ser también práctico de esterilizar. La productividad de este reactor está

limitada por la luz, por lo cual una relación superficie/volumen de reactor alta es necesaria. Las eficiencias fotoquímicas son bajas (alrededor del 10%), y tienden a decrecer a medida que la intensidad de la luz crece (efecto de saturación de la luz, ya que no todos los fotones son utilizados para la energía de reacción, sino que son disipados como calor). Esto significa que para crear un proceso biológico eficiente es importante ya sea diluir la luz y distribuirla en lo posible en el volumen del reactor y/o mezclar el cultivo a una velocidad alta para que las células sean expuestas a la luz solo por un periodo corto de tiempo [34, 39, 64, 73, 81, 93].

Dependiendo del tipo de reactor y la forma en que este es operado, las células son acarreadas durante cierto periodo de tiempo a superficies expuestas a la luz y luego a superficies oscuras. Estos ciclos de luz/oscuridad inducidos por el mezclado, cuando se encuentran en el rango de micro o milisegundos, pueden mejorar la eficiencia fotoquímica [73].

Zlatev [23], 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.

El diseño de un fotobiorreactor adecuado depende principalmente de las condiciones óptimas de crecimiento que requiere cada microorganismo, pero se tiene una noción general de los requerimientos a considerar [83]. Para empezar, se requiere de un medio de cultivo adecuado que contenga los nutrientes indispensables para el correcto metabolismo de las células. También es necesario proveer de sustratos gaseosos como oxígeno o dióxido de carbono, que son introducidos al medio de cultivo mediante diversos mecanismos para asegurar el proceso de difusión y disolución de gases en el medio líquido. En el caso de procesos anoxigénicos, es posible la introducción de un gas

inerte, como el nitrógeno, mediante burbujeo. La agitación del medio de cultivo juega un papel muy importante en la homogeneidad de nutrientes, células y temperatura durante el proceso, permitiendo un mejor control de éste. Es común utilizar el burbujeo de sustratos gaseosos comprimidos, que a su vez funciona como método para agitar el medio de cultivo. Otra forma combinada consiste en utilizar paletas de agitación que a su vez introducen el gas atmosférico al medio de cultivo. También se conocen sistemas que incluyen tanto el burbujeo como las paletas [34, 81].

En los últimos años se han comenzado a utilizar distintos sensores que permiten el seguimiento en tiempo real del cultivo a través de diversas variables, lo que también permite su control automático. Así, es posible conocer por ejemplo la densidad celular mediante técnicas ópticas (espectroscopía) o eléctricas (capacitancia y conductividad), la concentración de sustratos mediante técnicas electroquímicas (electrodos de concentración) o espectroscópicas (fluorescencia o infrarrojo). Estas técnicas tienen la ventaja de hacer un seguimiento continuo del cultivo sin requerir muestreos que pueden ocasionar problemas de contaminación o que simplemente demandan tiempos de vigilancia y análisis adicionales [8].

En los fotobiorreactores es de especial importancia una iluminación adecuada del sistema de cultivo, dado que existe una cantidad máxima de eficiencia del proceso fotosintético.

Además, la magnitud de la radiación solar depende del lugar geográfico y las condiciones climáticas. Por ejemplo la magnitud de esta radiación es de $18 \text{ MJm}^{-2} \text{ d}^{-1}$ en Ámsterdam, mientras que en Sevilla es de $26.6 \text{ MJm}^{-2} \text{ d}^{-1}$. La intensidad de la luz solar tiene una incidencia directa en la cantidad de hidrógeno producida por las bacterias fotosintéticas [73].

Cuando la energía luminosa es menor, las eficiencias son proporcionalmente menores y los cultivos tienen un metabolismo más lento. Por el contrario, si la energía luminosa es

mayor que el máximo de eficiencia, los sistemas fotosintéticos son inhibidos por una respuesta de protección de los organismos, lo que conduce a una disminución drástica en la rapidez del metabolismo celular. En general, la iluminación se hace desde el exterior, por lo que las paredes del fotobiorreactor se conciben transparentes para dejar pasar la radiación luminosa [8].

Existen también fotobiorreactores que son iluminados desde su interior, permitiendo una mayor homogeneidad de luz [34, 81].

Cuando se diseñan fotobiorreactores, la geometría del sistema juega un factor importante al igual que la fuente luminosa. Si los fotobiorreactores son muy gruesos, entonces habrá células que reciban una cantidad de luz menor que otras, pero si son muy delgados, entonces hay luz que es desaprovechada. El espectro de radiación luminosa y la distancia de la fuente de luz también deben considerarse, así como los ciclos iluminación/oscuridad. En la naturaleza estos ciclos son circadianos, repitiéndose cada 24 horas, pero se sabe que los organismos fotosintéticos tienen un metabolismo más rápido si son iluminados de manera continua, sin una fase oscura. También es posible utilizar ciclos iluminación/oscuridad muy cortos, de unos cuantos segundos, para acelerar el metabolismo en las células [34, 81, 93].

Evidentemente, el uso de luz solar natural permite una reducción significativa en los costos de producción de microorganismos fotosintéticos. Si bien es cierto que una cantidad bien controlada de luz permite un mejor control del cultivo, la iluminación artificial continua hace que el proceso óptimo sea poco económico. Con el fin de hacer rentable la producción de biohidrógeno con organismos fotosintéticos, es entonces necesario explotar el uso de fotobiorreactores que aprovechen el recurso solar al máximo. Existen varios modelos que han sido probados con distintas especies de microorganismos y con diferentes grados de éxito, pero es necesario recordar que cada tipo de células requiere condiciones muy particulares y no puede hablarse de un prototipo general para todo tipo de organismos fotosintéticos [34, 81, 93].

De acuerdo a los estudios realizados tanto en el tipo de microorganismo y sus substratos, así como de los reactores fotosintéticos y las condiciones de proceso; es posible establecer ciertas áreas de oportunidad, con la finalidad de reducir el costo del hidrógeno generado por este medio. La *tabla 11* muestra un comparativo de los costos unitarios del contenido energético del hidrógeno y otros combustibles convencionales, obtenidos a partir de procesos diversos.

Una de estas áreas de oportunidad la constituye el uso de materias primas baratas. La utilización de productos de desecho regionales elimina prácticamente este costo. Además, es necesario utilizar elementos y procesos de producción cuyos elementos permitan que el biohidrógeno sea costeable. En este sentido, el empleo de la luz solar como fuente de iluminación es imperativo.

Tabla 11. Comparación del costo unitario del contenido energético del hidrógeno obtenido mediante procesos varios, así como de otros combustibles convencionales [11].

Proceso	Materia Prima	USD/MBTU
Hidrógeno fotobiológico	H ₂ O y ácidos orgánicos	10
Hidrógeno fermentativo	Melosas	30
Pirólisis para producción de H ₂	Carbón, biomasa	4
H ₂ de electrólisis avanzada	H ₂ O	10
H ₂ de descomposición térmica de vapor	H ₂ O	13
H ₂ Fotoquímico	Acidos orgánicos	21
Etanol Fermentativo	Melosas	31.5
Gasolina	Petróleo crudo	6
Electricidad Solar	Energía solar	60
Electricidad eólica	Energía eólica	15

2.3.5.8 *Rhodobacter Capsulatus*

Finalmente, al respecto de la elección de microorganismos productores de hidrógeno, puede comentarse que en la actualidad se han estudiado solo algunas pocas especies de los cientos que se conocen y tienen la capacidad de sintetizar hidrógeno. En general se ha trabajado con especies elegidas como modelo, pero de ninguna manera se conocen los microorganismos con más altas eficiencias de conversión [83]. Existen entonces dos líneas de investigación que se concentran en la búsqueda de microorganismos fotosintéticos con altos rendimientos de biohidrógeno. Una de ellas está encaminada en la búsqueda en la naturaleza de nuevas especies que cumplan con este cometido y la comparación con el de las especies conocidas. La otra se enfoca en la genética del proceso celular para la síntesis de hidrógeno: mediante la identificación de los genes claves en la activación de este proceso, es posible proponer modificaciones genéticas en microorganismos que son ya bien estudiados y que pueden responder a las necesidades requeridas de producción [8].

En resumen, la búsqueda de métodos para la producción de biohidrógeno fotosintético es un campo que está en pleno desarrollo y en el cual se tienen grandes expectativas por sus implicaciones ecológicas en la resolución del problema energético mundial.

Aunque en las últimas décadas se han logrado grandes avances en la comprensión de los mecanismos del proceso de obtención de biohidrógeno, aún falta resolver problemas tecnológicos que propongan modelos económicos y sostenibles, requiriendo avances desde la ingeniería de fotobiorreactores hasta la ingeniería genética [93].

Entre las bacterias fotosintéticas heterótrofas, la *Rhodobacter capsulatus* fue elegida por su fuerte capacidad de producir hidrógeno [22, 46, 84, 94, 95, 96, 97, 98]. 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 [23, 99]. En cultivo batch con lactato 100mM, se obtienen 2.2 gramos de peso seco de bacteria/litro, asociado a un rendimiento de transformación de 72% de lactato en hidrógeno [23].

De acuerdo con *Das y Veziroglu* [10]; el máximo rendimiento de esta bacteria es de 5.3 mmol H₂/l.hr, el cual es de los más competitivos; solo superado por las bacterias fermentativas *Enterobacter aerogens* con 11.36 mmol H₂/l.hr, la *Citrobacter intermedius* con 11 mmol H₂/l.hr y por la *Enterobacter cloacae* con 37 mmol H₂/l.hr; aunque estas últimas producen también altas concentraciones de ácidos grasos.

También se ha demostrado que cultivos mutantes pueden ser aislados y que han mostrado capacidades mejoradas de producción de hidrógeno comparadas con la variedad silvestre. La variedad mutante IR3 de esta bacteria ha demostrado una capacidad aumentada de producción sobre otras variedades mutantes y sobre la misma variedad silvestre B10 [22, 26, 46].

Akkerman y colaboradores [73], encontraron que para el caso de las bacterias púrpura, la ventana de Radiación Fotosintética Activa PAR, se encuentra entre los 400 y los 950 nm y que el 65.8% de la radiación solar se encuentra en esta ventana. Sin embargo, para el caso de las microalgas, este porcentaje es de 43%, ya que su ventana PAR se encuentra entre los 400 y los 700 nm.

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. El *Rhodobacter* se encuentra en agua fresca o en ambientes marinos [27, 100].

La *figura 21* muestra una fotografía de la *Rhodobacter capsulatus*, mientras que la *figura 22* muestra su clasificación taxonómica. La bacteria fototrófica *Rhodobacter capsulatus* es comúnmente utilizada para la producción de hidrógeno, a través de diversas fuentes de carbono [22, 41, 42]. Sin embargo, la velocidad y el rendimiento de la reacción varían grandemente dependiendo de la fuente de carbono utilizada, y las condiciones fisiológicas experimentales, tales como la intensidad luminosa y el pH [22, 98]. Otra bacteria del mismo género, la *Rhodobacter sphaeroides*, está siendo usada extensamente en la generación de biohidrógeno [41, 47, 63].

Por otro lado, muchos estudios han mostrado que algunos cultivos mutantes pueden ser aislados y muestran capacidades de producción de hidrógeno mejoradas, comparados con la variedad salvaje [22, 98, 101].

La fotoproducción de hidrógeno es debida a la enzima nitrogenasa, la cual, en ausencia de sustratos alternativos, es capaz de reducir protones a hidrógeno [46].

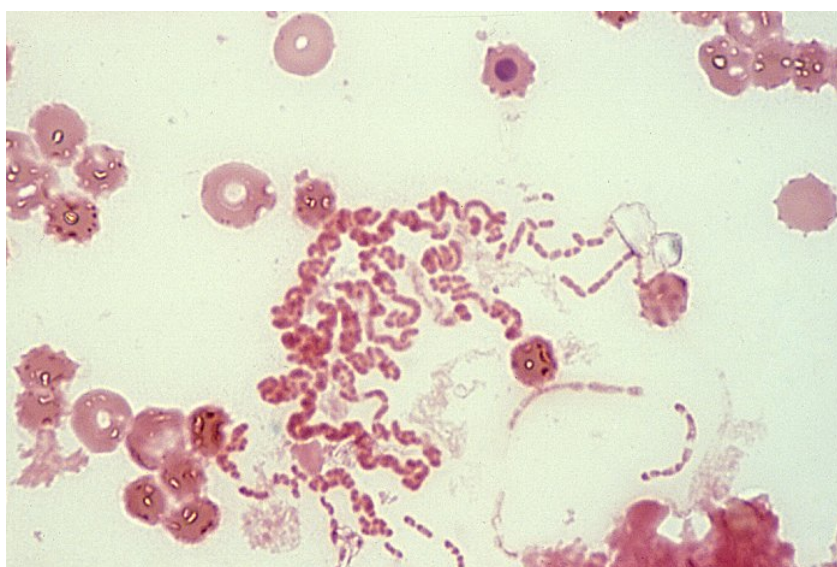


Figura 22. Fotografía microscópica de la bacteria *Rhodobacter Capsulatus* [100].

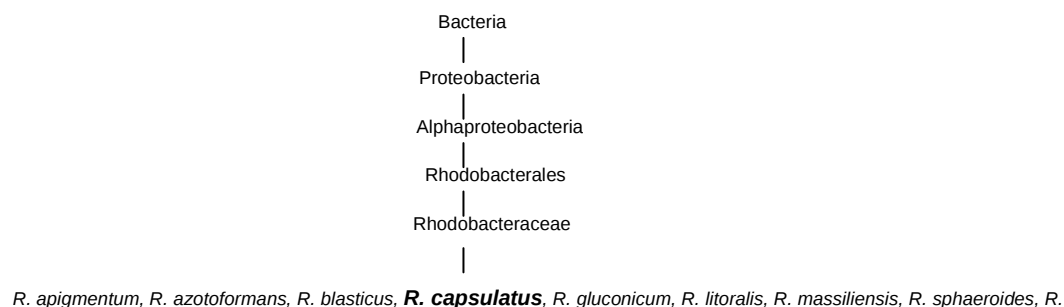


Figura 23. Clasificación taxonómica de la bacteria *Rhodobacter Capsulatus* [100].

Las condiciones anaerobias, así como altas intensidades luminosas son requeridas, además de un sustrato que sea metabolizado eficientemente. 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 [84, 94]. El lactato fue convertido a hidrógeno y dióxido de carbono con un rendimiento del 72% del máximo teórico. Otros ácidos orgánicos dieron velocidades y rendimientos de conversión a hidrógeno ligeramente menores, mientras que los azúcares fueron utilizados menos eficientemente. La velocidad de producción de hidrógeno puede ser duplicada si el crecimiento se realiza en un cultivo continuo limitado de nitrógeno [46], y rendimientos cercanos al 80% fueron obtenidos.

Sin embargo, aun no se conocen completamente los mecanismos reguladores que determinan la eficiencia de la producción de hidrógeno partiendo de diferentes sustratos.

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. La hidrogenasa es también sintetizada bajo condiciones de crecimiento heterótrofo, y está presente en los niveles más altos de cultivos productores de hidrógeno, lo cual sugiere que su síntesis está inducida por el mismo hidrógeno. Sin embargo, el rol fisiológico de la hidrogenasa bajo condiciones heterotróficas es desconocido [46].

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. Sin

embargo, el reciclado del hidrógeno desarrollado por la nitrogenasa ha sido observado solamente en células saturadas de sustratos orgánicos, lo cual sugiere que el reciclado de hidrógeno es despreciable en cultivos que producen activamente hidrógeno [46].

Numerosos procariotes pueden utilizar y producir hidrógeno a través de la acción de las hidrogenasas, las cuales han sido comparadas a electrodos reversibles de hidrógeno, en los cuales un metal como el platino sirve como catalizador. Sin embargo, existen otros organismos donde otros sistemas enzimáticos son los responsables de la oxidación y formación del hidrógeno [84].

Existen por otro lado organismos capaces de desplegar ambas capacidades, ya que pueden utilizar H_2 como agente reductor en el crecimiento fotoautotrófico, y también pueden producir H_2 como el producto principal durante el crecimiento fotoheterotrófico. La bacteria *Rhodobacter capsulata* emplea controles que aseguran que cuando existen donadores orgánicos de H_2 disponibles, el sistema dependiente de la luz que cataliza la reducción del CO_2 con H_2 (foto reducción), se hace inoperante [84].

Zlatev [23], 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.

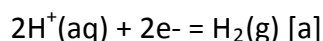
La minimización de los costos globales de la producción de hidrógeno por vía biológica necesita por un lado, la concepción de un reactor fotosintético que optimice la producción de hidrógeno; y por el otro, la utilización de bacterias mutantes con mayor capacidad de producción [23].

Además, es posible reducir costos de producción, mediante el uso de sustratos que constituyan de por si productos de desecho. Por otro lado, Si la fuente de luz fuera sustituida por luz solar, los costos de operación seria reducidos más aun.

2.4 Electrodo Reversible de Hidrógeno

2.4.1 Electrodo Estándar de Hidrógeno

El electrodo estándar (normal) de hidrógeno SHE (NHE), ha sido comúnmente aplicado durante muchos años como un electrodo de referencia, asumiendo que su potencial es de cero voltios. Está basado en el equilibrio presentado en la siguiente ecuación:



La cual ocurre en condiciones estándar: presión del hidrógeno de 1 bar y concentración del ion hidronio de 1 M/l.

El potencial del electrodo depende de la presión parcial del hidrógeno, y puede ser expresada mediante la ecuación de Nernst como sigue:

$$E = E_0 + RT/F (\ln a\text{H}^+ - \ln (p\text{H}_2/p_0)^{1/2}) \quad [\text{b}]$$

donde:

E_0 es el potencial estándar, el cual es igual a cero, por definición

$a\text{H}^+$ es la actividad de los iones hidrógeno

$p\text{H}_2$ es la presión parcial del hidrógeno

R es la constante de los gases

T es la temperatura

F es la constante de Faraday

p_0 es la presión estándar (1 bar)

2.4.2 Electrodo Reversible de Hidrógeno

Cuando el equilibrio descrito en la ecuación [a] es alcanzado a condiciones diferentes a las condiciones estándar, incluyendo la composición de la solución, el electrodo es llamado Electrodo Reversible de Hidrógeno (RHE). Su potencial depende del pH de la solución a una presión de H_2 constante, de acuerdo con la ecuación simplificada de Nernst:

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

Así como también de la presión de H_2 (concentración del hidrógeno disuelto), a un pH constante; lo cual permite la aplicación del RHE como un electrodo indicador (sensor) para hidrógeno disuelto en condiciones anaerobias. La presencia de agentes oxidantes en la solución en la cual el RHE está inmerso, corrompe el equilibrio descrito en la ecuación [a], y por ende el potencial establecido del electrodo. El RHE es usado con frecuencia como electrodo de referencia en fases orgánicas e inorgánicas, a condiciones de trabajo diversas [102, 103, 104, 105, 106, 107, 108].

Debido a que la producción bacteriana fotosintética de H_2 toma lugar en condiciones anaerobias [109, 22], el electrodo reversible de hidrógeno puede funcionar como un excelente sensor de hidrógeno para la determinación de parámetros cinéticos en tiempo real, en reactores de volumen pequeño.

La optimización de las condiciones experimentales necesarias para la maximización de la producción de hidrógeno bacteriano, requiere de un gran número de experimentos; aun cuando la metodología de Diseño de Experimentos es aplicada.

Generalmente es necesario el uso de reactores grandes (5-10 litros), conteniendo grandes cantidades de reactivos, con la finalidad de obtener resultados precisos y confiables acerca del volumen de gas H_2 generado; ya que las velocidades de este proceso son pequeñas (medidas en ml/hr).

Los sensores de hidrógeno existentes están basados en mediciones de resistencia eléctrica. En algunos estudios ha sido descrito un nanocable electrodepositado de paladio, cuya resistencia dependía del hidrógeno adsorbido, el cual es proporcional a su concentración en la fase gaseosa [110, 111].

Desafortunadamente este tipo de sensores no son aplicables en fase líquida. Sin embargo, la aplicación del RHE como sensor de hidrógeno permite la determinación precisa de la velocidad de producción de hidrógeno en reactores de pocos mililitros, solamente con el monitoreo del potencial del RHE, ya que su valor es proporcional a la concentración de H_2 disuelto (presión de H_2).

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Generación de Hidrógeno Fotosintético en Reactor

3.1.1 Bacterias y Medio de Cultivo

Los microorganismos utilizados en este estudio fueron dos tipos diferentes de la bacteria *Rhodobacter Capsulatus* (figura 24). El primero de ellos, el B10, corresponde a un tipo silvestre; mientras que el segundo, el IR3, corresponde a una modificación de la bacteria B10 [22, 26, 46]. Ambos microorganismos fueron donados por el Dr. J. P. Magnin, del Instituto Politécnico de Grenoble. El medio de cultivo utilizado (tabla 12) contiene una base de sales minerales RCV [22, 26, 46], más un tampón fosfato. El sustrato utilizado es el lactato de sodio DL en una concentración de 30 mM, mas L-glutamato de sodio en una concentración de 5 mM, como fuente de nitrógeno [23]. El pH fue ajustado a 6.8 con hidróxido de potasio.

Tabla 12. Composición del medio de cultivo utilizado para reproducción y producción fotosintética de hidrógeno con la bacteria *Rhodobacter Capsulatus*, tipos B10/IR3.

Medio de Cultivo		Tampon Fosfato		Sales Minerales		Oligoelementos	
Componente	Cantidad	Componente	Cantidad	Componente	Cantidad	Componente	Cantidad
DL-Lactato Na	5.6 g	KH ₂ PO ₄	40 g	Na ₂ EDTA	0.277 g	MnSO ₄ · H ₂ O	0.795 g
L-Glutamato Na	0.955 g	K ₂ HPO ₄	60 g	FeSO ₄ · 7H ₂ O	0.234 g	H ₃ BO ₃	1.4 g
Sales Minerales	50 ml	H ₂ O Destilada	aforar a 1000 ml	MgSO ₄ · 7H ₂ O	4 g	CuSO ₄ · 5H ₂ O	0.02 g
Tampon Fosfato	15 ml			Oligoelementos	20 ml	ZnSO ₄ · 7H ₂ O	0.12 g
H ₂ O Destilada	aforar a 1000 ml			CaCl ₂	1.132 g	Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	0.37 g
				Thiamine-HCl	0.02 g	H ₂ O Destilada	aforar a 1000 ml
				H ₂ O Destilada	aforar a 1000 ml		



Figura 24. Izquierda: Bacteria *Rhodobacter Capsulatus* tipo B10, cultivada en medio sólido. Derecha: Cultivo en medio líquido de los tipos IR3 (izq.) y B10 (der) de la misma bacteria.

3.1.2 Curvas de Crecimiento

Para la evaluación del crecimiento con respecto al tiempo de los tipos B10 e IR3 de la bacteria *Rhodobacter Capsulatus*, dos metodologías fueron aplicadas; un método óptico y un método gravimétrico.

Tubos de vidrio con tapa fueron llenados hasta 1 cm antes del borde, con medio de cultivo líquido (tabla 12). Los tubos fueron esterilizados a una temperatura de 220 °F durante 20 minutos y posteriormente fueron inoculados con 200 microlitros del tipo de bacteria correspondiente.

Los tubos fueron llevados a una incubadora a 30°C, con una exposición a una fuente luminosa de dos lámparas de filamento de tungsteno de 75 W cada una. Estos tubos fueron abiertos secuencialmente en función del tiempo transcurrido desde la inoculación, con la finalidad de analizar el desarrollo bacteriano.

En el caso del método óptico, un espectrofotómetro UV-Vis, a una longitud de onda de 660 nm fue utilizado. De esta forma fue determinada la absorbancia en función del tiempo.

En el caso del método gravimétrico, un proceso de centrifugación fue aplicado, seguido de dos procesos de lavado con agua deionizada caliente con centrifugación. La muestra fue entonces sometida a un proceso de secado a 50 °C hasta peso constante. De esta forma fue determinado el peso de la biomasa en función del tiempo.

3.1.3 Reactores

Los reactores utilizados fueron de dos tipos. El primero, un reactor de vidrio de geometría cilíndrica, de 250 ml de capacidad total. El segundo, un reactor de vidrio de geometría plana, también de 250 ml de capacidad total (*figura 25*).

Dos configuraciones de iluminación distintas fueron utilizadas (*figura 26*). La primera de ellas consistió en una lámpara de filamento de tungsteno de 75 watts de potencia, ensamblada en un deflector de luz de aluminio. La luz fue dirigida hacia el interior de una incubadora, donde fueron colocados los reactores en pares B10/IR3 a una intensidad de luz equivalente. La segunda configuración consistió en un par de lámparas de filamento de tungsteno de 75 watts de potencia cada una, colocada una al lado de la otra, en el interior de una incubadora. En el interior de la incubadora fueron identificadas líneas de iluminación constante. Con esta configuración la distribución de la luz en el interior de la incubadora fue más uniforme, de forma tal que fue posible colocar hasta cuatro reactores expuestos a una iluminación equivalente (*figura 27*).



Figura 25. Reactores de vidrio utilizados para la generación de hidrógeno fotosintético. Reactor con geometría cilíndrica a la izquierda, reactor semiplano a la derecha.

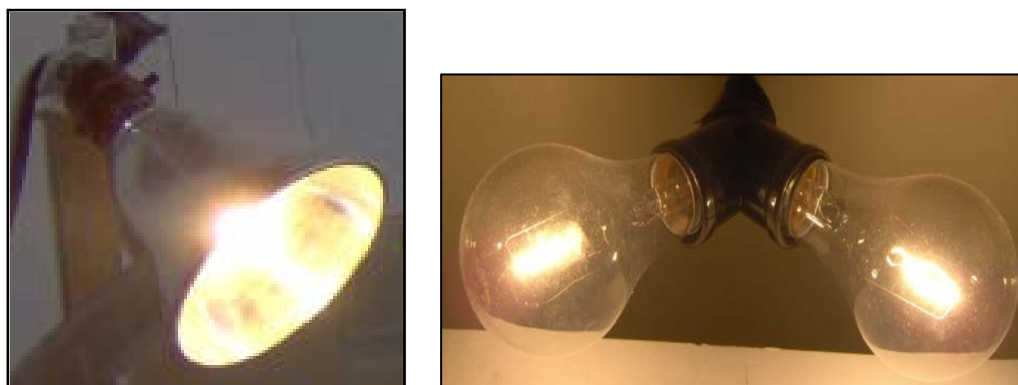


Figura 26. Lámparas de filamento de tungsteno utilizadas como fuente de iluminación artificial para el reactor fotosintético. A la izquierda la configuración de lámpara de 75 W con deflector de aluminio. A la derecha la configuración de dos lámparas de 75 W sin deflector.



Figura 27. Interior de la incubadora con cuatro reactores de geometría plana, en posiciones con la misma intensidad luminosa incidente. La figura también muestra los filtros de colores utilizados en este estudio.

3.1.4 Preparación de Experimentos de Generación de Hidrógeno

Los experimentos de comparación entre los tipos B10 e IR3, así como la comparación entre geometrías de reactor; fueron llevados a cabo con la configuración de iluminación de lámpara con deflector. Las condiciones de experimentación son mostradas en la *tabla 13*. Por otro lado, los experimentos realizados con filtros de luz, así como los experimentos comparativos de luz artificial y luz solar; fueron llevados a cabo con la configuración de iluminación de dos lámparas sin deflector. Las condiciones experimentales son mostradas en la *tabla 14*. La temperatura de la incubadora fue mantenida en un intervalo de 30 a 35 °C.

Tabla 13. Condiciones de prueba durante los experimentos comparativos de producción fotosintética de hidrógeno entre los tipos B10 e IR3 de la bacteria *R. Capsulatus*, y entre la geometría cilíndrica y plana. Estos experimentos fueron iluminados con la configuración de lámpara de filamento de tungsteno de 75 W con deflector de aluminio.

Bacteria	B10	IR3	B10	IR3	B10	IR3	B10	IR3
Geometría	<i>cilindro</i>	<i>cilindro</i>	<i>plano</i>	<i>plano</i>	<i>plano</i>	<i>plano</i>	<i>plano</i>	<i>plano</i>
Volumen (ml)	250	250	245	245	245	245	245	245
Intensidad Luminosa (lux)	2500	2500	2500	2500	5000	5000	17,000	17,000
Distancia a fuente de luz (cm)	50	50	50	50	26	26	10	10

Tabla 14. Condiciones de prueba durante los experimentos comparativos de producción fotosintética de hidrógeno entre los diferentes filtros aplicados alrededor del reactor plano, con la bacteria *R. Capsulatus* IR3. Estos experimentos fueron iluminados con la configuración de dos lámparas de filamento de tungsteno de 75 W sin deflector.

Color de Filtro	Sin Filtro	Rojo	Verde	Azul
Bacteria Tipo	IR3	IR3	IR3	IR3
Geometría	plano	plano	plano	plano
Volumen de Reactor (ml)	245	245	245	245
Intensidad Luminosa (Lux)	5000	5000	5000	5000

Para los experimentos comparativos de luz solar vs luz artificial, la luz solar incidente mostro una intensidad variable desde 90,000 hasta 115,000 luxes. Durante periodos de sombra cortos, durante los cuales el reactor recibía luz solar difusa, la intensidad fluctuó de 6,000 a 10,000 luxes. Una vez interrumpida la luz solar, los reactores fueron llevados a la incubadora con luz artificial con una iluminación de 5,000 luxes, hasta que la luz solar estuvo disponible nuevamente, realizando ciclos luz solar/lámpara de tungsteno, hasta la finalización del proceso de producción de hidrógeno. Las bacterias utilizadas fueron los tipos B10 e IR3. Durante estos experimentos la temperatura del medio de cultivo fue variada de forma escalonada, desde los 30°C hasta los 50 °C, con el objetivo de evaluar la generación de hidrógeno en condiciones de temperatura comunes en la región de

Mexicali, B.C; así como la temperatura máxima de viabilidad de la bacteria en cuestión. La temperatura de los reactores fue controlada mediante un baño de agua (*figura 28*).



Figura 28. Reactor plano en un baño de temperatura controlada, durante la etapa de producción fotosintética de hidrógeno con luz solar.

El medio de cultivo y los reactores fueron esterilizados dentro de una autoclave. Después de la inoculación, la boca de cada reactor fue tapada con un tapón de silicón estéril. En este tapón fue insertada una aguja de calibre grueso, con la finalidad de inyectar nitrógeno y burbujearlo en el medio de cultivo. Una segunda aguja fue insertada para permitir al oxígeno desplazado abandonar el sistema, y generar una atmósfera anoxigénica (*figura 29*).

Posteriormente, solo una aguja fue dejada dentro del sistema, a la cual fue conectada una manguera destinada a transportar el biogás hasta el sistema de medición. Este sistema fue construido con una probeta graduada colocada con la boca hacia abajo en el seno de un líquido conteniendo hidróxido de calcio. La manguera fue insertada dentro de la probeta con el objetivo de burbujear el biogás generado en el reactor, y eliminar el dióxido de carbono presente a través de la reacción de formación de carbonato de calcio insoluble (*figuras 30 y 31*).



Figura 29. Detalle de la inserción de aguja de calibre grueso para burbujeo de nitrógeno en el medio de cultivo, al lado de una aguja para desalojar nitrógeno así como los gases desplazados al exterior (arriba). Un recipiente de plástico conteniendo nitrógeno fue conectado a la aguja de burbujeo a través de una manguera de plástico transparente (abajo).



Figura 30. Vista general del acoplamiento del bio-reactor con el sistema de medición de hidrógeno para dos reactores (arriba) y para cuatro reactores (abajo). El líquido en la

probeta está saturado con hidróxido de calcio. El biogás generado en los reactores es burbujeado en el seno de este líquido.



Figura 31. Detalle de la inserción de la manguera que conduce el biogás al interior del sistema medidor de hidrógeno.

3.2 Generación de Hidrógeno con Suero de Leche de Vaca

3.2.1 Preparación del Suero

El suero de leche de vaca utilizado en este estudio fue recolectado de una granja familiar de productos lácteos en el Ejido Nuevo León del Valle de Mexicali.

La grasa sobrenadante fue retirada mediante un proceso de derramamiento por flotación. El suero fue posteriormente esterilizado, para inoculación con los tipos B10 e IR3 de la bacteria *Rhodobacter Capsulatus*.

Debido a que la esterilización del suero de leche generó una gran turbidez en el interior de los tubos de cultivo debido a la coagulación de proteína, dos estrategias fueron llevadas a cabo para la eliminación de la turbidez.

La primera de ellas consistió en el filtrado del medio de cultivo ya esterilizado, con una segunda etapa de esterilización. La segunda estrategia consistió en un proceso de acidificación con HCl grado reactivo diluido al 15% vol., seguido de un proceso de decantación y filtrado, previo al proceso de esterilización.

3.2.2 Fermentación Previa

Después de la inoculación, los tubos de cultivo fueron llevados a la incubadora, a una temperatura de 30 °C con exposición a la configuración luminosa de dos lámparas de tungsteno de 75 W. Debido a la falta de generación de biogás a pesar del desarrollo de la bacteria en el medio de cultivo, un proceso previo de fermentación fue realizado, bajo la hipótesis de transformar toda la lactosa presente en el suero de leche en ácido láctico, aprovechable para la generación de biohidrógeno.

Previo al proceso de filtrado y esterilización, el suero de leche fue mantenido en una incubadora a 30 °C en oscuridad durante dos días. Una variante de este proceso fue realizada, en la cual un inóculo de *Lactobacillus acidophilus* comercial en suero de leche fue realizado, y mantenido en incubadora bajo las mismas condiciones de temperatura y tiempo.

3.3 Electrodo Reversible de Hidrógeno

3.3.1 Reactivos

Todos los reactivos empleados en los experimentos fueron de pureza grado analítico. Las soluciones fueron preparadas con agua deionizada generada con una instalación de ósmosis inversa Milli Q (Millipore, USA).

El electrolito de trabajo empleado para la determinación de las características del electrodo reversible de hidrógeno como sensor de hidrógeno, fue ácido sulfúrico 1M de Sigma.

3.3.2 Características del RHE

La determinación de las características del electrodo reversible de hidrógeno como sensor de hidrógeno fue llevada a cabo utilizando un electrodo de anillo de platino con un recubrimiento de platino negro. Este electrodo es parte de una celda conductimétrica YSI modelo 3401, la cual contiene dos electrodos de anillo iguales.

La celda fue sumergida verticalmente casi hasta el fondo de un vaso de precipitado de 100 ml, conteniendo una solución de ácido sulfúrico 1M. El electrodo de anillo de platino más cercano al fondo fue utilizado como cátodo para la generación de hidrógeno, el cual fue conectado a la terminal negativa de una fuente de poder controlada.

Un electrodo de alambre de platino Fisher Cat#13-639-123 fue utilizado como ánodo, conectado a la terminal positiva, sumergida en la solución 1M de H_2SO_4 , aunque por fuera de la celda conductimétrica, una pulgada por encima del fondo del vaso; para prevenir la entrada del oxígeno generado al interior de la celda y que este se mezcle con el hidrógeno generado en el interior de la misma.

El electrodo de platino colocado más arriba fue utilizado como electrodo indicador (sensor de hidrógeno), conectado a una entrada de alta impedancia de un medidor Orion/Thermo pH/mV, modelo 420A Yokogawa.

Un sistema Ag/AgCl 3M de KCl fue utilizada como electrodo de referencia. El hidrógeno generado en el anillo de platino inferior de la celda se transporto hacia arriba, alcanzando el electrodo indicador, determinando así su potencial, de acuerdo a la concentración de hidrógeno. El diseño del sistema experimental está ilustrado en la *figura 32*.

El mismo diseño fue utilizado en los experimentos con la producción bacteriana de hidrógeno. El vaso conteniendo la celda conductimétrica, el ánodo de platino y el electrodo de referencia; fue colocado en un cilindro de plástico cerrado en una atmosfera con flujo de nitrógeno. El medio de cultivo de las bacterias fue mantenido a baja presión a una temperatura de 40 °C durante 24 horas, con la finalidad de remover el oxígeno disuelto. La purga con flujo de nitrógeno no puede ser aplicada, ya que la solubilidad del nitrógeno es un poco mayor a la del hidrógeno, el cual no es capaz de desplazar al nitrógeno durante la generación del biogás.

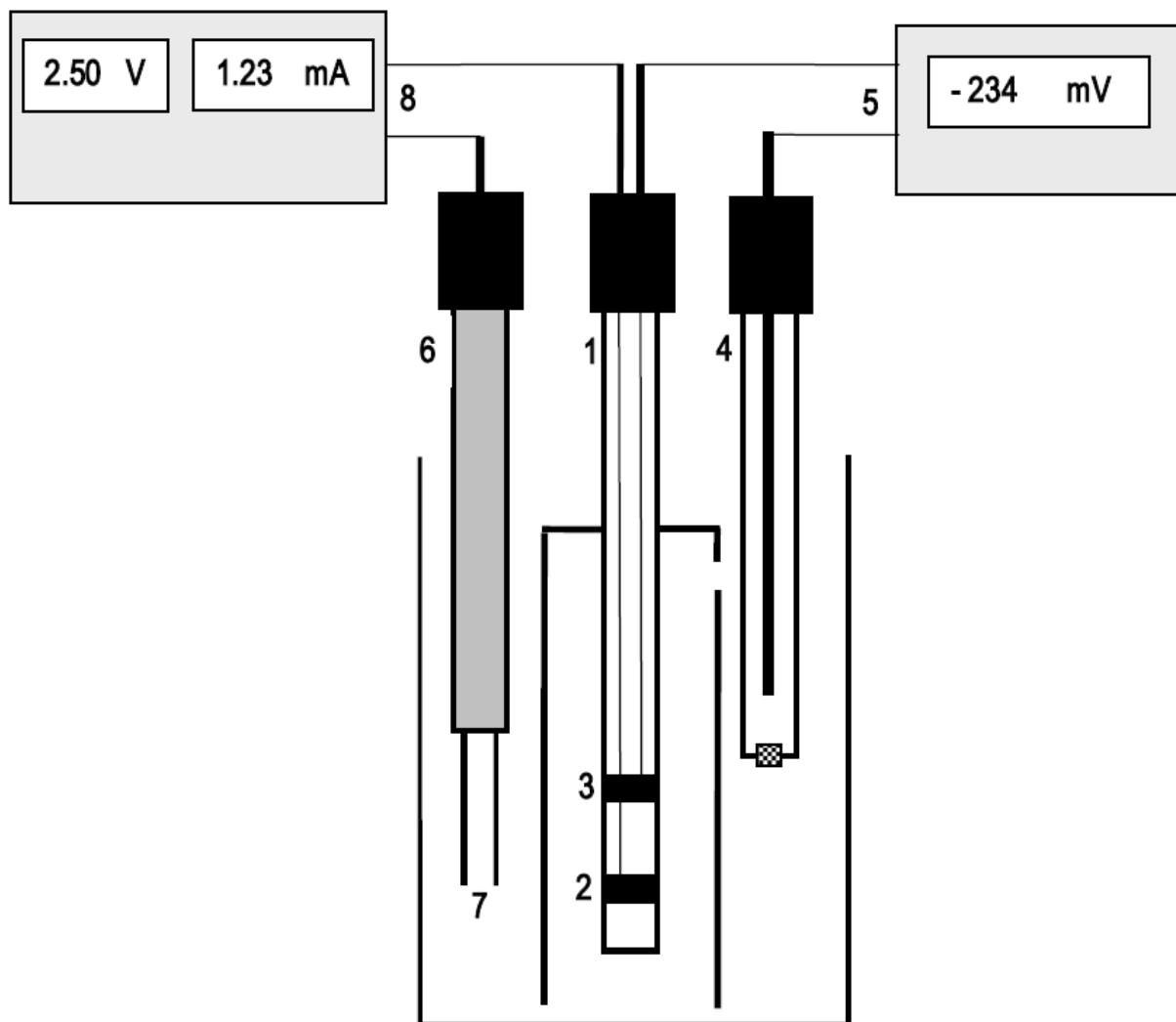


Figura 32. Diseño del sistema experimental para la determinación del electrodo reversible de hidrógeno como sensor de hidrógeno.

3.3.3 Determinación del volumen generado de Hidrógeno

Un potencial de 2.3 V fue aplicado entre el electrodo de platino generador, situado en la parte inferior de la celda conductimétrica; y el ánodo exterior, resultando en la generación de hidrógeno en el interior de la celda conductimétrica. La masa del hidrógeno generado, así como su volumen, fue calculado mediante la aplicación de la ley de Faraday, utilizando la cantidad de corriente evaluada por integración de la curva $i-t$. La

corriente fue monitoreada aplicando un convertidor de corriente a voltaje construido en el laboratorio, acoplado a un sistema de adquisición de datos National Instruments USB 6009, utilizando el software National Instruments Lab View 8.0.

3.4 Diseño de Reactores Biológicos Fotosintéticos

3.4.1 Reactor Plano de Flujo Continuo

3.4.1.1 Diseño y Construcción

El reactor fue construido con placas de plexiglás comercial, de 1/8 de pulgada de espesor. Los espacios fueron cerrados con una disolución de plexiglás en cloroformo.

Fue utilizada una bomba de rotor magnético, de 24 V nominales de operación, para lograr la circulación/agitación del medio de cultivo en el seno del reactor. Fue utilizada también una fuente de poder con potencial variable, con el objetivo de calibrar el flujo de la bomba respecto a las propiedades de flujo de salida.

El reactor piloto fue diseñado tomando como base el área de irradiación luminosa de una lámpara de tungsteno. Fue utilizado un diseño plano de flujo laminar.

La *figura 33* muestra el diseño de planta del reactor, el cual posee dos cámaras. La cámara 'b' está diseñada para estar siempre llena, y crear un flujo laminar sobre la superficie de la placa que divide ambas cámaras. El fluido cae en el fondo de la cámara 'a', y es jalado hacia fuera por la bomba, con el propósito de mantener una recirculación que mantenga el fluido homogéneo.

Cuando el substrato con la bacteria se deslice sobre la placa, esta será expuesta a la luz por una fracción de segundo, para luego pasar a una zona de menor iluminación.

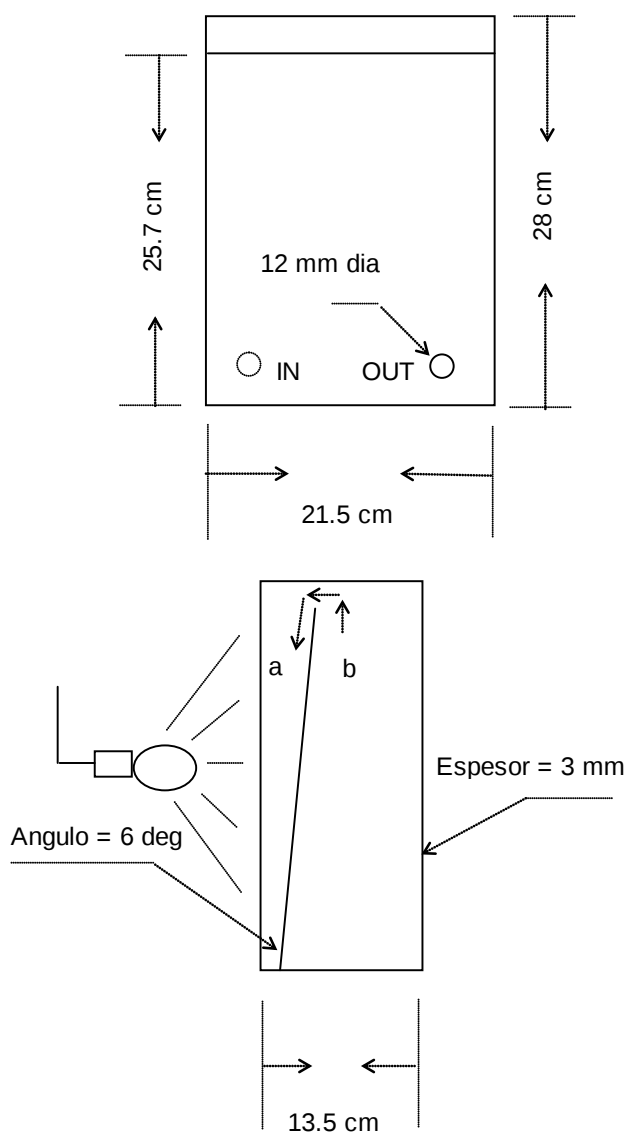


Figura 33. Diseño del reactor fotosintético plano de flujo laminar, mostrando la vista frontal (arriba) y la vista lateral (abajo).

La *figura 34* muestra imágenes del sistema del reactor en operación, junto con la bomba de rotor magnético, la fuente de poder, y la lámpara. La segunda imagen muestra el flujo laminar, deslizándose por la placa que divide ambas cámaras.

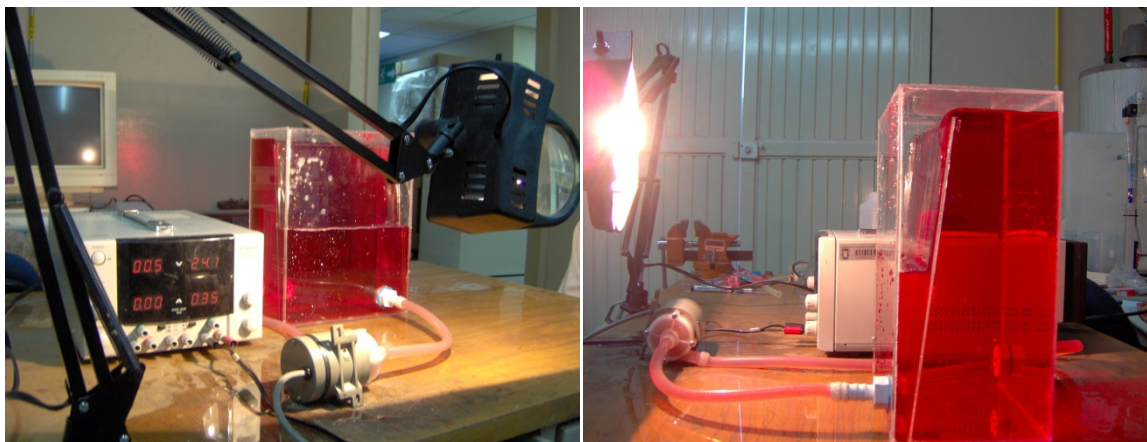
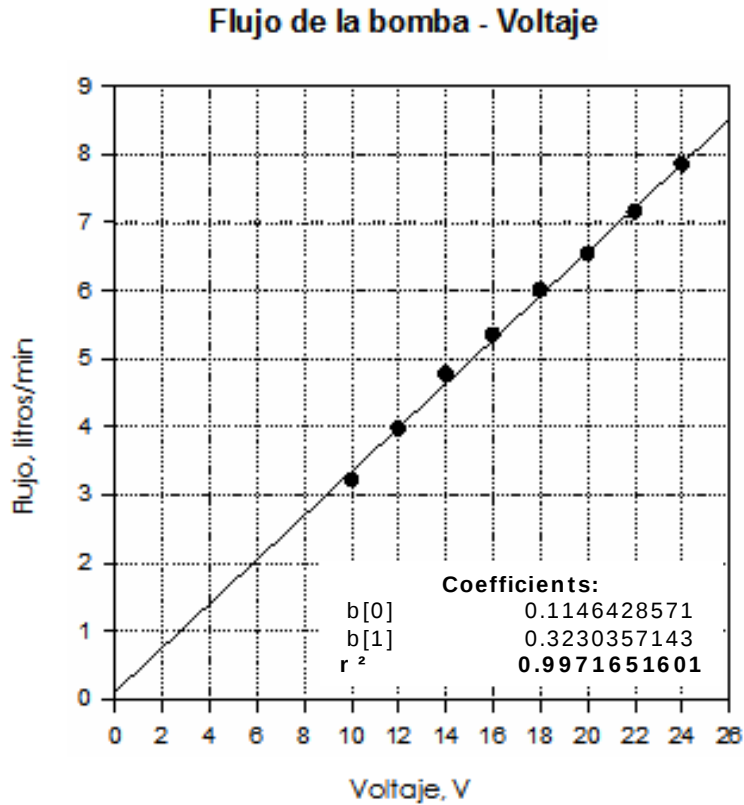


Figura 34. Imágenes del sistema de reactor en operación, junto con fuente de poder, lámpara y bomba magnética. En la figura de la izquierda es posible apreciar la capa delgada de flujo laminar de mayor exposición a la fuente luminosa.

3.4.1.2 Caracterización Hidrodinámica del Reactor

La inducción de ciclos de luz/oscuridad puede mejorar la eficiencia fotoquímica del proceso (73). El flujo volumétrico entonces, debe ser regulado con el propósito de investigar el efecto del tiempo de exposición a una mayor intensidad luminosa sobre la producción de hidrógeno. A partir de esta caracterización, es posible también controlar el espesor de la capa de flujo laminar y por lo tanto modificar la homogeneidad de la distribución de la luz.

Finalmente, si se combina el conocimiento del espesor de la capa de flujo laminar, con el conocimiento de la población bacteriana en el interior del reactor, es posible conocer la densidad poblacional bacteriana en la placa de flujo. Con el propósito de conocer el cambio del flujo volumétrico con respecto al voltaje aplicado a la bomba de rotor magnético, una curva de calibración fue realizada.



$$Q \text{ (lt/min)} = 0.1146 + 0.3230V(\text{volts})$$

Figura 35. Gráfica de caracterización hidrodinámica del sistema de reactor.

De esta forma, es posible controlar el flujo volumétrico con el voltaje de la bomba, de una forma más precisa.

La *figura 35* muestra la grafica flujo volumétrico vs. voltaje, la cual se ajusta a una línea recta con un coeficiente de correlación $R = 0.997$.

La prolongación de esta línea recta cruza por el origen, lo cual también demuestra que la capacidad de predecir el flujo volumétrico a través del voltaje aplicado a la bomba es adecuada.

Velocidad lineal en placa

$$V = \frac{Q}{W \times e} = \frac{19.1 + 53.8V(\text{cm}^3 / \text{s})}{We(\text{cm}^2)}$$

Tiempo de Residencia en la placa

$$\tau_h = \frac{21.5 \times e \times l}{19.1 + 53.8V}, (\text{s})$$

Q = flujo volumetrico (cm^3/s).

W = ancho del reactor (cm).

e = espesor de capa hidraulica (cm).

V = voltaje de la bomba (Volts),

L = longitud de placa divisoria (cm).

τ_h = tiempo de residencia en placa de flujo laminar. El subindice 'h' se refiere a que el medio se expone a una intensidad luminosa alta cuando pasa por esta placa.

Figura 36. Ecuaciones desarrolladas para el cálculo de la velocidad lineal y del tiempo de residencia de las bacterias en la placa interna del reactor.

Numero de Reynolds

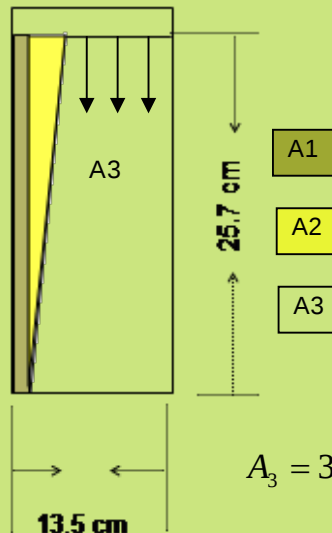
$$Re_h = \frac{D_h \times V \times \rho}{\mu}$$

$$D_h = 4 \times \frac{\text{area de flujo}}{\text{perimetro humedo}} = 2 \text{ cm}$$

$$Re_h = 1880 \quad \text{Laminar}$$

(a)

Ciclo de Menor Exposición



$$A_3 = 315.4 \text{ cm}^2$$

$$Vol_3 = A_3 \times W = 6781 \text{ cm}^3$$

$$\tau_l = \frac{Vol_3}{Q} = \frac{6781 \text{ (cm}^3\text{)}}{19.1 + 53.8V \text{ (cm}^3\text{/s)}}$$

Vol_3 = volumen de area de menor exposicion
a la luz.

τ_l = tiempo de residencia en area de
menor exposicion a la luz.

(b)

Figura 37. Ecuaciones desarrolladas para el cálculo del numero de Reynolds (a) y del tiempo de residencia de las bacterias el área de menor exposición a la luz dentro del reactor (b).

Las *figuras 36 y 37(b)* muestran las ecuaciones desarrolladas para el cálculo del tiempo de residencia de las bacterias, tanto en la zona de mayor exposición a la luz, como en la zona de 'obscuridad'.

La *figura 37(a)* muestra el cálculo del Número de Reynolds. Para un voltaje de la bomba igual a 12 V, el flujo volumétrico es de 4 l/min, mientras que el Reynolds correspondiente es de 1880 el cual se encuentra en la zona de flujo laminar.

3.4.2 Reactor Solar de Lecho Empacado

3.4.2.1 Diseño del Reactor

El reactor fotosintético solar propuesto es del tipo continuo, con geometría cilíndrica de lecho empacado con perlas de vidrio. El empacado del reactor es incluido con el propósito de incrementar la profundidad de la penetración de la luz solar. Al mismo tiempo tiene el objetivo de crear una película líquida de flujo laminar alrededor de cada perla, para la verificación de la reacción biológica (*figura 38*). Finalmente, el flujo de recirculación permite la homogenización del caldo de reacción.

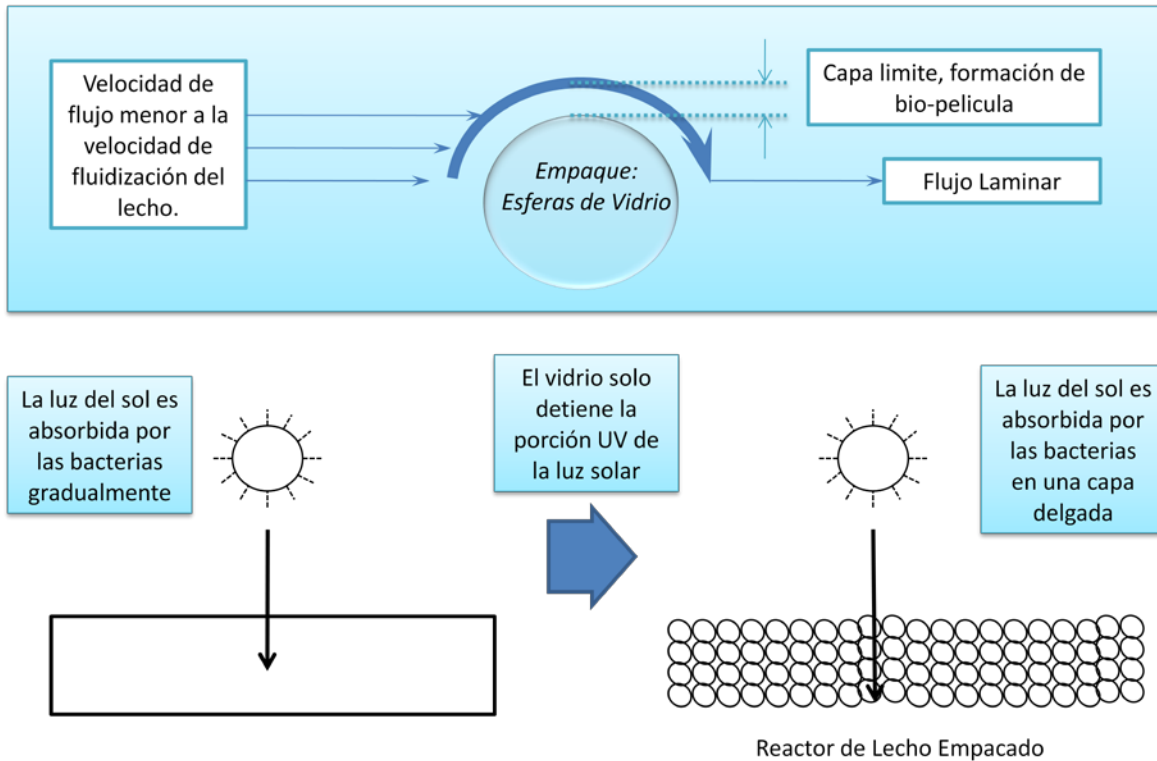


Figura 38. Esquema del reactor cilíndrico de lecho empacado con esferas de vidrio, mostrando la formación esperada de una biopelícula en la superficie de las esferas.

El cuerpo del reactor será construido con plexiglás comercial, y el empaque de perlas de vidrio común. Una bomba de rotor magnético operada a 12V será utilizada para recircular el medio líquido a través de una manguera multicapa. Los materiales tales como acero, plexiglás, cables de conexión, bombas, etc., serán de postconsumo.

El diseño propuesto del reactor puede ser subdividido en los siguientes sistemas: i) reactor (lecho empacado de flujo laminar); ii) sistema de control de la temperatura; iii) sistema de iluminación solar; iv) sistema de agitación; y v) sistema de recolección de biogás (*figura 39*).

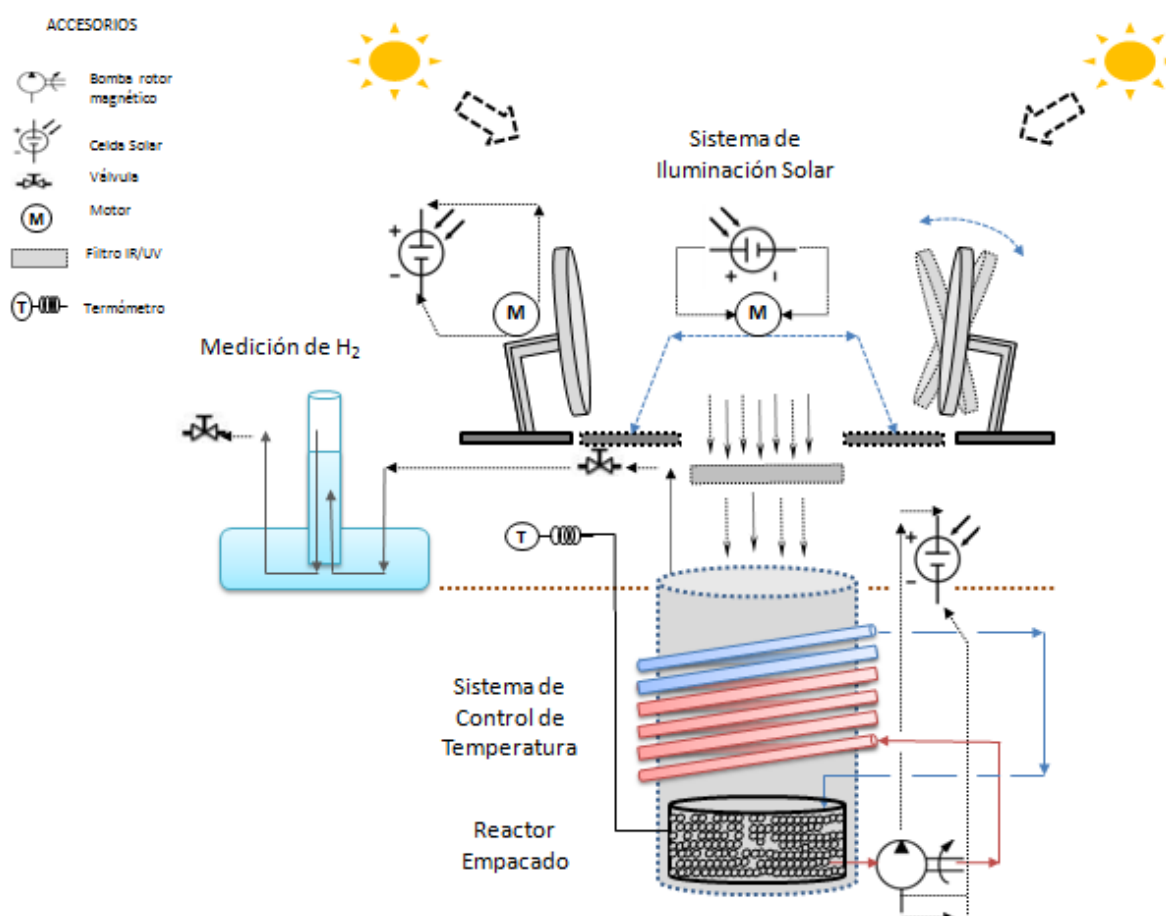


Figura 39. Esquema general del diseño del reactor fotosintético solar de producción de hidrógeno y sus subsistemas.

El reactor será colocado en un orificio cavado en la tierra de forma perpendicular a la superficie, con el propósito de mantener un control de la temperatura con bajo consumo de energía. La geometría del orificio es cilíndrica, de 40 cm de diámetro por 120 cm de profundidad. El fluido dentro del reactor será recirculado a través de un serpentín de manguera multicapa PEX-Al-PEX de 0.5 in de diámetro interno, colocada de forma subterránea con el objetivo de reducir la temperatura en el interior del reactor (*figuras 39 y 40*). El sistema de recolección de hidrógeno consistirá en un recipiente de vidrio de forma cilíndrica alargada, colocado con la apertura hacia abajo. El tubo estará parcialmente lleno de una solución salina de hidróxido de calcio, con el objetivo de hacer reaccionar el dióxido de carbono que pueda formarse junto con el hidrógeno, debido a la

presencia de oxígeno disuelto en el medio. El volumen de hidrógeno generado estará dado por el volumen desplazado de la solución de hidróxido de calcio en el interior del tubo invertido (*figura 39*).

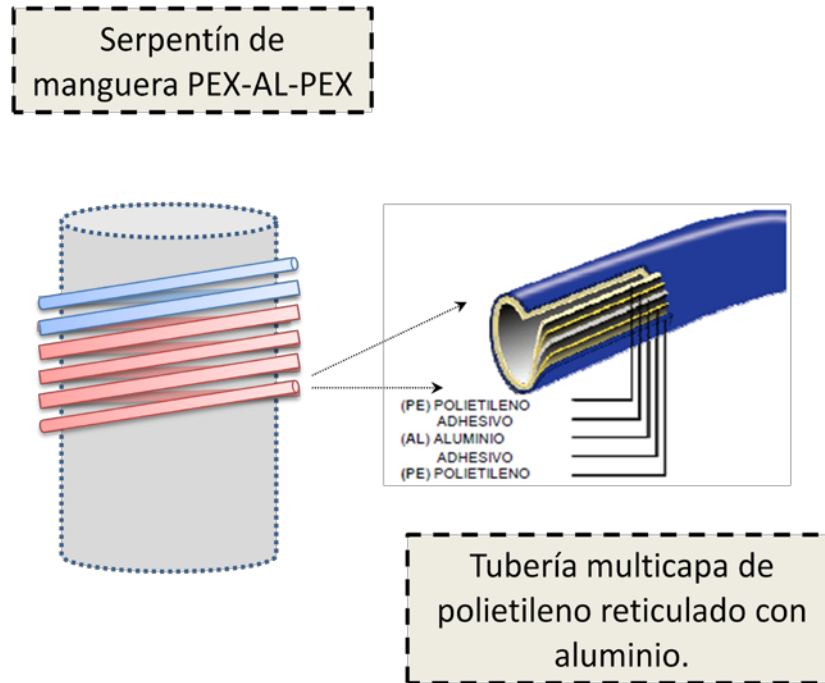


Figura 40. Detalle de la manguera multicapa que es parte del sistema de enfriamiento propuesto en este diseño.

El medio de cultivo será impulsado por una bomba de rotor magnético, a un potencial de operación de 10V. La energía para la operación de esta bomba procederá de una celda solar, con el propósito de mantener la sustentabilidad del sistema y al mismo tiempo mantener los costos de operación bajos. Con el propósito de evitar los problemas potenciales de contaminación y muerte bacteriana por corrosión, una tubería PEX-AL-PEX, la cual es una tubería multicapa de polietileno reticulado liso y aluminio (*figura 40*). La capa interna de polietileno reticulado evita la formación de fuentes contaminantes tales como la corrosión, y al mismo tiempo provee una superficie que evita la adherencia de bacterias. Además de eso, este material provee resistencia a diversos ácidos y álcalis. La

capa interna de aluminio evita la permeabilidad del aire hacia el interior del tubo, y mejora la transferencia de calor a través de la pared del mismo. La energía luminosa será llevada al interior del reactor con ayuda de un espejo móvil. La señal de movimiento del espejo será generada por dos sensores fotosensibles colocados en los extremos del espejo. Un amperímetro diferencial determinará la dirección del movimiento en dos coordenadas diferentes (*figura 41*). El diseño del sistema de direccionamiento solar incluye una celda fotovoltaica, la cual se conecta a una batería; la cual proporciona la energía para el movimiento del motor.

El motor se conecta a un amperímetro diferencial, el cual determina la diferencia de las señales eléctricas generadas en sensores de luz colocados en los extremos del espejo. De esta forma, cuando existe una diferencia entre la intensidad luminosa recibida, el motor mueve al espejo, hasta que la diferencia es anulada.

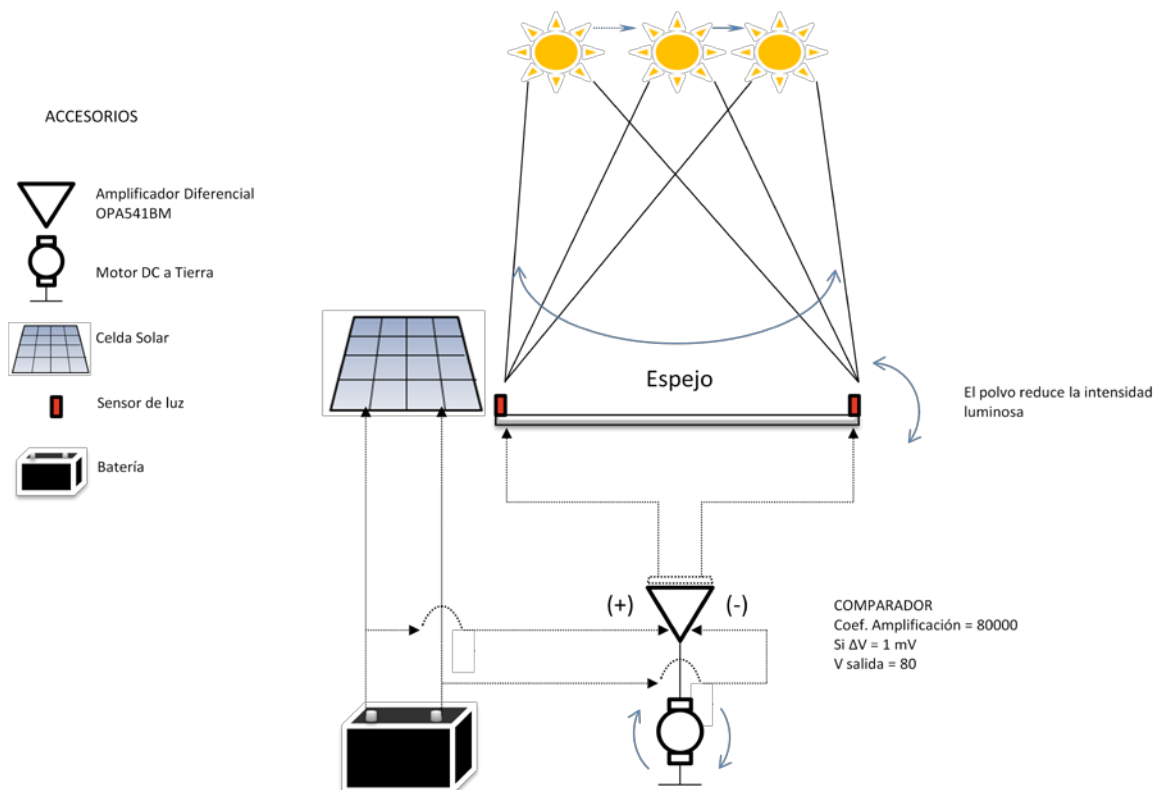


Figura 41. Sistema de direccionamiento solar, el cual cambia de posición a medida que la posición del espejo con respecto al sol cambia en el transcurso del día.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Curvas de Crecimiento

El estudio comparativo de crecimiento de las bacterias *R. Capsulatus* tipo silvestre (B10) y modificada (IR3), fue realizado en condiciones anaeróbicas, y con exposición a la luz de dos lámpara de filamento de tungsteno de 75W, a una temperatura de 30 °C. La *figura 42* muestra los resultados obtenidos de absorbancia de luz a una longitud de onda de 660nm, con respecto al tiempo.

Las curvas de crecimiento muestran básicamente tres etapas, una de crecimiento lento o adaptación, seguida por una etapa de crecimiento rápido y finalmente una etapa estacionaria. Este comportamiento es el mismo cualitativamente para ambos tipos de bacteria. Sin embargo, en la etapa estacionaria la absorbancia de luz de los cultivos silvestres es mayor a la absorbancia de los cultivos modificados, lo cual sugiere una mayor población bacteriana.

Los resultados de medición de biomasa con respecto al tiempo (*figura 43*), confirman los resultados obtenidos con absorbancia. Esta menor población de la bacteria IR3 sugiere que el consumo de medio nutritivo es menor, y que eventualmente la producción de biogás podría ser mayor. La observación cualitativa de los cultivos en este estudio muestra que la generación de burbujas, la cual es un efecto de la producción de biogás; comienza precisamente al inicio de la etapa estacionaria de crecimiento de ambos tipos de bacteria.

Por otro lado, la diferencia en la población bacteriana de ambos tipos de bacteria, en el momento de alcanzar la fase estacionaria; puede representar que el nivel de consumo de medio de cultivo (especialmente del lactato), es mayor para la bacteria silvestre y que por tanto; el lactato disponible para su transformación en hidrógeno es menor.

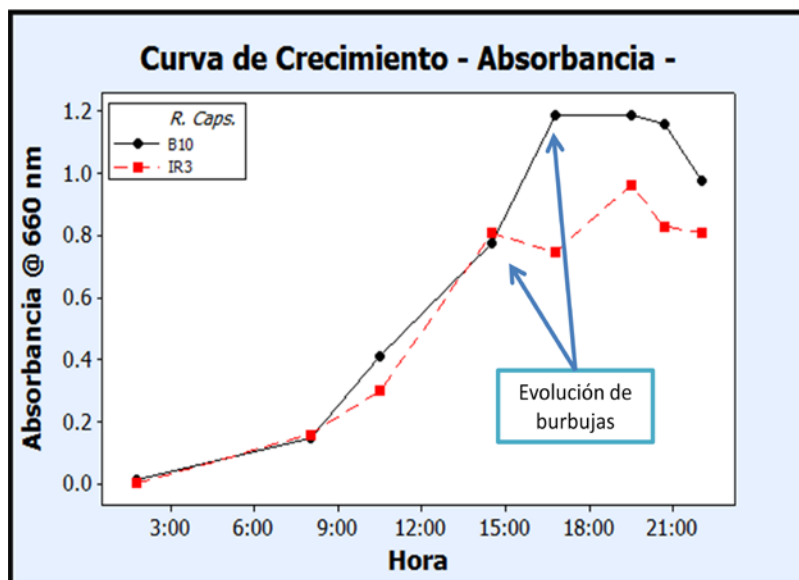


Figura 42. Curvas de crecimiento de las bacterias *R. Capsulatus* tipo B10 e IR3, en función de la absorbancia de luz a 660nm. La evolución de burbujas de biogás comienza en la etapa estacionaria de crecimiento. La absorbancia del tipo B10 es mayor a la del tipo IR3 en esta etapa.

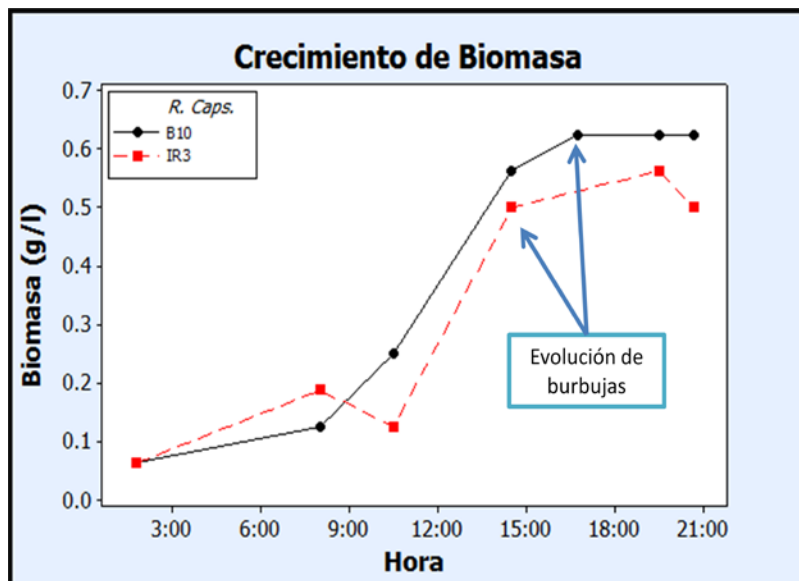


Figura 43. Curvas de crecimiento de las bacterias *R. Capsulatus* tipo B10 e IR3, en función de la biomasa. La evolución de burbujas de biogás comienza en la etapa estacionaria de crecimiento. La concentración de biomasa del tipo B10 es mayor a la del tipo IR3 en esta etapa.

4.2 Generación de Hidrógeno en Reactor Fotosintético

4.2.1 Producción de Hidrógeno por Tipo de Bacteria

Por otro lado, los experimentos de producción y medición de hidrógeno en reactores fotosintéticos con luz de lámpara; muestran que efectivamente bajo las condiciones de experimentación ya definidas, la bacteria modificada produce un volumen de hidrógeno mayor (*figura 44*). Cuando los reactores fueron colocados a una distancia de 50 cm del foco de filamento de tungsteno de 75 W con un deflector de luz, el volumen total de hidrógeno generado fue de 419 ml para la bacteria modificada, y de 302 ml para la bacteria silvestre.

La curva de producción de hidrógeno de la bacteria B10 se caracteriza por la presencia de una etapa de evolución rápida de biogás, seguida por una etapa de decaimiento. Por otro lado, la bacteria IR3 tarda un poco más en iniciar la etapa de producción rápida de hidrógeno, pero la pendiente es mayor, lo que significa que la velocidad máxima de producción debe ser mayor para la bacteria modificada. Además, la etapa de producción rápida es más larga para la bacteria IR3. Es por ello que el volumen total de hidrógeno es mayor en el reactor con esta bacteria.

Asimismo, los datos de velocidad promedio de cada intervalo de puntos son mostrados en la *figura 45*. Es posible observar que aunque las velocidades máximas de producción de hidrógeno son muy cercanas en ambos tipos de bacteria, el decaimiento de la velocidad de producción es más rápido para la bacteria silvestre. Por ejemplo, para la bacteria silvestre, el punto de velocidad máxima es alcanzado a un tiempo de 25 horas. Después de 75-80 hrs de iniciada la prueba, la velocidad de producción es de 1 ml/hr. Para el caso de la bacteria modificada, el punto de velocidad máxima es alcanzado a un tiempo de 50 horas, pero es hasta después de 160-170 horas del inicio de la prueba que la velocidad de producción decae hasta 1 ml/hr. Esto significa que el área bajo la curva velocidad de producción vs tiempo es mayor para el tipo IR3.

La velocidad máxima de producción de hidrógeno es mayor para la bacteria silvestre, de 5.79 ml/hr contra 5.40 ml/hr de la bacteria modificada. Sin embargo, la velocidad promedio de generación de hidrógeno es mayor para el caso de la bacteria modificada (2.27 ml/hr), que el de la bacteria silvestre (1.60 ml/hr). Estos datos son consistentes con los datos del volumen total generado (*tabla 15*). Esta tabla muestra los resultados de velocidades máxima y promedio de producción, así como el volumen total y el rendimiento de conversión de sustrato en hidrógeno; en función de la distancia de los reactores a la fuente de luz.

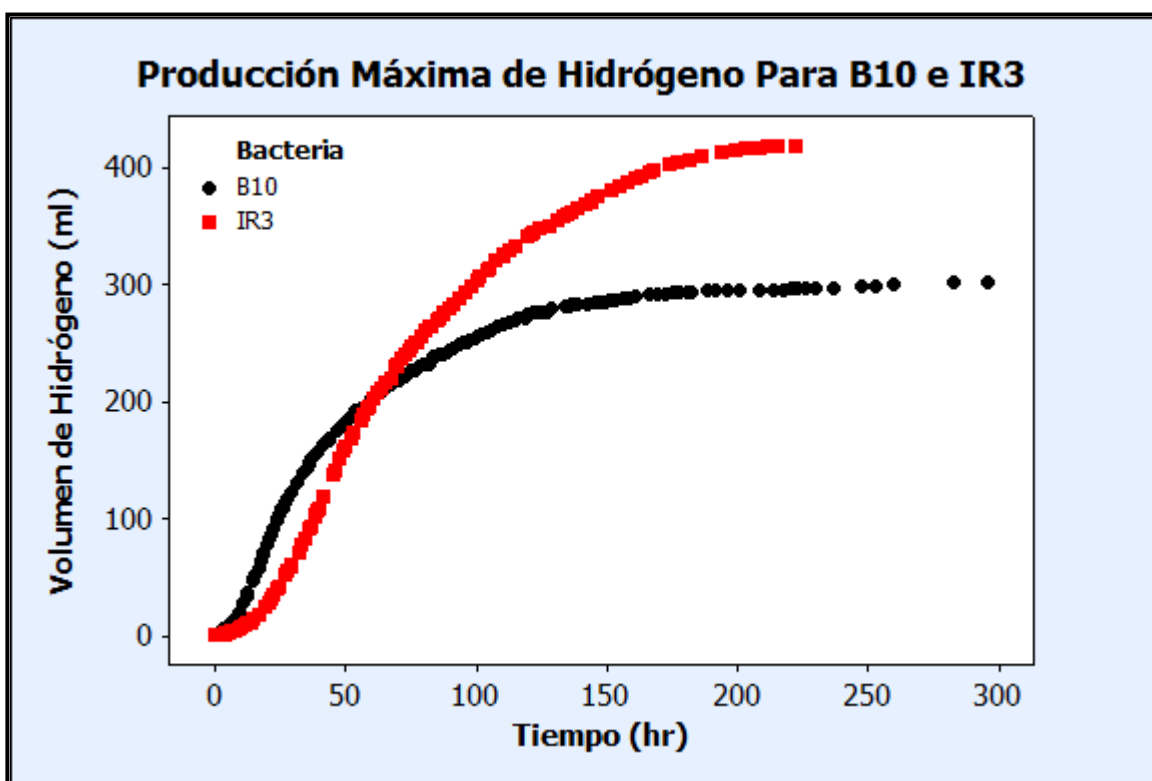


Figura 44. Grafica de volumen generado de hidrógeno(ml), en función del tiempo(h), durante los experimentos realizados con lámpara de filamento de tungsteno como fuente de luz, para la bacteria tipo silvestre(izquierda), y la bacteria modificada(derecha). Los reactores fueron colocados a una distancia de 50 cm de la fuente de iluminación. Los datos muestran un volumen total de producción mayor para la bacteria tipo IR3.

Para cada una de las distancias evaluadas, el rendimiento de conversión es mayor para la bacteria modificada. Cuando los reactores fueron colocados a la distancia mínima de 10 cm respecto a la lámpara con deflector, la temperatura de los reactores aumento hasta 45 °C. La bacteria silvestre no mostro crecimiento en estas condiciones (*tabla 15*).

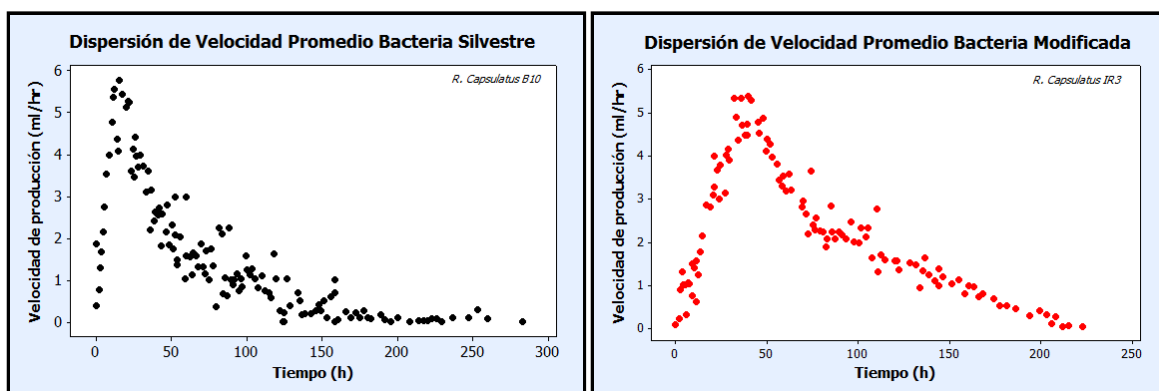


Figura 45. Gráfico de dispersión de la velocidad promedio de producción de hidrógeno (ml/hr), para la producción de hidrógeno de la bacteria silvestre (izquierda), y la modificada (derecha). Los reactores fueron colocados a una distancia de 50 cm de la fuente de iluminación. La velocidad máxima alcanzada es mayor con la bacteria silvestre, aunque la velocidad promedio es mayor con la bacteria modificada.

Tabla 15. Resultados de velocidad de producción, producción total y rendimiento de conversión de sustrato para las pruebas de producción de hidrógeno con luz de filamento de tungsteno y un deflector de luz. La bacteria modificada IR3 muestra un mejor desempeño con respecto a la bacteria silvestre B10.

VARIABLES DE CONTROL	B10	IR3	B10	IR3	B10	IR3
Intensidad Luminosa (lux)	2500	2500	5000	5000	17,000	17,000
Distancia a la fuente de luz (cm)	50	50	26	26	10	10
Temperatura	35	35	38	38	45	45
VARIABLES DE RESPUESTA	B10	IR3	B10	IR3	B10	IR3
Velocidad Máxima de producción de H₂ (ml/hr)	5.79	5.40	6.90	6.51	0.00	6.67
Volumen Total producido (ml)	302	419	135	246	0	128
Velocidad promedio de producción de H₂ (ml/hr)	1.60	2.27	1.40	2.29	0.00	2.82
Rendimiento de conversión de sustrato	30.1	41.7	13.4	24.5	0.0	12.7

4.2.2 Producción de Hidrógeno e Intensidad Luminosa

En cuanto a la influencia de la intensidad luminosa, o bien la distancia de los reactores respecto a la fuente de luz, el volumen mayor de hidrógeno fue obtenido a la mayor distancia utilizada en este estudio. La *figura 46* muestra la evolución del volumen de hidrógeno con respecto al tiempo para la bacteria *R. Capsulatus* tipo IR3, a tres distancias de ubicación del reactor.

A pesar de que la pendiente de la curva correspondiente a la distancia mínima (10 cm), mostro ser la más grande (*tabla 15*), la duración de esta etapa de producción rápida fue mucho más corta y por ende, la velocidad media de producción fue menor respecto a las distancias de ubicación mayores.

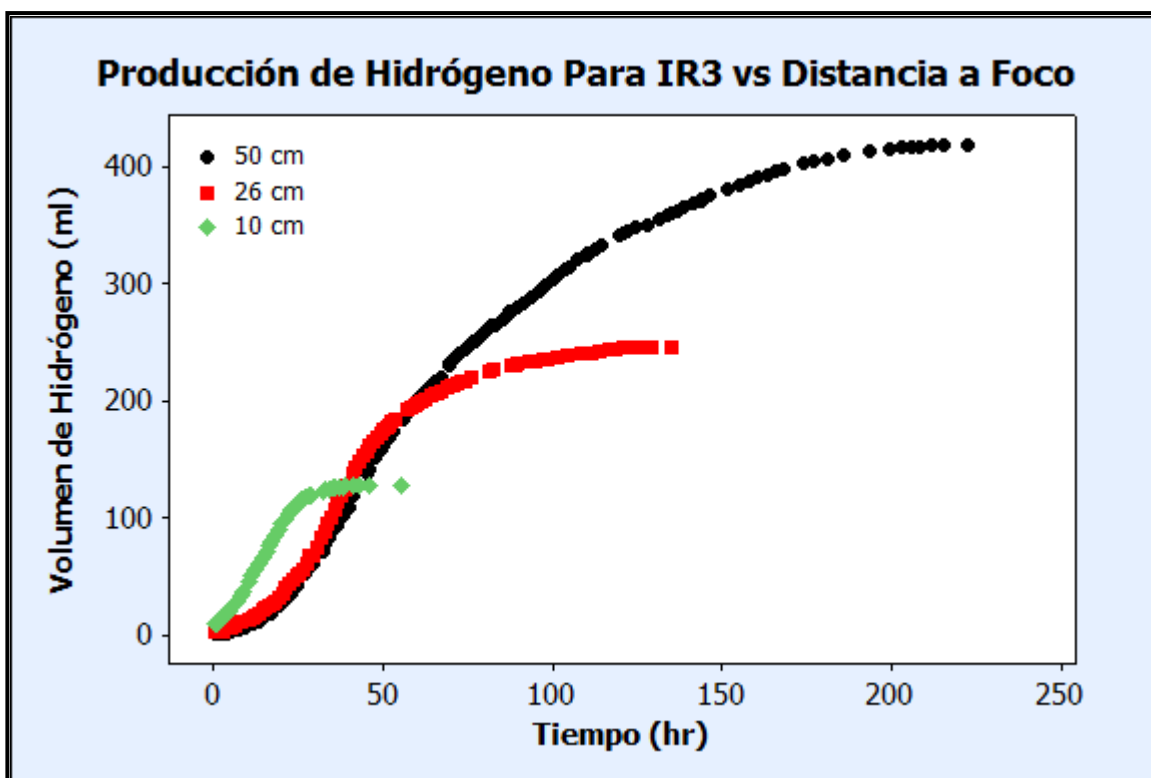


Figura 46. Grafica de volumen de hidrógeno producido por la bacteria modificada (IR3), en función del tiempo y de la distancia con respecto a la fuente de iluminación (lámpara de filamento de tungsteno de 75 W con deflector).

Además, el promedio del rendimiento de conversión se incrementa con la distancia de los reactores respecto a la fuente de luz (*figura 47*). Estos resultados establecen que la intensidad de la luz recibida es un factor importante en la capacidad de conversión de lactato a hidrógeno de la bacteria *R. Capsulatus* tipos B10 e IR3. Asimismo, los datos sugieren la presencia de procesos inhibitorios en la conversión a hidrógeno, cuando la intensidad luminosa alcanza un límite, y que es posible encontrar un punto máximo de conversión antes de alcanzarlo.

Sin embargo, los resultados de la velocidad de producción en función de la distancia indican para ambos tipos de bacteria, que la velocidad disminuye con la distancia (*figura 48*), aunque de forma distinta. Para la bacteria modificada, las velocidades promedio de producción calculadas para las distancias de 26 y 50 cm (2.29 y 2.27 ml/hr), son similares, mientras que a la distancia de 10 cm, una velocidad de producción de 2.82 ml/hr fue obtenida.

Estos resultados también respaldan el hecho de que una mayor intensidad luminosa puede promover una mayor producción de hidrógeno al inicio, pero inhibe a la misma en el corto plazo, por lo cual una disminución posterior de la intensidad de la luz podría evitar el fenómeno de saturación. Por otro lado, el fenómeno de saturación podría ser reducido mediante una agitación constante, ya que mientras las capas de bacteria más cercanas a la luz reciben una intensidad alta, lo cual las conduciría a una saturación rápida; las capas interiores recibirían una intensidad menor, evitando así la saturación.

En el caso de la bacteria B10, a una distancia de 10 cm no hubo producción de biogás. Un factor que interactúa con la intensidad luminosa es la temperatura del reactor, ya que a una distancia de 10 cm, la temperatura de los reactores fue de 42 a 45 °C. A esta temperatura, solo la bacteria modificada pudo alcanzar la etapa estacionaria de crecimiento, para continuar con la producción de biogás.

Estos resultados indican que es necesario realizar experimentos para conocer la influencia de la intensidad luminosa y la temperatura, de forma simultánea.

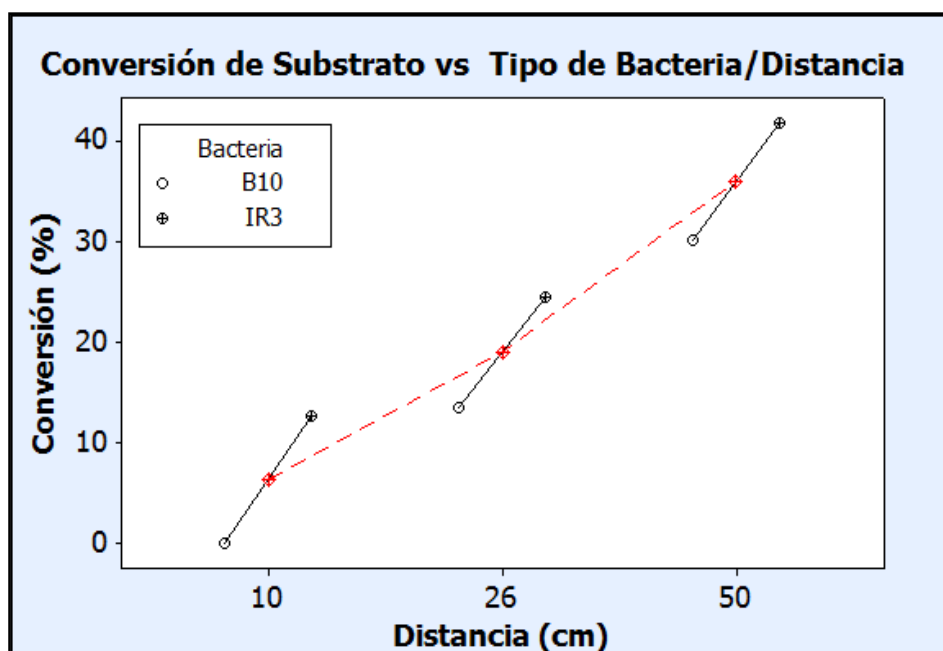


Figura 47. Datos promedio de conversión de sustrato en hidrógeno, en función del tipo de bacteria y de la distancia de ubicación del reactor respecto a la fuente de luz.

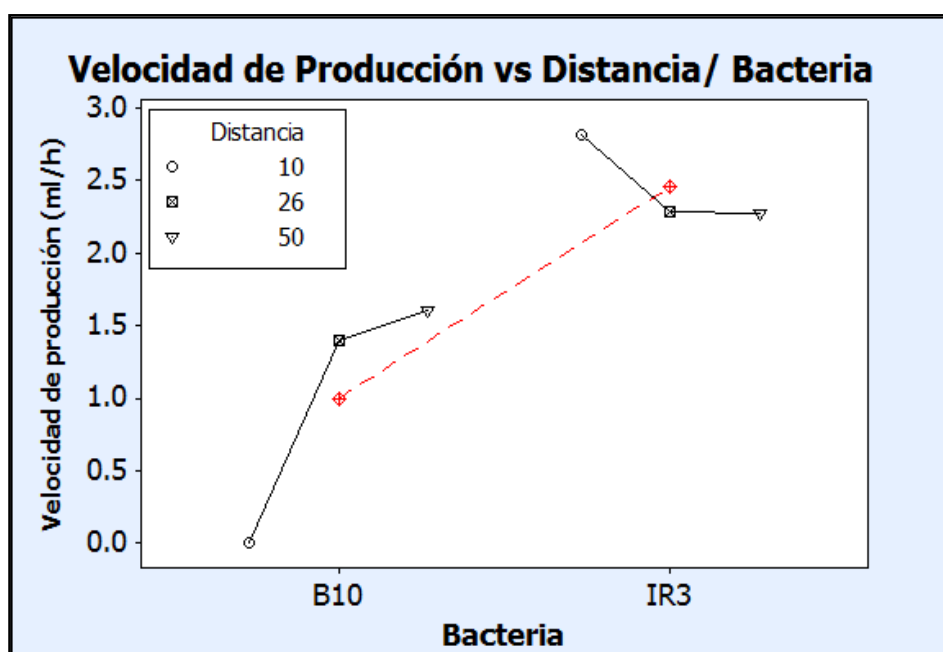


Figura 48. Datos promedio de velocidad de producción de hidrógeno, en función de la distancia de ubicación del reactor respecto a la fuente de luz y del tipo de bacteria.

Experimentos de producción de hidrógeno realizados con un reactor plano, con una fuente luminosa compuesta por dos lámparas de filamento de tungsteno de 75 W cada una, con una intensidad luminosa de 5000 luxes, a una distancia de 16 cm del reactor; fueron realizados con el propósito de comparar la producción a una intensidad luminosa equivalente a la intensidad luminosa lograda por una lámpara de filamento de tungsteno con deflector, colocada a 26 cm de la ubicación del reactor.

Los resultados (*figura 49*), indican que la pendiente de evolución rápida de hidrógeno, en la grafica de volumen en función del tiempo; es muy similar para ambos experimentos. Además, el volumen total generado es de 246 ml para el experimento de lámpara con deflector, y de 250 ml para el caso del experimento con dos lámparas sin deflector.

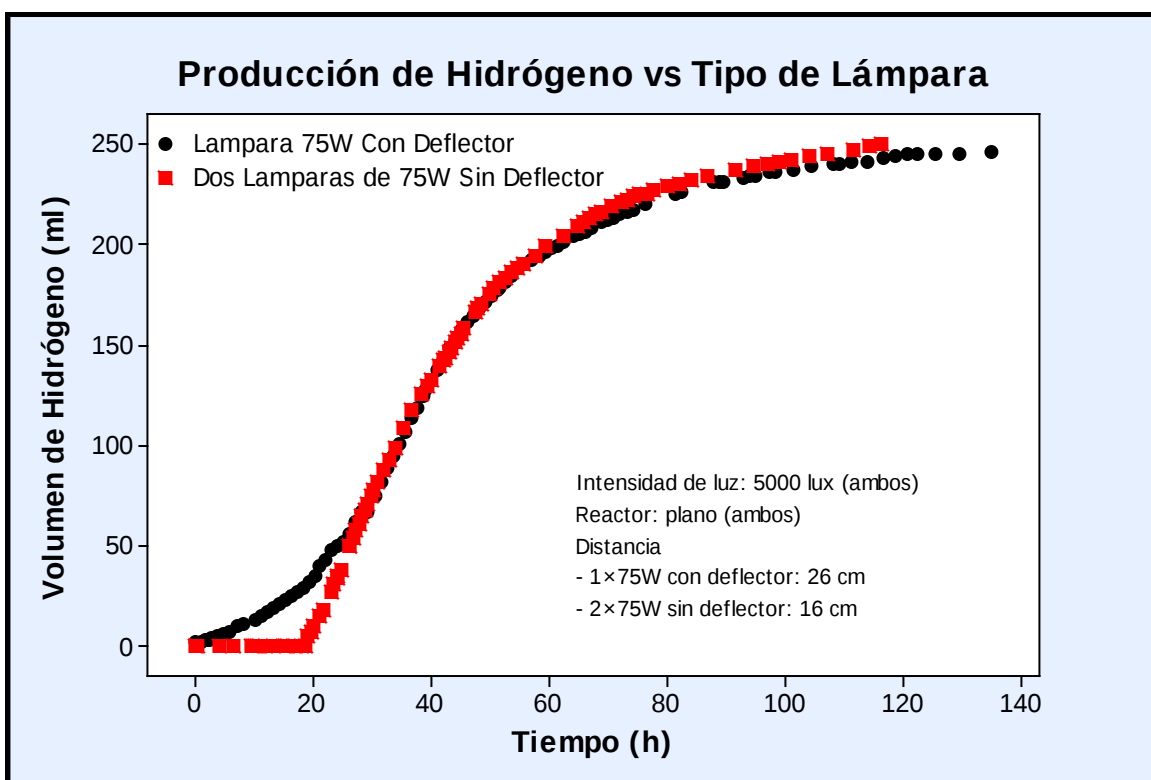


Figura 49. Grafica de volumen de hidrógeno generado por la bacteria IR3 en función del tiempo, realizada con el mismo tipo de reactor, con la misma intensidad luminosa, pero con diferente configuración de lámparas de filamento de tungsteno.

Estos resultados muestran que es posible obtener resultados de producción de hidrógeno equivalentes, a intensidades luminosas equivalentes. En la *figura 49* es posible observar un retraso en el inicio de la producción del segundo experimento, seguido por un incremento subido en la velocidad de producción de hidrógeno. Esto es debido al retraso en el registro manual de datos en el segundo experimento.

4.2.3 Producción de Hidrógeno con Filtros de Luz

Los resultados de producción de hidrógeno en función del tiempo para las pruebas realizadas a una intensidad de 5000 lux, con la bacteria tipo IR3, utilizando filtros de luz; son mostrados en la *figura 50*. El reactor con el filtro de color azul no produjo biogás. El volumen de hidrógeno y el rendimiento de conversión mayores fueron encontrados en el reactor sin filtro de luz (*tabla 16*). El reactor sin filtro también mostro la velocidad de producción de luz más alta. Por otro lado, el reactor con el filtro de color rojo resulto con una mayor producción de hidrógeno que el reactor con el filtro verde.

Tabla 16. Resultados de velocidad de producción, producción total y rendimiento de conversión de sustrato para las pruebas de producción de hidrógeno con luz de filamento de tungsteno sin deflector de luz. Las pruebas fueron realizadas aplicando filtros de colores a la superficie de los reactores y solo con la bacteria modificada IR3. El reactor sin filtro mostró un mejor desempeño.

<i>Color de Filtro</i>	Sin Filtro	Rojo	Verde	Azul
<i>Bacteria Tipo</i>	IR3	IR3	IR3	IR3
<i>Geometria</i>	plano	plano	plano	plano
<i>Volumen de Reactor (ml)</i>	245 ml	245 ml	245 ml	245 ml
<i>Intensidad Luminosa (Lux)</i>	5000	5000	5000	5000
<i>Tiempo total (h)</i>	116.2	100.9	77.5	0
<i>Volumen Total producido (ml)</i>	250.0	178.6	132.2	0
<i>Velocidad promedio de produccion de H2 (ml/hr)</i>	2.971	2.210	1.860	0
<i>Rendimiento de conversion de sustrato</i>	26.40	18.86	13.96	0.000

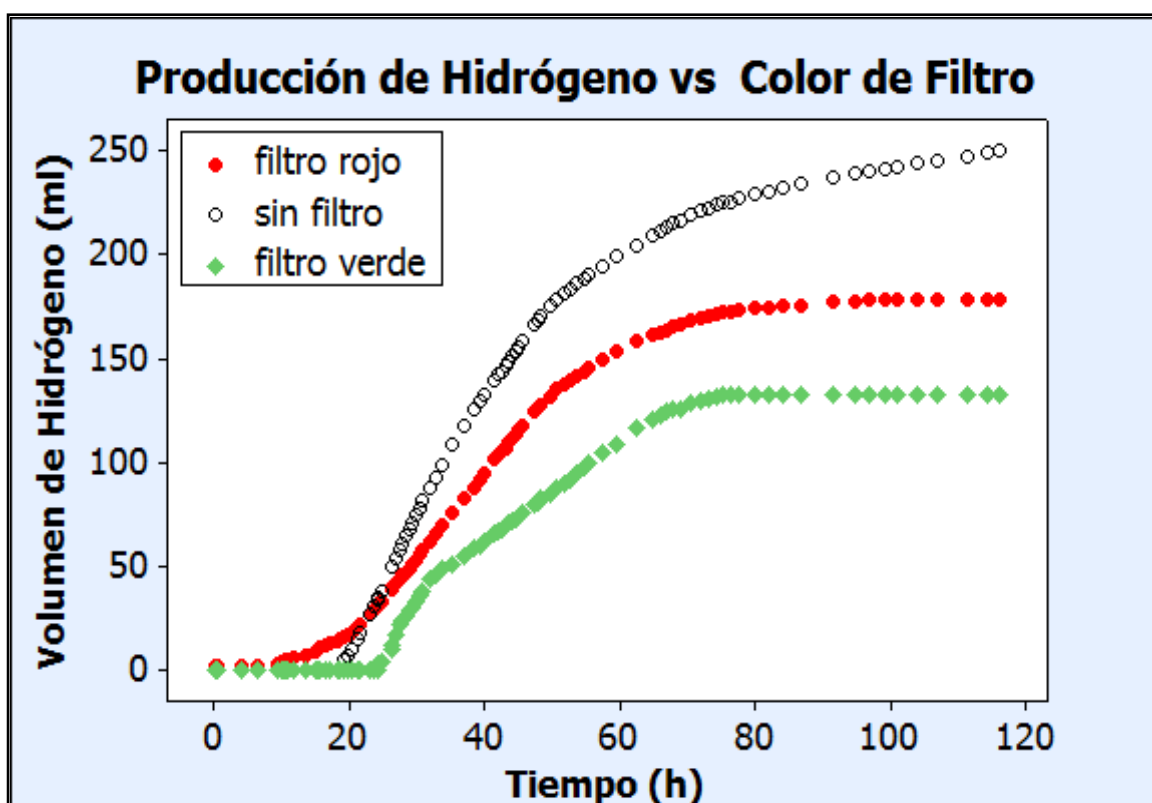


Figura 50. Producción comparativa de hidrógeno cuando se aplica un filtro de color a la superficie del reactor, con la bacteria IR3. El reactor sin filtro muestra un mejor desempeño.

Es necesario medir la intensidad luminosa que atraviesa el papel celofán, en función de la longitud de onda; ya que es posible que la menor producción de hidrógeno en los reactores con filtro sea el resultado de una mera disminución en la intensidad luminosa.

Los resultados de producción de hidrógeno del reactor sin filtro, son consistentes con los resultados obtenidos en experimentos previos con lámpara de tungsteno utilizando deflector de luz, lo cual sugiere que a condiciones iguales de intensidad luminosa, las bacterias muestran la misma capacidad productora de hidrógeno, aun cuando la distancia del reactor a la fuente de luz fue mayor para el caso de la lámpara con deflector (figura 49).

4.2.4 Producción de Hidrógeno en Función de la Geometría del Reactor

Finalmente, las graficas de producción de hidrógeno en función del tiempo de las pruebas realizadas con dos diferentes geometrías de reactor, con una lámpara de filamento de tungsteno, a una distancia de 50 cm, solo con la bacteria modificada, son mostrados en la *figura 51*. El mayor volumen de hidrógeno fue generado en el reactor plano (419 ml vs 344 ml generados en el reactor cilíndrico). La velocidad promedio de producción fue de 2.27 ml/hr para el reactor semiplano vs 1.9 ml/hr para el reactor cilíndrico. Finalmente, el rendimiento de conversión de sustrato fue de 41.7% para el reactor semiplano, y 31.2% para el cilíndrico (*tabla 17*).

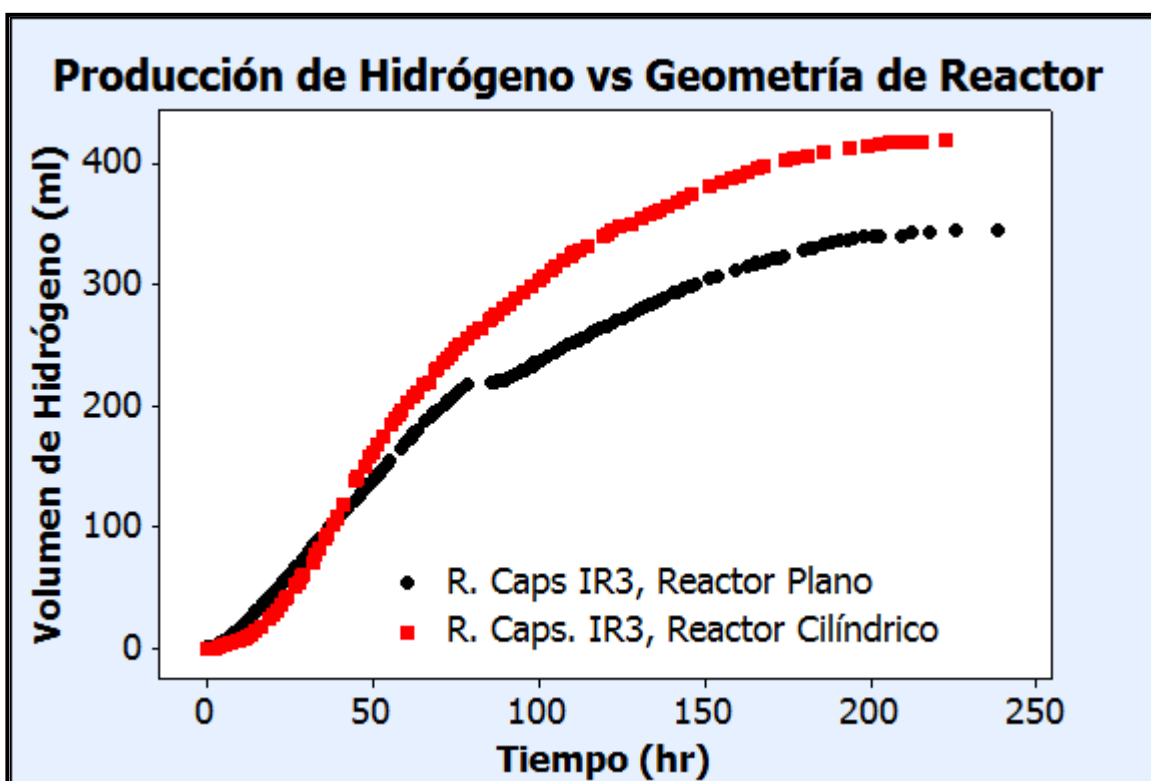


Figura 51. Producción de hidrógeno comparativa para experimentos con la bacteria IR3, con una lámpara con filamento de tungsteno de 75W con deflector; variando la geometría del reactor. La geometría plana (rojo), muestra un mejor desempeño que la geometría cilíndrica.

Estos resultados sugieren que la relación de área superficial a volumen, tiene un efecto en la producción de hidrógeno en las condiciones experimentales. Un cociente superficie/volumen mayor permitiría por lo tanto una exposición a la luz a un número mayor de microorganismos.

Tabla 17. Resultados de la producción fotosintética de hidrógeno con la bacteria *R. Capsulatus* tipo IR3, con dos diferentes geometrías de reactor.

Bacteria	IR3	
Geometría	Cilindrico	Plano
Volumen Total producido (ml)	344.2	419
Velocidad promedio de producción de H ₂ (ml/hr)	1.895	2.265
Rendimiento de conversión de sustrato	31.26	41.72

4.3 Producción de Hidrógeno con Luz Solar

4.3.1 Generación de Hidrógeno Solar con *R. Capsulatus* B10/IR3

Reactores planos fueron inoculados con la bacteria *R. Capsulatus* tipos B10 e IR3. Fueron colocados en el exterior, expuestos a la luz solar. Después de la puesta de sol, los reactores fueron llevados a la incubadora con iluminación de dos lámparas de tungsteno de 75 W cada una.

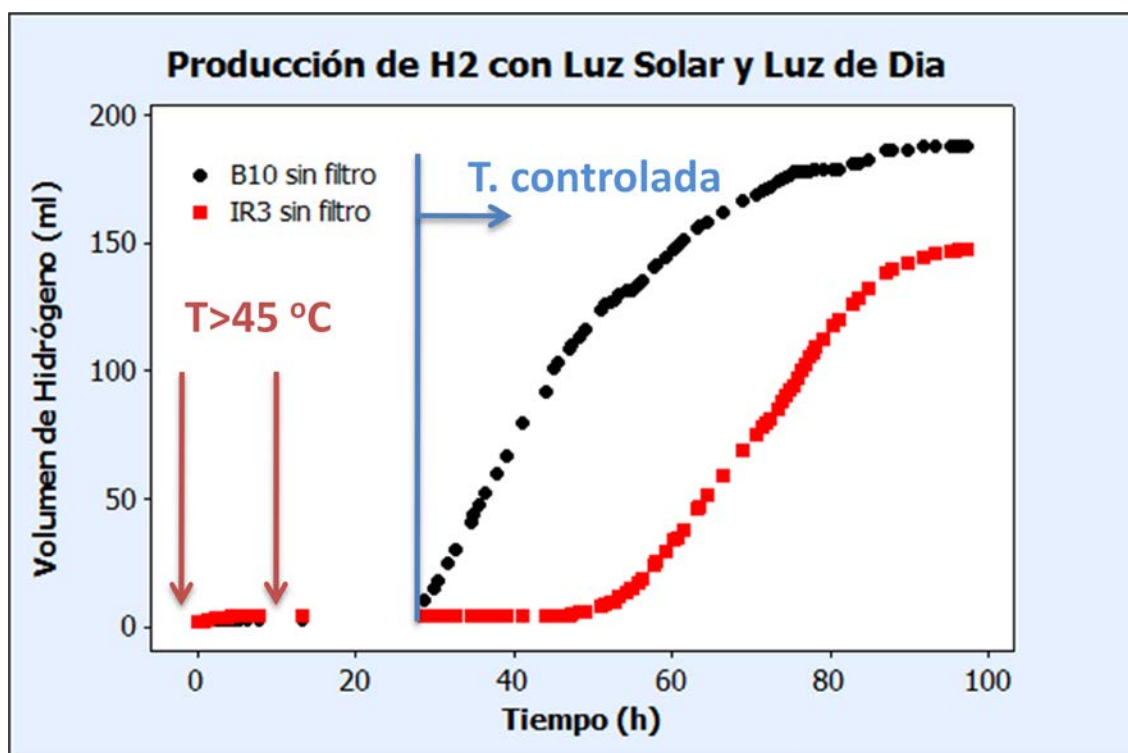


Figura 52. Gráfica de evolución de hidrógeno con respecto al tiempo, en reactores planos con las bacterias tipo B10 e IR3, utilizando iluminación solar de día, e iluminación de lámpara durante la noche.

Durante la primera etapa de luz solar (12 horas aproximadamente), los reactores no fueron sometidos a control termico, de forma tal que la temperatura alcanzo los 45-55°C. Durante este tiempo, y un periodo subsecuente de aproximadamente 12 horas, ninguna de los reactores habia mostrado el color/turbidez caracteristicos del crecimiento bacteriano. Despues de los periodos de inactividad mencionados, el reactor con la bacteria tipo silvestre comenzo a mostrar crecimiento

bacteriano, así como producción de hidrógeno. El reactor con la bacteria tipo IR3 no mostró crecimiento bacteriano, sino hasta 20 horas después del inicio de la producción del tipo B10.

Este comportamiento puede ser atribuido al hecho de que en primer lugar, la exposición a temperaturas altas afectó la viabilidad de las bacterias, las cuales entraron en un periodo de latencia en el que no existió reproducción, y en el que la población bacteriana pudo haber sufrido una severa reducción.

Sin embargo, el tipo IR3 mostró una mayor sensibilidad a la exposición al rango de temperatura mencionado, de tal forma que la reducción de la población bacteriana fue mayor que para la bacteria tipo silvestre. Durante el estudio de las curvas de crecimiento, la bacteria tipo modificada mostró una menor población bacteriana en el momento de alcanzar la etapa estacionaria; lo cual significa que el inóculo para el reactor también contiene una menor población con respecto a la bacteria B10.

Por otro lado, el volumen total de hidrógeno generado fue mayor para la bacteria silvestre (*tabla 18*). La diferencia en el volumen total producido es de 40.2 ml de hidrógeno. Los resultados obtenidos durante todos los experimentos previos con luz de lámpara mostraron una mayor producción de hidrógeno por parte de la bacteria modificada, con diferencias de 110 a 120 ml de hidrógeno.

Tabla 18. Volumen total de hidrógeno generado y rendimiento de conversión de sustrato en hidrógeno durante los experimentos con ciclos de luz solar/lámpara de filamento de tungsteno.

	B10	IR3
<i>Rendimiento de Conversión</i>	19.8	15.6
<i>Volumen Total</i>	187.7	147.5

La mayor producción de hidrógeno y rendimiento de conversión de sustrato de la bacteria silvestre apoya la hipótesis de que una porción del sustrato fue utilizado por la bacteria modificada para reproducirse y llegar a la etapa estacionaria; después de haber sido sometida a temperatura alta.

4.3.2 Efecto del Régimen de Iluminación

Debido a que las curvas de producción de hidrógeno (*figura 52*), muestran varios cambios en la pendiente, un análisis seccionado de las curvas fue realizado. El primero de ellos fue hecho tomando la fuente de iluminación (sol/foco), como variable de desagregación. En la *figura 53* se muestran las curvas de producción de hidrógeno para cada tipo de bacteria, separadas por periodos de iluminación luz solar/foco. Tres periodos dobles fueron analizados en total.

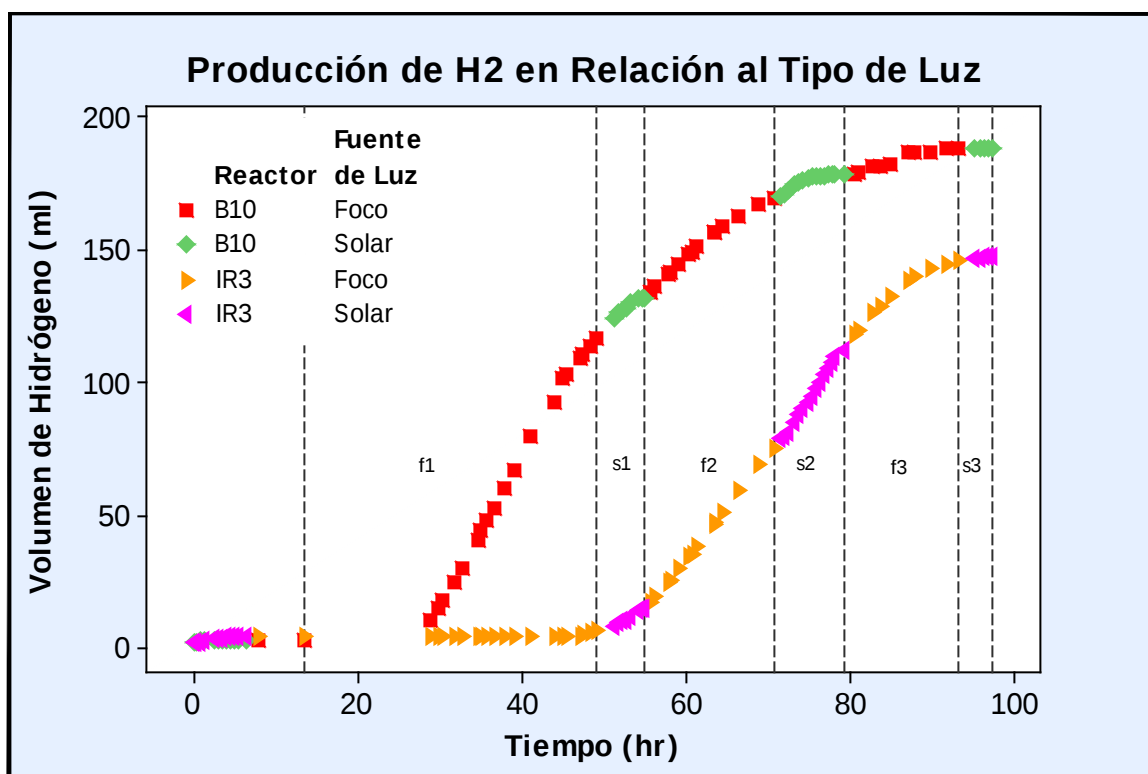


Figura 53. Gráfica de volumen de hidrógeno en función del tiempo para experimentos con ciclos de luz solar/foco en reactores planos, mostrando la separación de los datos en función de la fuente de luz. Las letras 'f' y 's' se refieren a 'foco' y 'solar' respectivamente.

El periodo f1 es el más extenso, ya que después del periodo de exposición a temperaturas por encima de 45 °C, fue necesario exponer los reactores a condiciones controladas de iluminación y temperatura con el objetivo de estimular el crecimiento de las bacterias sobrevivientes a dicho ciclo. Este periodo es el de mayor producción de hidrógeno para la bacteria silvestre, aunque la pendiente de la línea cambio de forma importante cuando el reactor fue expuesto a la luz solar.

Aun cuando los cambios en la velocidad de producción fueron detectados en ambos tipos de bacteria, fue en el caso del tipo B10 en donde los cambios fueron mayores, lo cual resulto en una curva irregular.

El análisis de la velocidad de producción de hidrógeno en función del tipo de iluminación para cada uno de los periodos, es mostrado en la *tabla 19* y en la *figura 54*.

Para el caso de la bacteria silvestre, la velocidad de producción de hidrógeno entre periodos fue decreciente. En el primer periodo, la bacteria B10 mostro la máxima velocidad de hidrógeno tanto con luz solar (2.9 ml/hr) como con foco (3.2 ml/hr) y la diferencia entre ambas velocidades fue pequeña. Durante el segundo periodo, las velocidades decrecieron a 2.4 ml/hr para foco y 1.1 ml/hr para solar, mostrando una diferencia mayor entre ambas. En el último periodo la velocidad de producción con foco cayó hasta 0.7 ml/hr, pero ya no hubo producción con luz solar.

En contraste, la velocidad de producción de hidrógeno con la bacteria modificada fue creciente al inicio, y después de alcanzar un punto máximo, esta disminuyo. El punto máximo fue alcanzado en el segundo periodo, con velocidades para iluminación con foco (4.0 ml/hr) y con sol (4.4 ml/hr).

Tabla 19. Datos comparativos de velocidad de producción fotosintética de hidrógeno entre las bacterias *R. Capsulatus* tipos B10 e IR3, en función de los periodos alternados de luz solar/foco.

<i>periodo</i>	B10			IR3		
	<i>Vol. (ml)</i>	<i>t (hr)</i>	<i>Vel. (ml/hr)</i>	<i>Vol. (ml)</i>	<i>t (hr)</i>	<i>Vel. (ml/hr)</i>
<i>foco 1</i>	113.6	35.8	3.2	2.1	3.6	0.6
<i>foco 2</i>	35.4	15.1	2.4	60.2	15.1	4.0
<i>foco 3</i>	9.3	12.7	0.7	33.6	12.7	2.6
<i>solar 1</i>	17.2	5.8	2.9	9	5.8	1.5
<i>solar 2</i>	9.4	8.4	1.1	36.9	8.4	4.4
<i>solar 3</i>	0	4.2	0.0	1.7	4.2	0.4

De acuerdo a estos datos, la velocidad máxima alcanzada durante todo el experimento correspondió a la bacteria tipo IR3 con iluminación solar, lo cual muestra que es posible la generación de hidrógeno fotosintético con luz solar con velocidades comparables a las obtenidas con luz de lámparas en condiciones de laboratorio.

4.3.3 Interacción Fuente de Iluminación-Tipo de Bacteria

Adicionalmente, la *figura 54* muestra los datos promedio de velocidades para cada periodo por tipo de bacteria. El perfil decreciente de la bacteria B10 contrasta con el perfil de campana de la bacteria IR3. El promedio general de velocidad es mayor para la bacteria IR3. También es posible observar que en promedio, las velocidades de producción para esta bacteria son similares en la etapa 1 y en la etapa 3, al inicio y al final de la producción.

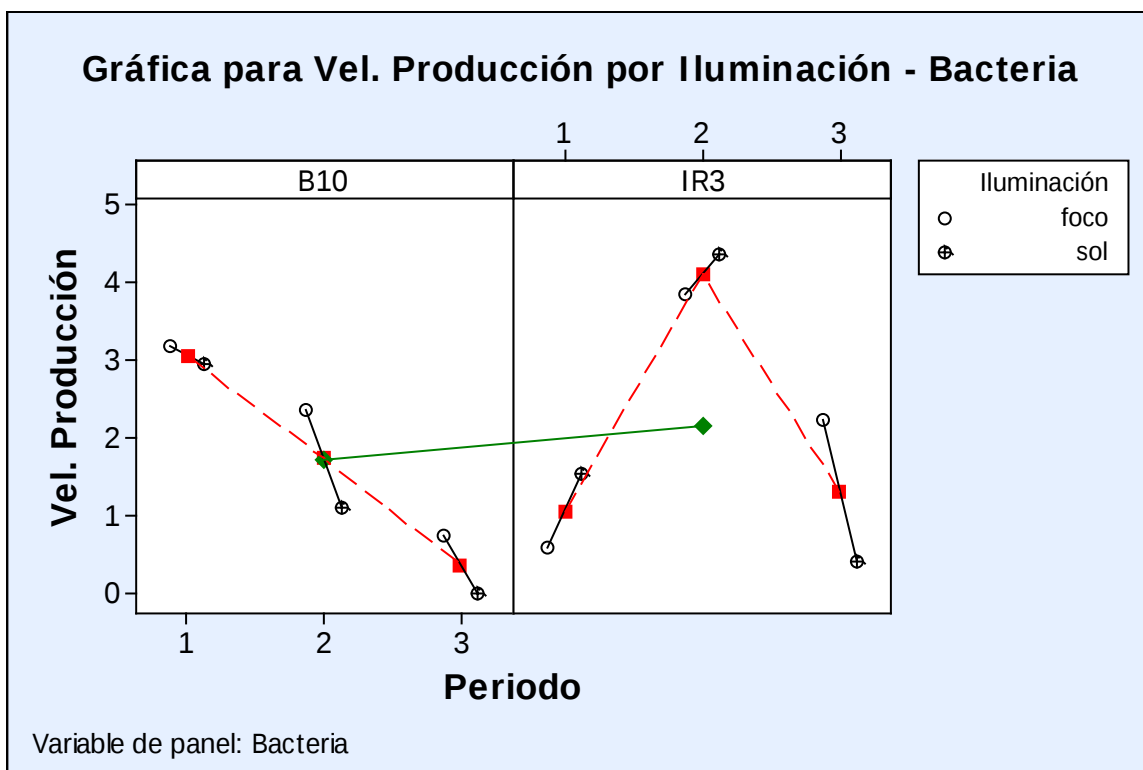


Figura 54. Gráfica multivariable de la velocidad de producción de hidrógeno con ciclos luz solar/foco para bacterias B10 e IR3, durante diferentes periodos de producción. Los puntos cuadrados indican promedios de velocidad foco/sol para cada periodo, mientras los puntos romboides indican el promedio de velocidad de producción de hidrógeno de los tres periodos, para cada bacteria.

La relación entre el tipo de bacteria y la fuente de iluminación esta mostrada en la *figura 55*. Los resultados obtenidos muestran una fuerte interacción entre el tipo de bacteria y la fuente de iluminación para el tipo B10, la cual está dada por la pendiente de la línea correspondiente a esta bacteria. En contraste, la pendiente de la línea correspondiente a la bacteria IR3 es pequeña. Esto significa que la diferencia entre las velocidades promedio de producción de hidrógeno con luz solar y luz de lámpara es pequeña.

Por otro lado, las velocidades promedio indican que efectivamente la bacteria modificada mostro las mayores velocidades de generación de hidrógeno, con ambos tipos de iluminación. La diferencia de velocidades de producción entre bacterias es especialmente

grande cuando los reactores son iluminados con luz solar, de 2.1 ml/hr para la bacteria IR3 contra 1.35 ml/hr para la bacteria B10.

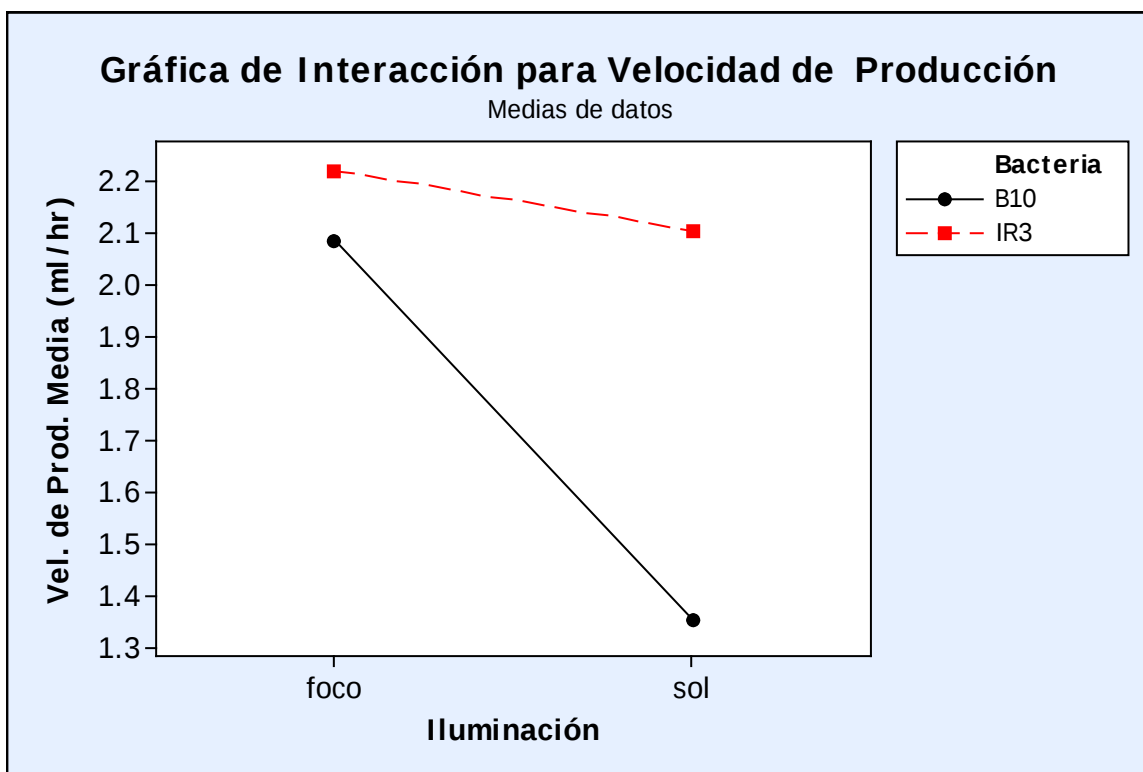


Figura 55. Gráfica de interacción entre el tipo de bacteria y la fuente de iluminación, con respecto a la velocidad de producción de hidrógeno fotosintético. Todos los puntos indican datos promedios para cada conjunto de condiciones.

4.3.4 Efecto de la Temperatura

Los mismos datos obtenidos durante la producción de hidrógeno con ciclos de luz solar/foco fueron utilizados para observar el efecto de la temperatura. Por lo tanto, fue utilizado como criterio de desagregación el intervalo de temperatura al cual fue llevado a cabo el experimento (*figura 56*). Tres diferentes intervalos de temperatura fueron estudiados, el primero de 30 a 35 °C, el segundo de 36 a 40 °C y el último de 41 °C en adelante. La *figura 56* muestra que en la curva correspondiente a la bacteria IR3, los cambios en la temperatura no están asociados a cambios apreciables de pendiente. Por ejemplo, en el cambio del periodo f1 a s1, un cambio de intervalo de temperatura tuvo lugar, al mismo tiempo que un cambio de pendiente en la curva. Sin embargo, la

pendiente de la misma ya había cambiado antes del cambio de temperatura. Por otro lado, este cambio de pendiente ascendente, fue común en los experimentos previos realizados a diferentes intensidades luminosas, geometrías y filtros.

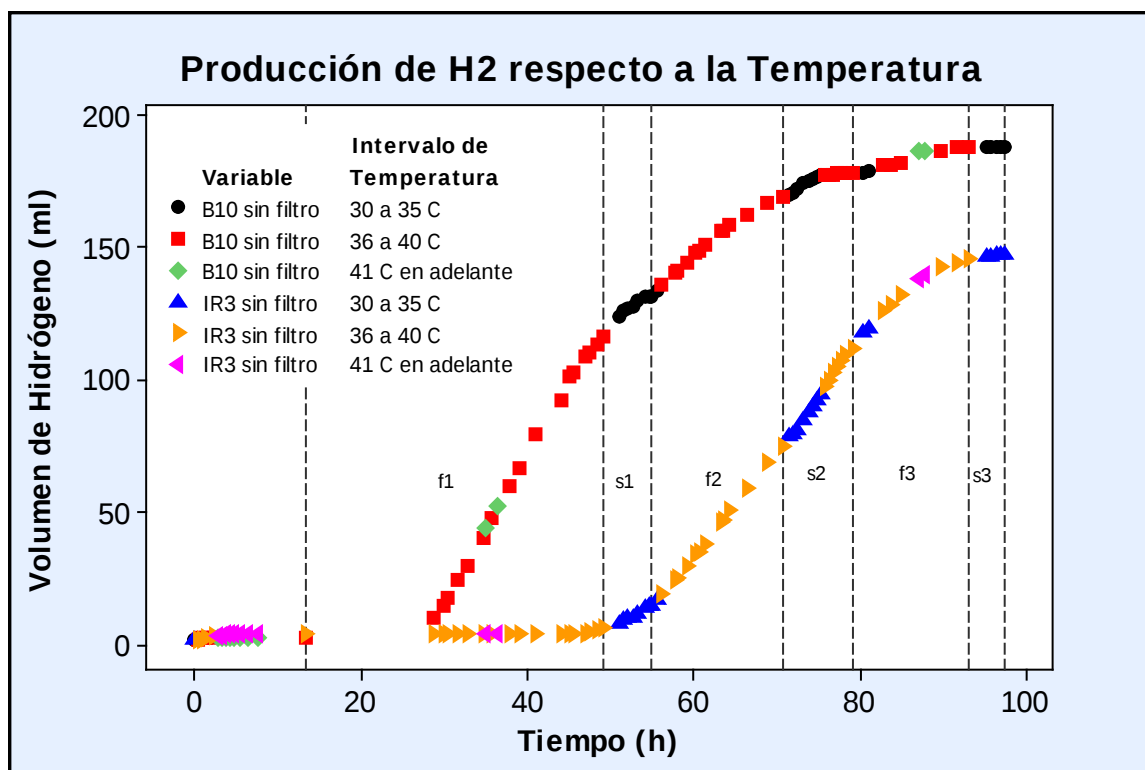


Figura 56. Gráfica de producción de hidrógeno con ciclos de luz solar/lámpara en función del tiempo y de la temperatura.

En la misma curva de la bacteria IR3, durante el periodo s2 otro cambio en la temperatura fue realizado. La línea no muestra cambios en la pendiente. Lo mismo sucedió durante el periodo f3.

En el caso de la curva correspondiente a la bacteria B10, esta presenta varios cambios de pendiente, aunque algunos de ellos coinciden tanto con el cambio de temperatura como con el cambio en régimen de iluminación. Sin embargo, en el caso de los periodos s2 y f3 durante los cuales hubo cambios de temperatura con régimen de iluminación constante, estos cambios tuvieron un efecto visible en el cambio de pendiente.

4.4 Producción de Hidrógeno con Suero de Leche

Con el objetivo de sustituir el medio de cultivo descrito en la tabla 12, por un medio de cultivo desarrollado a partir de materiales de desecho; suero de leche de vaca fue recolectado de una granja familiar productora de queso. El suero muestra una capa flotante de grasa, tal como se aprecia en la *figura 57(a)*. Una vez que este sobrenadante fue descartado, el suero fue esterilizado en tubos de vidrio, a una temperatura de 220 °F durante 20 minutos. La aparición de agregados después de la esterilización (*figura 57 (b)*), mostro que era necesario llevar a cabo un proceso de separación de proteína, anterior o posterior a la esterilización.

Los tubos esterilizados fueron inoculados con el tipo de bacteria correspondiente, con el objetivo de observar si este suero tiene la capacidad de proveer los nutrientes necesarios para el crecimiento de las bacterias. La *figura 57(c)* muestra el crecimiento de la bacteria *Rhodobacter Capsulatus* tipos B10 e IR3 en suero de leche esterilizado. Estas bacterias se desarrollaron en una incubadora con una fuente de luz compuesta por dos lámparas de tungsteno de 75 W cada una. Sin embargo, a pesar de haberse desarrollado, la generación de biogás caracterizada por la formación de burbujas en el interior del tubo no fue llevada a cabo.

Estos resultados indican que es posible que el ácido orgánico, en este caso ácido láctico, necesario para la generación de hidrógeno; no está presente en el suero de leche. Esto significa que si la lactosa presente en el suero es convertida en su ácido orgánico correspondiente, entonces la bacteria *R. Capsulatus* será capaz de utilizarlo para generar biohidrógeno. De acuerdo a esta hipótesis, diversas muestras de suero de leche fueron sometidas a procesos de esterilización y filtrado, con el objetivo de eliminar los coágulos. Posteriormente fueron inoculadas con lactobacilos, para promover la conversión de lactosa a ácido láctico durante un proceso de incubación en ausencia de luz.

Otro conjunto de muestras fueron incubadas en oscuridad antes de la esterilización, utilizando como inóculo las bacterias ya presentes en el suero. Ambos conjuntos de muestras fueron finalmente esterilizados e inoculados con *R. Capsulatus* B10 e IR3. Los resultados de estos experimentos son mostrados en la *figura 58*.

Después del proceso de fermentación en oscuridad, las bacterias utilizaron el suero de leche para generar biogás (*figura 58*). Después de la aplicación del electrodo reversible de hidrógeno como sensor de hidrógeno (sección 4.5), fue posible identificar este biogás como hidrógeno.

Estos resultados demuestran que es posible generar hidrógeno fotosintético con productos de desecho tal como el suero de leche.

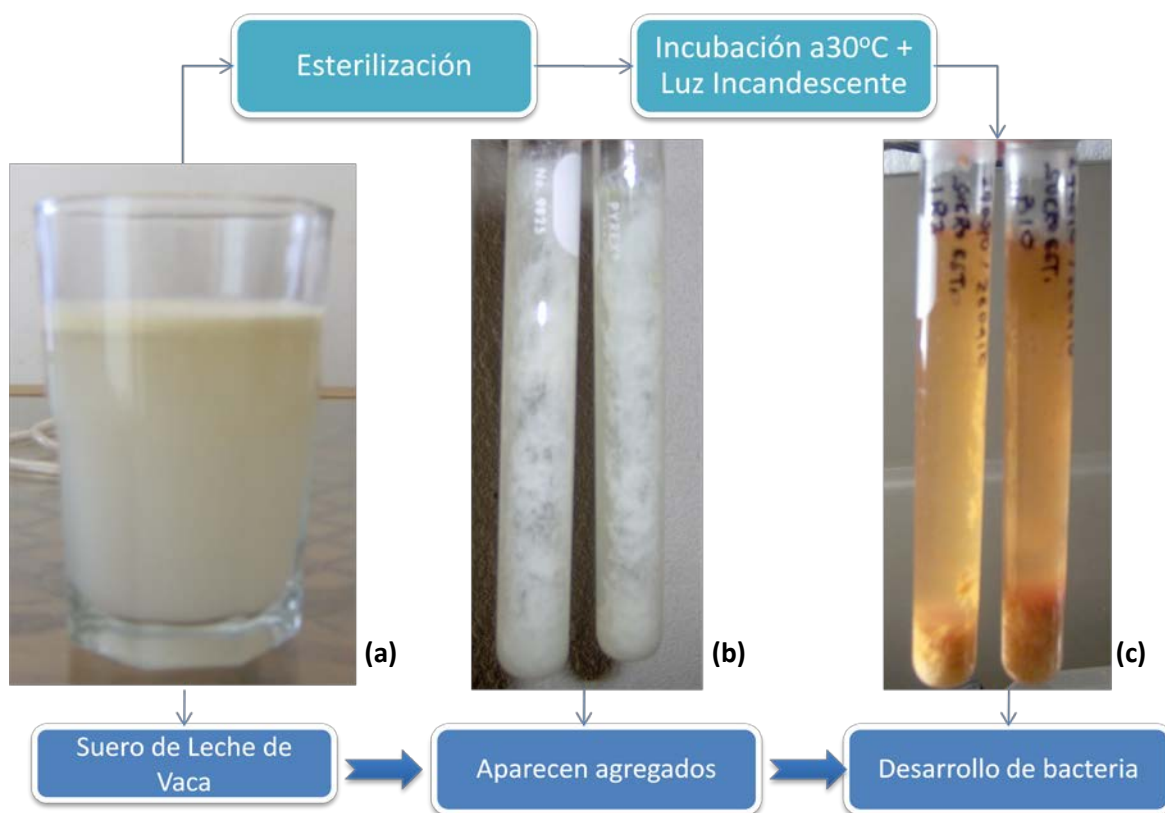


Figura 57. Esquema que muestra el suero de leche utilizado como sustituto del medio de cultivo RCV descrito en la tabla 12. Ambos tipos de bacteria fueron capaces de utilizar el suero de leche esterilizado para desarrollarse.



Figura 58. Muestras de suero de leche inoculadas con bacteria tipo B10 (derecha) e IR3 (izquierda). Las muestras de suero de leche fueron previamente sometidas a un proceso de fermentación oscura con bacterias presentes en el suero. El color rojo desarrollado y las burbujas presentes en la superficie son característicos del desarrollo de la bacteria y la formación de biogás, respectivamente.

4.5 Sensor de Hidrógeno

4.5.1 Calibración del Electrodo Reversible de Hidrógeno (RHE), como Sensor de Hidrógeno

La calibración del electrodo reversible de hidrógeno fue realizada graficando el potencial alcanzado del electrodo en función de $\frac{1}{2}\ln[H_2]$, de acuerdo a la ecuación [b] de la sección 2.4.1. Primero, la solución fue saturada mediante la generación de hidrógeno por 30 minutos. Después, el potencial del RHE, correspondiente a la solución saturada fue medido, y se encontró que fue de -244 mV vs. Ag/AgCl, 3M KCl.

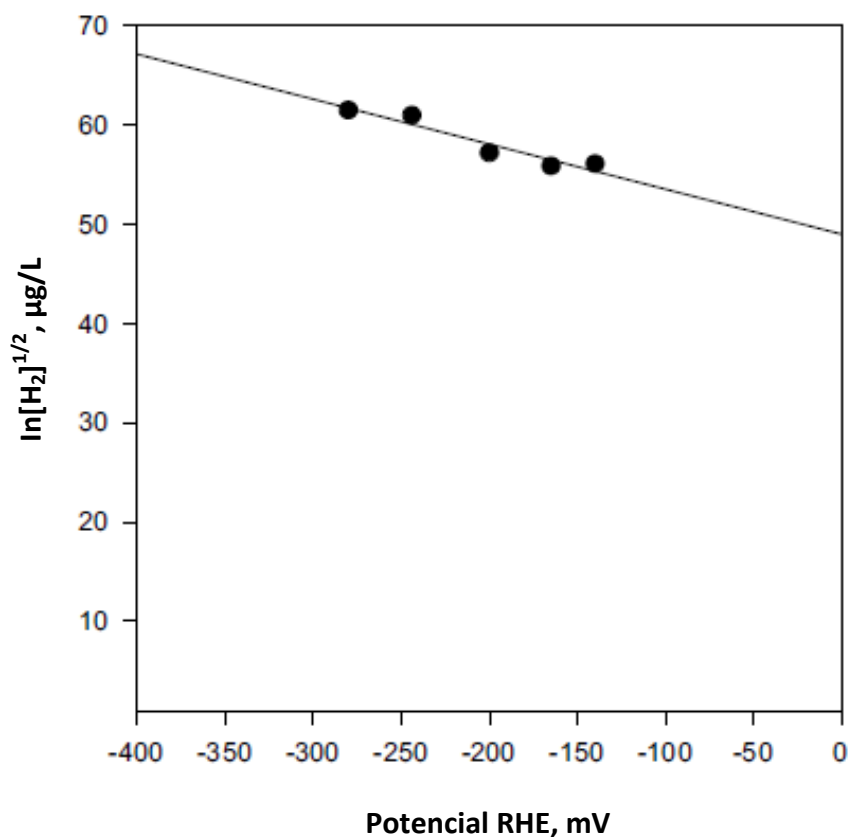


Figura 59. Gráfica de calibración del electrodo reversible de hidrógeno, para el reactor artificial generador de hidrógeno.

El valor de la concentración de hidrógeno en el punto de saturación fue evaluado tomando en cuenta la solubilidad del hidrógeno a 1 bar de presión y 25 °C de temperatura; la cual es de 1.55 mg/l (Penner). También fue tomada en consideración la presión parcial del hidrógeno en el aire (0.00005 bares). De esta forma, se encontró que la concentración de hidrógeno en la saturación fue de 61 g/l.

Ya que cuando la concentración de hidrógeno es igual a cero, el potencial tiende a ser infinito de acuerdo a la ecuación [b], con la finalidad de obtener los diferentes valores para la concentración de hidrógeno disuelto y usarlos para construir la curva de calibración con las coordenadas $\frac{1}{2} \ln[H_2]$ vs potencial RHE potencial; dos métodos independientes pueden ser aplicados:

1. El cambio de la temperatura de 20 a 40 °C, con incrementos de 5°C, resulta en cambios en la solubilidad del hidrógeno, y por tanto; en cambios en las concentraciones de equilibrio del mismo. Los valores correspondientes del potencial del electrodo reversible de hidrógeno después de la corrección por la temperatura, de acuerdo al termino (RT/nF) de la ecuación de Nernst, debe ser graficado en función del término $(\frac{1}{2} \ln[H_2])$.
2. La aplicación de pulsos cortos de voltaje consecutivos, en el electrodo de anillo de platino generador de hidrógeno; obteniendo así incrementos en escalón de la concentración de hidrógeno disuelto. Esta evaluación puede ser realizada calculando la cantidad de electricidad consumida durante el pulso, mediante la Ley de Faraday.

En el segundo método, es muy importante la precisión de la duración de los pulsos y de la duración del intervalo entre ellos. Una medición inadecuada tanto del pulso como del intervalo, provocan que la concentración de hidrógeno sea incrementada de forma no lineal. Los pulsos más cortos proveen mejor linealidad que los pulsos largos, aunque el

rango de concentraciones de hidrógeno que pueden ser medidas es pequeño. Debido a estas dificultades, el primer método fue el elegido.

La curva de calibración en coordenadas $\frac{1}{2} \ln[H_2]$ vs potencial RHE, construida mediante la aplicación del primer método es presentada en la *figura 59*.

4.5.2 Aplicación del RHE para la Determinación de Parámetros Cinéticos de la Generación de Hidrógeno con Bacterias

El monitoreo del potencial del electrodo reversible de hidrógeno provee datos que pueden ser fácilmente convertidos en volumen de hidrógeno generado bacteriológicamente, mediante el uso de la curva de calibración mostrada en la *figura 59*; y por lo tanto la velocidad de proceso puede ser calculada.

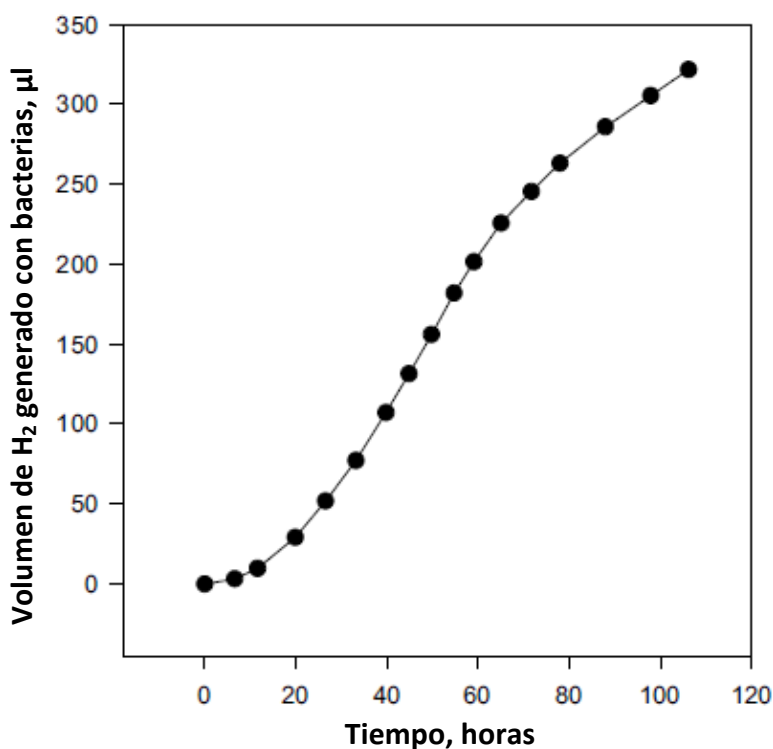


Figura 60. Volumen generado de hidrógeno en función del tiempo. Los datos de volumen fueron calculados con la ayuda de la curva de calibración, así como de los datos de potencial RHE, registrados durante la operación de un reactor de 10 ml, con la bacteria *Rhodobacter Capsulatus* tipo IR3, en un medio de cultivo RCV.

Una grafica con los ejes volumen de hidrógeno vs tiempo, obtenida a partir de los datos registrados de potencial RHE, en un reactor de 10 ml, es presentada en la *figura 60*.

La medición precisa de volúmenes tan pequeños, en el orden de los microlitros, hacen prácticamente imposible la construcción de esta curva utilizando métodos de medición de volumen tradicionales. Es precisamente por ello que la aplicación del RHE parece ser la herramienta indicada para la optimización de las condiciones del proceso de generación de hidrógeno bacteriano.

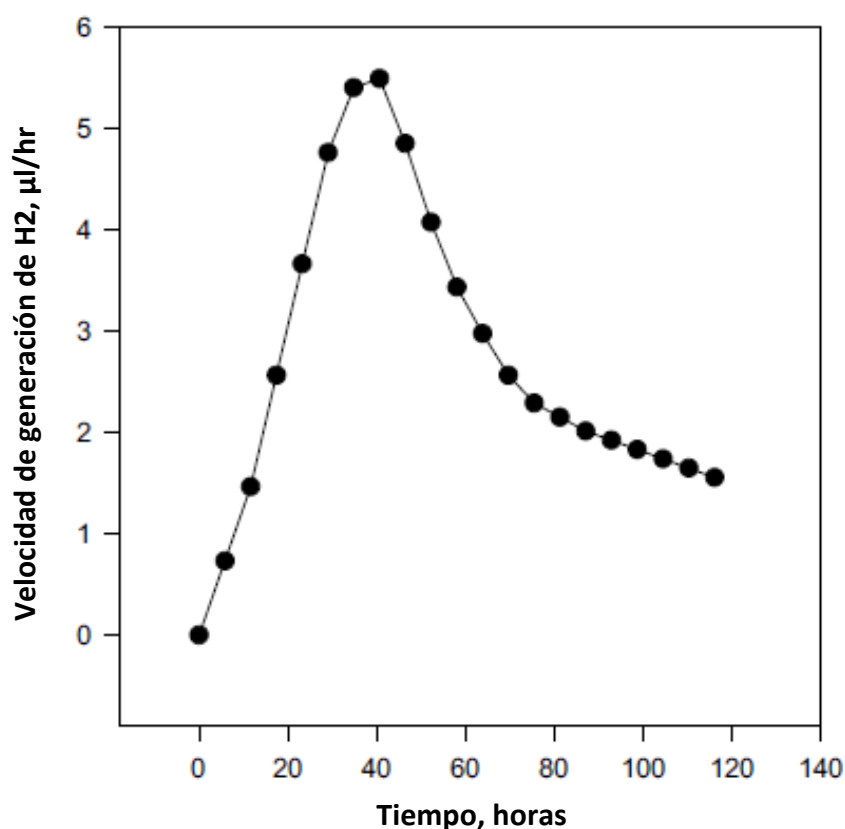


Figura 61. Curva de cinética de generación de hidrógeno, desarrollada a partir de los datos de cambios en el potencial del RHE, en un reactor de 10 ml conteniendo al tipo IR3 de la bacteria *Rhodobacter Capsulatus*.

La curva cinética correspondiente, la cual está en coordenadas de velocidad de generación de hidrógeno vs. tiempo, es mostrada en la *figura 61*. Esta grafica fue construida utilizando los valores de cambios de potencial del electrodo reversible de hidrógeno, en un periodo determinado de tiempo. Una velocidad de generación de hidrógeno de 5.49 l/h fue encontrada, durante la aplicación del reactor de 10 ml.

4.5.3 Determinación del Tiempo de Respuesta del RHE en 1M H₂SO₄

El tiempo de respuesta es una característica del sensor, de una gran importancia para los estudios cinéticos, en donde las mediciones correctas de parámetros dependientes del tiempo es de importancia mayor para la confianza de los datos obtenidos.

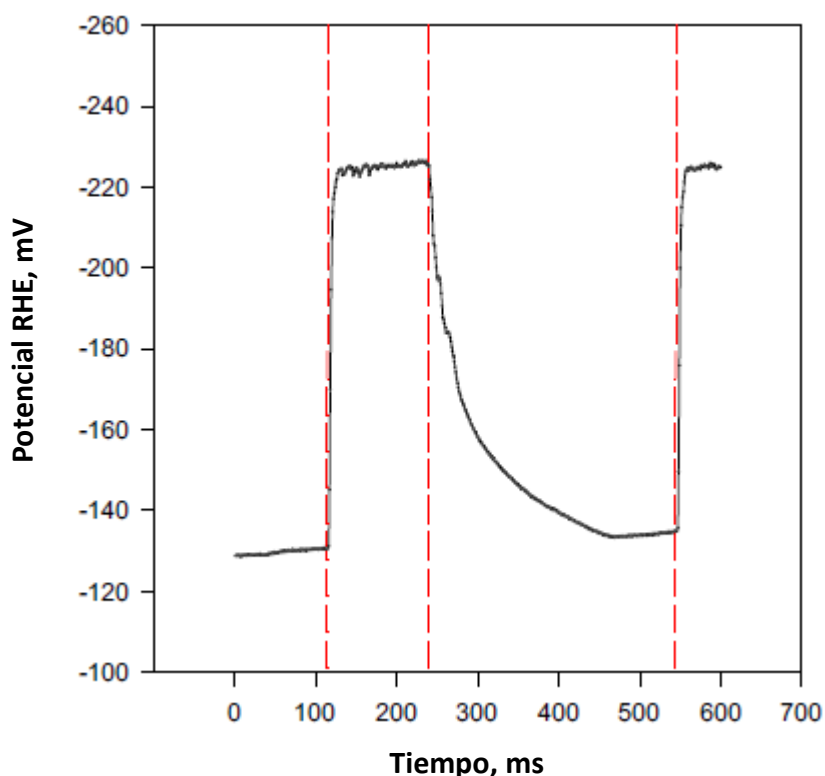


Figura 62. Potencial RHE vs. tiempo, durante la generación de H₂ mediante la aplicación de pulsos cortos de voltaje.

Para la determinación del tiempo de respuesta del electrodo reversible de hidrógeno utilizado como sensor, pulsos eléctricos cortos generadores de hidrógeno fueron aplicados a los electrodos en el interior del generador de hidrógeno gas.

La respuesta del RHE fue registrada (*figura 62*). Ya que el tiempo de transporte del hidrógeno desde el electrodo generador hasta el RHE no puede ser excluido del tiempo de respuesta que se incrementa; un anillo de platino adicional fue añadido cerca del anillo del RHE, a 1 mm de distancia, el cual fue usado como electrodo generador. La respuesta del sensor al 95% fue de 13 ms, como puede apreciarse en la curva magnificada presentada en la *figura 63*.

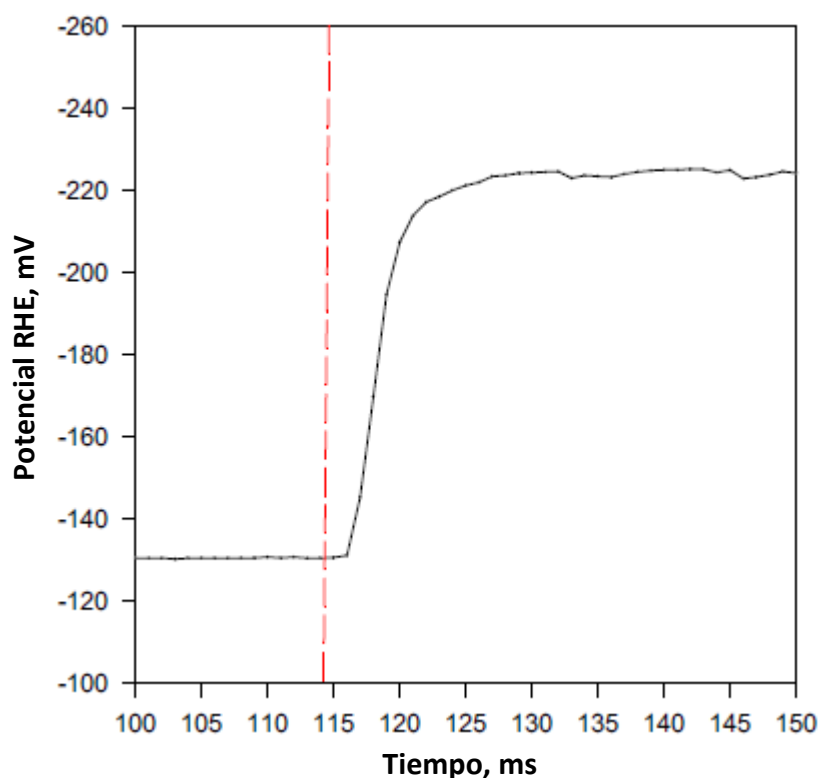


Figura 63. Curva magnificada de la respuesta ascendente del RHE, obtenida mediante la aplicación de pulsos de voltaje en el electrodo generador de hidrógeno, dentro del reactor artificial.

La línea vertical en esta figura corresponde al inicio del pulso eléctrico generador de hidrógeno. Cerca de 3 ms después, las primeras burbujas de hidrógeno alcanzaron el electrodo indicador RHE, cambiando su potencial.

El largo tiempo de la línea descendente de la respuesta del RHE no está relacionado con el tiempo de respuesta del sensor. Este tiempo es la consecuencia de la baja velocidad de escape del hidrógeno disuelto en la solución, provocando además el incremento en la línea base en la *figura 62*.

5. CONCLUSIONES

5. CONCLUSIONES

1. La capacidad productora de hidrógeno de los tipos B10 y el tipo genéticamente modificado IR3 de la bacteria *R. Capsulatus* fue investigada. El tipo IR3 demostró tener la mayor velocidad de producción de hidrógeno, entre un 42% a un 64% mayor que el tipo B10, de acuerdo a las condiciones particulares del proceso. El cálculo de la velocidad promedio en periodos de iluminación combinada sol/foco, mostraron que la velocidad máxima de generación de hidrógeno es alcanzada con la bacteria IR3 con iluminación solar, con la geometría plana sin filtro de luz.
2. La velocidad promedio de producción de hidrógeno se incrementa con la intensidad luminosa. El uso de un reactor plano con mayor área superficial también incremento la velocidad. Los experimentos con filtros de luz mostraron que el reactor con filtro rojo tuvo la mayor velocidad de producción de hidrógeno, comparados con el verde y el azul. La curva de producción de hidrógeno en función del tiempo para la bacteria B10 muestra cambios de pendiente decrecientes con cambios crecientes de temperatura, en el rango de 30 a 40°C. La curva de la bacteria IR3 no fue afectada por dichos cambios. Los datos muestran además una fuerte interacción entre el tipo de bacteria y la fuente de luz, con respecto a la velocidad de generación de hidrógeno, solo para la bacteria B10.
3. Los resultados de medición de biomasa con respecto al tiempo confirman los resultados obtenidos con medición de absorbancia de luz. La población de la bacteria IR3 en la etapa estacionaria es menor a la población de la bacteria B10 en un porcentaje de 30 a 40%; lo cual sugiere que la cantidad de sustrato disponible para su conversión a hidrógeno es mayor para el tipo IR3. La generación de hidrógeno comienza en la etapa estacionaria de crecimiento de ambos tipos de bacteria.

4. Los experimentos de producción de hidrógeno con luz solar demostraron que es posible utilizar la luz solar con las condiciones de intensidad de iluminación de la ciudad de Mexicali, B.C., para generar hidrógeno fotosintético. La factibilidad de generación de hidrógeno bajo ciclos de iluminación solar/foco también fue demostrada.
5. Las pruebas de generación de hidrógeno en suero de leche de vaca mostraron que es necesario someter el suero a un proceso fermentativo previo a la inoculación con las bacterias fotosintéticas, para que estas puedan producir hidrógeno.
6. Fue comprobada la capacidad de aplicación del electrodo reversible de hidrógeno para estudios cinéticos - medición en tiempo real de la velocidad de la producción biológica de hidrógeno del tipo IR3 de la bacteria *Rhodobacter Capsulatus* en un medio RCV.

6. RECOMENDACIONES

6. RECOMENDACIONES

De acuerdo a los avances logrados en este estudio, es pertinente realizar las siguientes recomendaciones:

1. Realizar experimentos de generación de hidrógeno fotosintético en un reactor de laboratorio iluminado con focos led de diversas longitudes de onda en el área visible del espectro electromagnético (se recomienda rojo, amarillo, verde y azul); para de ese modo determinar la cinética de la reacción en cada caso. Los parámetros cinéticos servirán para determinar el tipo de filtros de luz para la producción de hidrógeno fotosintético en reactor solar.
2. Desarrollar un método para medir la conversión de lactosa en ácido láctico, con el objetivo de aplicarlo en los experimentos de fermentación de suero de leche. Se recomienda aplicar este método para encontrar las condiciones del proceso de fermentación que maximicen dicha conversión. Los microorganismos que participan en el proceso deberán ser caracterizados.
3. Tomar como base el diseño aquí propuesto, para la construcción de un reactor fotosintético solar tipo industrial, para la generación de hidrógeno (sección 3.4.2).
4. Realizar pruebas de generación de hidrógeno en este reactor, utilizando primero un sustrato RCV con lactato de sodio; y después un sustrato derivado de suero de leche. El régimen de iluminación será combinado, utilizando luz de lámpara alimentada con la batería incluida en el diseño de la sección 3.4.2, una vez que la luz solar no esté disponible.

7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

7. BIBLIOGRAFÍA

1. Hoffman, P., *Tomorrow's Energy: Hydrogen, Fuel Cells, and the Prospects for a Cleaner Planet*, The MIT Press, 2001.
2. Asociación Nacional de Ingenieros del ICAI, *Hidrógeno y pilas de combustible: estado actual y perspectiva inmediata*, Universidad Pontificia Comillas, 2010.
3. EUROPEAN COMMISSION, Directorate-General for Research, *Hydrogen Energy and Fuel Cells. A vision of our future*, Final Report of the High Level Group, 2003, Website: http://ec.europa.eu/research/energy/pdf/hydrogen-report_en.pdf (12 de julio de 2011).
4. Qadrdan M, Saboohi Y and Shayegan J. A model for investigation of optimal hydrogen pathway, and evaluation of environmental impacts of hydrogen supply system. *International Journal of Hydrogen Energy*, 2008; 33, 7314-7325.
5. McFarland, Hunt, Campbell. *Energy, Physics and the Environment*. Wuerz Pub. 1993.
6. U.S. Department of Energy. Hydrogen Program. http://www.hydrogen.energy.gov/presidents_initiative.html, Agosto 2007.
7. U.S. Energy Information Administration. *Internacional Energy Outlook 2007*. <http://www.eia.doe.gov/oiaf/ieo/index.html>.
8. Poggi-Varaldo, H., Martinez A., Pineda-Cruz J., y Caffarel-Mendez S. *Tecnologías Solar-Eólica-Hidrógeno-Pilas de Combustible como fuentes de energía*, TECNOLÓGICO DE ESTUDIOS SUPERIORES DE ECATEPEC, 2009.
9. Gupta, Ram B., *HYDROGEN FUEL: Production, Transport, and Storage*, CRC Press, 2009.
10. Das, D. and Veziroglu, T. Hydrogen production by biological processes: a survey of literature. *International Journal of Hydrogen Energy*, 2001, 26, 1, 13-28.
11. Das, D., Khanna, N. and Veziroglu, T. Recent Developments In Biological Hydrogen Production Processes. *Chemical Industry & Chemical Engineering Quarterly*, 2008, 14 (2), 57-67.

12. Maeda, T; Sanchez, V. and Wood, T. Metabolic engineering to enhance bacterial hydrogen production. Microbial Biotechnology. Journal compilation, 2007 Society for Applied Microbiology and Blackwell Publishing Ltd.
13. Society for General Microbiology. Microbiology Today Magazine, Life's a gas...and it's hydrogen. Issue August 2008.
14. Das, D. Advances in biohydrogen production processes: An approach towards commercialization. *International Journal of Hydrogen Energy*, 2009, 34, 7349-7357.
15. Dasgupta, C.N., Gilbert, J.J., Lindblad, P., Heidorn, T., Borgvang, S.A., Skjanes, K. and Das, D. Recent trends on the development of photobiological processes and photobioreactors for the improvement of hydrogen production, *International Journal of Hydrogen Energy*, 2010, 35, 19, 10218-10238.
16. Martin, E; Shaheen, S; Lipman, T. and Lidicker, J. Behavioral response to hydrogen fuel cell vehicles and refueling: Results of California drive clinics. *International Journal of Hydrogen Energy*, 2009, 34, 20, 8670-8680.
17. Cecere, D., Ingenito, A., Giacomazzi, E., Romagnosi, L. and Bruno, C. Hydrogen/air supersonic combustion for future hypersonic vehicles, *International Journal of Hydrogen Energy*, 2011, 36, 18, 11969-11984.
18. Air Liquide. Hydrogen in a few figures. L'Air Liquide S.A., Septiembre 2011. <http://www.hydrogen-planet.com/en/hydrogene-energie/l-hydrogene-en-quelques-chiffres.html>.
19. McKinlay, J.B. and Harwood, C.S. Photobiological production of hydrogen gas as a biofuel. *Current Opinion in Biotechnology*, 2010, 21, 3, 244-251.
20. Honda FCX Clarity, <http://automobiles.honda.com/fcx-clarity/> 28 julio del 2011.
21. Coenen, R. A proposal to Convert Air Transport to Clean Hydrogen (CATCH), *International Journal of Hydrogen Energy*, 2009, 34, 8451-8453.
22. He, D., Bultel, Y., Magnin, J., Roux, C. & Willison, J. C. Hydrogen photosynthesis by *Rhodobacter capsulatus* and its coupling to a PEM fuel cell. *Journal of Power Sources*, 2005, 141, 19-23.

23. Zlatev, R. Rapport Scientifique, Laboratoire d' Electrochimie et de Physico-Chimie des Matériaux et Interfaces, Equipe de Génie des Procédés Appliqués à l'Energie et à l'Environnement, G., 2005.
24. Levin, D; Pitt, L. and Murray, L. Biohydrogen production: prospects and limitations to practical application. *International Journal of Hydrogen Energy*, 2004, 29, 2, 173-185.
25. Asada, Y. and Miyake, J. Photobiological Hydrogen Production. *JOURNAL OF BIOSCIENCE AND BIOENGINEERING*, 1999, 88, No. 1, 1-6.
26. Vignais, P ; Magnin, J. And Willison, J. Increasing biohydrogen production by metabolic engineering. *International Journal of Hydrogen Energy*, 2006, 31, 11, 1478-1483.
27. Bianchi, L., Mannelli, F. Viti, C., Adessi, A. and De Philippis, R. Hydrogen-producing purple non-sulfur bacteria isolated from the trophic lake Averno (Naples, Italy). *International Journal of Hydrogen Energy*, 2010, 35, 22, 12216-12223.
28. Abo-Hashesh, M., Ghosh, D., Tourigny, A., Taous, A. and Hallenbeck, P. Single stage photofermentative hydrogen production from glucose: An attractive alternative to two stage photofermentation or co-culture approaches. *International Journal of Hydrogen Energy*, *In Press, Corrected Proof, Available online 25 March 2011*.
29. Davila, G., Arriaga, S., Alatrisme, F., De Leon, A., Rosales, L. and Razo, E. Fermentative biohydrogen production: trends and perspectives. *Rev Environ Sci Biotechnol.*, 2008, 7:27–45
30. Kleerebezem, R. and van Loosdrecht, M. Mixed culture biotechnology for bioenergy production. *Current Opinion in Biotechnology*, 2007, 18, 3, 207-212.
31. Lee, K; Lin, P; Fangchiang, K. and Chang, J. Continuous hydrogen production by anaerobic mixed microflora using a hollow-fiber microfiltration membrane bioreactor. *International Journal of Hydrogen Energy*, 2007, 32, 8, 950-957.
32. Mohan, S; Bhaskar, Y. and Sarma, P. Biohydrogen production from chemical wastewater treatment in biofilm configured reactor operated in periodic

- discontinuous batch mode by selectively enriched anaerobic mixed consortia. *Water Research*, 41, 12, June 2007, 2652-2664.
33. Melis, A. and Melnicki, M. Integrated biological hydrogen production. *International Journal of Hydrogen Energy*, 2006, 31, 11, 1563-1573.
 34. Argun, H. and Kargi, F. Effects of light source, intensity and lighting regime on bio-hydrogen production from ground wheat starch by combined dark and photo-fermentations. *International Journal of Hydrogen Energy*, 2010, 35, 4, 1604-1612.
 35. Tsygankov, A. Nitrogen-Fixing Cyanobacteria: A Review. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 2007, 43, 3, 250–259.
 36. Voelskow, H. & Schon, G. H₂ Production of *Rhodospirillum rubrum* During Adaptation to anaerobic Dark Conditions. *Archives of Microbiology*, 1980, 125, 245-249.
 37. Von Felten, P.; Zurrer, H. & Bachofen, R. Production of molecular hydrogen with immobilized cells of *Rhodospirillum rubrum*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 1985, 23: 15-20.
 38. Nelson, N. A Novel Approach for Efficient Photosynthetic Hydrogen Production. *Biophysical Journal*, 2010, 98, 3, Supplement 1, 602a-603a.
 39. Eroglu, E. and Melis, A. Photobiological hydrogen production: Recent advances and state of the art. *Bioresource Technology*, 2011, 102, 18, 8403-8413.
 40. Keskin, T., Abo-Hashesh, M. and Hallenbeck, P. Photofermentative hydrogen production from wastes. *Bioresource Technology*, 2011, 102, 18, 8557-8568.
 41. Ohta, Y., Frank, J. & Mitsui, A. Hydrogen production by marine photosynthetic bacteria: Effect of environmental factors and substrate specificity on the growth of a hydrogen-producing marine photosynthetic bacterium, *Chromatium SP.* Miami PBS 1071. *Internacional J. Hydrogen Energy*, 1981, Vol. 6, No. 5, 451-460.
 42. Kim, J. S.; Yamauchi, H.; Ito, K. & Takahashi, H. Selection of a Photosynthetic Bacterium Suitable for Hydrogen Production in Outdoor Cultures among strains Isolated in the Seoul, Taegu, sendai and Bangkok Areas. *Agric. Biol. Chem.*, 1982, 46 (6), 1469-1474.

43. Bolliger, R.; Zurrer, H. & Bachofen, R. Photoproduction of molecular hydrogen from waste water of a sugar refinery by photosynthetic bacteria. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 1985, 23: 147-151.
44. Merugu, R., Girisham, S. and Reddy, S.M. Bioproduction of hydrogen by *Rhodobacter capsulatus* KU002 isolated from leather industry effluents, *International Journal of Hydrogen Energy*, 2010, 35, 18, 9591-9597.
45. Srirangan, K., Pyne, M. and Chou, P. Biochemical and genetic engineering strategies to enhance hydrogen production in photosynthetic algae and cyanobacteria. *Bioresource Technology*, 2011, 102, 18, 8589-8604.
46. Willison, J. C.; Madern, D. & Vignais, P. M. Increased photoproduction of hydrogen by non-autotrophic mutants of *Rhodospseudomonas capsulata*. *Biochem. J.*, 1984, 219, 593-600.
47. Kobayashi, J., Yoshimune, K., Komoriya, T. and Kohno, H. Efficient hydrogen production from acetate through isolated *Rhodobacter sphaeroides*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, In Press, Corrected Proof, Available online 8 September 2011.
48. Xu Li, Huan Shi, Yonghong Wang, Siliang Zhang, Ju Chu, Ming Zhang, Mingzhi Huang, and Yingping Zhuang Effects of vitamins (nicotinic acid, vitamin B₁ and biotin) on phototrophic hydrogen production by *Rhodobacter sphaeroides* ZX-5. *International Journal of Hydrogen Energy*, 2011, 36, 16, 9620-9625.
49. Kapdan, I. And Kargi, F. Bio-hydrogen production from waste materials. *Enzyme and Microbial Technology*. 2006; 38: 569–582.
50. Mohan, S; Babu, V. and Sarma, P. Anaerobic biohydrogen production from dairy wastewater treatment in sequencing batch reactor (AnSBR): Effect of organic loading rate. *Enzyme and Microbial Technology*, 2007, 41, 4, 3 September 2007, 506-515.
51. Seifert, K. Waligorska, M. and Laniecki, M. Hydrogen generation in photobiological process from dairy wastewater, *International Journal of Hydrogen Energy*, 2010, 35, 18, 9624-9629.

52. Datar, R., Huang, J., Maness, P., Mohagheghi, R., Czernik, S. and Chornet, E. Hydrogen production from the fermentation of corn stover biomass pretreated with a steam-explosion process. *International Journal of Hydrogen Energy*, 2007 32, 8, 932-939.
53. Honghui Yang, Liejin Guo, Fei Liu. Enhanced bio-hydrogen production from corncob by a two-step process: Dark- and photo-fermentation, *Bioresource Technology*, 2010, 101, 16, 2049-2052.
54. Yokoi, H; Maki, R; Hirose, J. and Hayashi, S. Microbial production of hydrogen from starch manufacturing wastes. *Biomass and Bioenergy*, 2002, 22, 5, 389-395.
55. O-Thong, S., Prasertsan, P., Intrasingha, N., Dhamwichukorn, S. and Birkeland, N. Improvement of biohydrogen production and treatment efficiency on palm oil mill effluent with nutrient supplementation at thermophilic condition using an anaerobic sequencing batch reactor. *Enzyme and Microbial Technology*, 2007, 41, 5, 583-590.
56. Eroglu, E., Gündüz, F., Yücel, M., Türker, L. and Eroglu, I. Photobiological hydrogen production by using olive mill wastewater as a sole substrate source. *International Journal of Hydrogen Energy*, 2004, 29, 2, February 2004, 163-171.
57. Eroglu, E; Gündüz, U., Yücel, M. and Eroglu, I. Photosynthetic bacterial growth and productivity under continuous illumination or diurnal cycles with olive mill wastewater as feedstock. *International Journal of Hydrogen Energy*, 2010, 35, 11, 5293-5300.
58. Li Dong, Yuan Zhenhong, Sun Yongming, Kong Xiaoying, Zhang Yu. Hydrogen production characteristics of the organic fraction of municipal solid wastes by anaerobic mixed culture fermentation. *International Journal of Hydrogen Energy*, 2009, 34, 2, 812-820.
59. Afsar, N., Özgür, E., Gürkan, M., Akköse, S., Yücel, M., Gündüz, U. and Eroglu, N. *Hydrogen* productivity of photosynthetic bacteria on dark fermenter effluent of potato steam peels hydrolysate. *International Journal of Hydrogen Energy*, 2011, 36, 1, 432-438.

-
60. Vrati, S. & Verma, J. Production of Molecular Hydrogen and Single Cell Protein by *Rhodopseudomonas capsulata* from Cow Dung. *J. Ferment. Technol.*, 1983, Vol. 61, No. 2, 157-162.
 61. Gómez, X; Morán, A; Cuetos, M. and Sánchez, M. The production of hydrogen by dark fermentation of municipal solid wastes and slaughterhouse waste: A two-phase process. *Journal of Power Sources*, 2006, 157, 727–732.
 62. Gómez, X., Fernández, C., Fierro, J., Sánchez, M.E., Escapa, A. and Morán, A. Hydrogen production: Two stage processes for waste degradation, *Bioresource Technology*, 2011, 102, 18, 8621-8627.
 63. Gabrielyan, L., Torgomyan, H. and Trchounian, A. Growth characteristics and hydrogen production by *Rhodobacter sphaeroides* using various amino acids as nitrogen sources and their combinations with carbon sources, *International Journal of Hydrogen Energy*, 2010, 35, 22, 12201-12207.
 64. Hidayet Argun and Fikret Kargi. Bio-hydrogen production by different operational modes of dark and photo-fermentation: An overview. *International Journal of Hydrogen Energy*, 2011, 36, 13, 7443-7459.
 65. Laurinavichene, T.V., Belokopytov, B.F., Laurinavichius, K.S., Tekucheva, D.N., Seibert, M. and Tsygankov, A.A. Towards the integration of dark- and photo-fermentative waste treatment. 3. Potato as substrate for sequential dark fermentation and light-driven H₂ production. *International Journal of Hydrogen Energy*, 2010, 35, 16, 8536-8543.
 66. Vincenzini, M.; Balloni, W.; Mannelli, D. & Florenzano, G. A birreactor for continuous treatment of waste waters with immobilized cells of photosynthetic bacteria. *Experiencia*, 37 (1981), Birkhauser Verlag, Basel (Schweiz), 710-712.
 67. Khanal, S; Chen, W; Li, L. and Sung, S. Biological hydrogen production: effects of pH and intermediate products. *International Journal of Hydrogen Energy*, 2004, 29, 11, 1123-1131.

68. Kim, I; Hwang, M; Jang, N; Hyun, S. and Lee, S. Effect of low pH on the activity of hydrogen utilizing methanogen in bio-hydrogen process. *International Journal of Hydrogen Energy*, 2004, 29, 11, 1133-1140.
69. Mu, Y; Zheng, X; Yu, H. and Zhu, R. Biological hydrogen production by anaerobic sludge at various temperatures. *International Journal of Hydrogen Energy*, 2006, 31, 780 – 785.
70. Valdez, I.; Rios, E.; Esparza, F.; Cecchi, F. and Poggi, M. Semi-continuous solid substrate anaerobic reactors for H₂ production from organic waste: Mesophilic versus thermophilic regime. *International Journal of Hydrogen Energy*, 2004, 30, 13-14, 1383-1391.
71. Stevens, P.; Vertonghen, C. De Vos, P. & De Ley, J. The effect of temperature and Light intensity on hydrogen gas production by different *Rhodospseudomonas capsulata* strains. *Biotechnology Letters*, (1984), Vol. 6, No. 5, 277-282.
72. Miyake, J; Wakayama, T; SCHNACKENBERG, J; Takaaki, A. and Asada, Y. Simulation of the Daily Sunlight Illumination Pattern for Bacterial Photo-Hydrogen Production. *JOURNAL OF BIOSCIENCE AND BIOENGINEERING*, 1999, 88, 6, 659-663.
73. Akkerman, I; Janssen, M; Rocha, J. and Wijffels, R. Photobiological hydrogen production: photochemical efficiency and bioreactor design. *International Journal of Hydrogen Energy*, 2002, 27, 11-12, 1195-1208.
74. Qiang Liao, Ye-Jun Wang, Yong-Zhong Wang, Xun Zhu, Xin Tian, Jun Li. Formation and hydrogen production of photosynthetic bacterial biofilm under various illumination conditions, *Bioresource Technology*, 2010, 101, 14, 5315-5324.
75. Rossi, F. and Filipponi, M. Hydrogen production from biological systems under different illumination conditions. *International Journal of Hydrogen Energy*, 2011, 36, 13, 7479-7486.
76. Ye-Jun Wang, Qiang Liao, Yong-Zhong Wang, Xun Zhu, Jun Li. Effects of flow rate and substrate concentration on the formation and H₂ production of photosynthetic bacterial biofilms. *Bioresource Technology*, 2011, 102, 13, 6902-6908.

77. Cuetos, M; Gómez, A; Escapa, A. and . Morán, A. Evaluation and simultaneous optimization of biohydrogen production using 32 factorial design and the desirability function. *Journal of Power Sources*, 2007, 169, 1, 131-139.
78. Chen, C; Lu, W; Wu, J. and Chang, J. Enhancing phototrophic hydrogen production of *Rhodopseudomonas palustris* via statistical experimental design. *International Journal of Hydrogen Energy*, 2007 32, 8, 940-949.
79. Mu, Y; Wang, G. and Yu, H. Response surface methodological analysis on biohydrogen production by enriched anaerobic cultures. *Enzyme and Microbial Technology*, 2006, 38, 905–913.
80. Iwuchukwu, I., Iwuchukwu, E., Le, R., Paquet, C., Sawhney, R., Bruce, B. and Frymier, P. Optimization of photosynthetic hydrogen yield from platinized photosystem I complexes using response surface methodology, *International Journal of Hydrogen Energy*, 2011, 36, 18, 11684-11692.
81. Allakhverdiev, S., Thavasi, V., Kreslavski, V., Zharmukhamedov, S., Klimov, V., Ramakrishna, S., Los, D., Mimuro, M., Nishihara, H. and Carpentier, R. Photosynthetic hydrogen production. *Journal of Photochemistry and Photobiology C: Photochemistry Reviews*, 2010, 11, 2-3, 101-113.
82. Burgess, S., Tamburic, B., Zemichael, F., Hellgardt, K. and Nixon, P. Chapter 3 - Solar-Driven Hydrogen Production in Green Algae. *Advances in Applied Microbiology*, 2011, 75, 71-110.
83. Xiaomin Wu, Xueqing Wang, Honghui Yang, Liejin Guo. A comparison of hydrogen production among three photosynthetic bacterial strains, *International Journal of Hydrogen Energy*, 2010, 35, 13, 7194-7199.
84. Hillmer, P. & Gest, H. H₂ Metabolism in the Photosynthetic Bacterium *Rhodopseudomonas capsulata*: H₂ Production by Growing Cultures. *Journal of Bacteriology*, 1977, Vol 129, No. 1, 724-731.
85. Kawagoshi, Y., Oki, Y., Nakano, I., Fujimoto, A. and Takahashi, H. Biohydrogen production by isolated halotolerant photosynthetic bacteria using long-wavelength

- light-emitting diode (LW-LED). *International Journal of Hydrogen Energy*, 2010, 35, 24, 13365-13369.
86. Wang, Y; Mu, Y. and Yu, H. Comparative performance of two upflow anaerobic biohydrogen-producing reactors seeded with different sludges. *International Journal of Hydrogen Energy*, 2007, 32, 8, 1086-1094.
87. Eroglu, I; Aslan, K; Gündüz, U; Yücel, M. and Türker, L. Substrate consumption rates for hydrogen production by *Rhodobacter sphaeroides* in a column photobioreactor. *Journal of Biotechnology* 70, Issues 1-3, 30 April 1999, Pages 103-113.
88. Xin Tian, Qiang Liao, Xun Zhu, Yongzhong Wang, Pan Zhang, Jun Li, and Hong Wang. Characteristics of a biofilm photobioreactor as applied to photo-hydrogen production. *Bioresource Technology*, Volume 101, Issue 3, February 2010, Pages 977-983.
89. Boran, E., Özgür, E., van der Burg, J., Yücel, M., Gündüz, U. and Eroglu, I. Biological hydrogen production by *Rhodobacter capsulatus* in solar tubular photo bioreactor. *Journal of Cleaner Production*, 2010, 18, Supplement 1, S29-S35.
90. Wakayama, T. and Miyake, J. Light shade bands for the improvement of solar hydrogen production efficiency by *Rhodobacter sphaeroides* RV. *International Journal of Hydrogen Energy*, 2002, 27, 1, 495-500.
91. Romagnoli, F., Blumberga, D. and Pilicka, I. Life cycle assessment of biohydrogen production in photosynthetic processes, *International Journal of Hydrogen Energy*, 2011, 36, 13, 7866-7871.
92. Yong-Zhong Wang, Qiang Liao, Xun Zhu, Jun Li, Duu-Jong Lee. Effect of culture conditions on the kinetics of hydrogen production by photosynthetic bacteria in batch culture. *International Journal of Hydrogen Energy*. In Press, Corrected Proof. Available online 29 April 2011.
93. Chun-Yen Chen, Chia-Hsien Liu, Yung-Chung Lo, Jo-Shu Chang. Perspectives on cultivation strategies and photobioreactor designs for photo-fermentative hydrogen production. *Bioresource Technology*, 2011, 102, 18, 8484-8492.

94. Hillmer, P. & Gest, H. H₂ Metabolism in the Photosynthetic Bacterium *Rhodospseudomonas capsulata*: Production and Utilization of H₂ by Resting Cells. *Journal of Bacteriology*, 1977, Vol 129, No. 2, 732-739.
95. Nakada, E., Nishikata, S., Asada, Y. & Miyake, J. Photosynthetic bacterial hydrogen production combined with a fuel cell. *International Journal of Hydrogen Energy*, 1999, 24, 1053-1057.
96. Jounneau, Y.; Wong, B. & Vignais, P. M. Stimulation by Light of nitrogenase síntesis in cells of *Rhodospseudomonas capsulata* growing in N-limited continuous cultures. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1985, 808, 149-155.
97. Francou, N. & Vignais, P. M. Hydrogen production by *Rhodospseudomonas capsulata* cells entrapped in carrageenan beads. *Biotechnology Letters*, 1984, Vol. 6, No. 10, 639-644.
98. Obeid, J., Flaus, J-M., Adrot, O., Magnin, J-P. and Willison, J. State estimation of a batch hydrogen production process using the photosynthetic bacteria *Rhodobacter capsulatus*, *International Journal of Hydrogen Energy*, 2010, 35, 19, 10719-10724.
99. Miyamoto, K. & Miura, Y. Problems in Photobiological Production of Hydrogen. *Process Biochemistry*, 1980, June/July, 23-26.
100. Microbe Wiki. Microbial Biorealm, *Rhodobacter*.
<http://microbewiki.kenyon.edu/index.php/Rhodobacter>. Agosto 2007.
101. Fu-Qiao Xu, Wei-Min Ma, Xin-Guang Zhu. Introducing pyruvate oxidase into the chloroplast of *Chlamydomonas reinhardtii* increases oxygen consumption and promotes hydrogen production. *International Journal of Hydrogen Energy*, 2011, 36, 17, 10648-10654.
102. Park Yejun, Lee Byungjoo, Kim Chunjoong, Kim Jongmin, Nam Seunghoon, Oh Yuhong, Park Byungwoo. Modification of Gold Catalysis with Aluminum Phosphate for Oxygen-Reduction Reaction, *Journal of Physical Chemistry*, 2010, C 114, 3688.
103. Ishihara Akimitsu, Ohgi Yoshiro, Matsuzawa Koichi, Mitsushima Shigenori, Ota Ken-ichiro. Progress in non-precious metal oxide-based cathode for polymer electrolyte fuel cells, *Electrochimica Acta*, 2010, 55, 27, 8005-8012.

-
104. Ji Yanfeng, Li Zhongfang, Wang Suwen, Xu Guofeng, Yu Xianjin. Thermal treatment of Co(II) tetracarboxyphenyl porphyrin supported on carbon as an electrocatalyst for oxygen reduction. *International Journal of Hydrogen Energy*, 2010, 35, 15, 8117-8121.
 105. Chun Jang H., Ra Keuk H., Kim Nam Y. Erratum: Langmuir Adsorption Isotherms of Overpotentially Deposited Hydrogen at Poly-Au and Rh/H₂SO₄ Aqueous Electrolyte Interfaces: Qualitative Analysis Using the Phase-Shift Method. *Journal of the Electrochemical Society*, 2010, 157, S14.
 106. Zhang Peng, Huang Sheng-Yang, B. N. Popov. Mesoporous Tin Oxide as an Oxidation-Resistant Catalyst Support for Proton Exchange Membrane Fuel Cells. *Journal of the Electrochemical Society*, 2010, 157, 8, B1163.
 107. Chun Jang H., Kim Nam Y., Chun Jin Y. Determination of adsorption isotherms of hydrogen and hydroxide at Pt-Ir alloy electrode interfaces using the phase-shift method and correlation constants. *International Journal of Hydrogen Energy*, 2008, 33, 2, 762-744.
 108. Chun Jin Y., Chun Jang H. Determination of Adsorption Isotherms of Hydrogen on Titanium in Sulfuric Acid Solution Using the Phase-Shift Method and Correlation Constants. *Journal of Chemical & Engineering Data*, 2010, 55, 2942.
 109. Obeid, J., Magnin, J-P., Flaus, J-K., Adrobt, O., Willison, J. C. and, Zlatev, R. Modelling of hydrogen production in batch cultures of the photosynthetic bacterium *Rhodobacter capsulatus*. *International Journal of Hydrogen Energy*, 2009, 34, 1, 180-185.
 110. Penner, R. M. Electrodeposition of nanowires for the detection of hydrogen gas. *MRS Bulletin*, 2010, 35, 10, 771-777.
 111. Vertes, G. and Nagy, F., *Magy. Kem. Folyoirat.*, 1960, 65, 450.

8. PUBLICACIONES ANEXAS

A1

Titulo: Reversible Hydrogen Electrode Application as Indicator Electrode for Real Time Kinetic Study of Microbial H₂ Production.

Autores: Cesar Iñiguez, Roumen Zlatev, Margarita Stoytcheva, Benjamín Valdez, Jean-Pierre Magnin, Sayuri Kiyota.

Revista: The Electrochemical Society, ECS Transactions, 33 (26) 87-94 (2011).

Reversible Hydrogen Electrode Application as Indicator Electrode for Real Time Kinetic Study of Microbial H₂ Production

Cesar Iñiguez^a, Roumen Zlatev^{*a}, Margarita Stoytcheva^a, Benjamin Valdez^a, Jean-Pierre Magnin^b, Sayuri Kiyota^a

^aEngineering Institute of UABC, Blvd. Benito Juárez s/n, 21280 Mexicali, B.C., México

^bLEPMI, UMR 5631, CNRS/UJF/INPG, BP75, 38402 St. Martin d'Hères, France

*e-mail: roumen@iing.mx1.uabc.mx

The Reversible Hydrogen Electrode (RHE) potential depends on the pH and the H₂ pressure which determines the dissolved hydrogen concentration according to the Henry's law. RHE was applied as hydrogen sensor for real time bacterial hydrogen production rate evaluation employing the photosynthetic *Rhodobacter Capsulatus* strain IR3 in 10 ml reactor containing RCV medium. The reliable determination of the produced H₂ volume for determination of the process rate requires big reactor volumes since the H₂ production rate is small, measured in mL/hour and the precise measurements of small gas volumes is very complicated. The RHE potential monitoring however allows real time determination of the generated H₂ and hence the process rate without consumption of great reagent amounts.

Introduction

The standard (normal) hydrogen electrode SHE (NHE) is commonly applied for many years as a reference electrode assuming its potential to be zero volts. It is based on the equilibrium presented in equation [1]:



occurring at standardized conditions: hydrogen pressure of 1 bar and hydronium ion concentration of one M/L. The established electrode potential depends on the hydrogen partial pressure and can be expressed by the Nernst equation as follows:

$$E = E_0 + RT/F (\ln a_{\text{H}^+} - \ln (p_{\text{H}_2}/p_0)^{1/2}) \quad [2]$$

where:

E_0 is the standard potential which by definition equals to zero

a_{H^+} is the activity of the hydrogen ions

p_{H_2} is the hydrogen partial pressure

R is the gas constant

T is the temperature

F is the Faraday constant

p_0 is the standard pressure (1 bar)

When the equilibrium described by equation [1] is established at conditions different from the standard ones including solution composition the electrode is called Reversible Hydrogen Electrode (RHE). Its potentials depend on the solution pH at constant H_2 pressure according to the simplified Nernst equation:

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

and on the H_2 pressure (the concentration of the dissolved hydrogen) as well at constant pH, allowing thus the RHE application as indicator electrode (sensor) for dissolved hydrogen in anaerobic conditions. The presence of oxidizing agents in the solution where the RHE is immersed corrupts the equilibrium described by equation [1] and hence the established electrode potential. The RHE is often used as a reference electrode in organic and inorganic phases and different conditions (1-7).

As shown in references (8, 9) the photosynthetic bacterial H_2 production occurs at anaerobic conditions and the RHE can serve as an excellent hydrogen sensor for real time kinetics parameter determination in small reactor volumes. The experimental conditions optimization in order to obtain maximal bacterial H_2 production requires a great number of experiments even if the Design of Experiments (DOE) methodology is applied. Big reactors (5-10 liters) containing big reagents amounts must be employed to obtain precise and reliable results about the produced H_2 gas volume since the process rate is very small (measured in mL/hour).

The existing hydrogen sensors are based on electrical resistance measurements. Penner Reginald for example described electrodeposited Pd nanowire which resistance depend on the absorbed by Pd hydrogen proportional its concentration in the gas phase (10). Unfortunately this type of sensors are not applicable in liquid phase. However, the RHE application as a hydrogen sensor allows precise bacterial H_2 generation rate determination in reactors of few milliliters only by monitoring the RHE potential since its value is proportional to the dissolved H_2 concentration (H_2 pressure). The aim of this work is the RHE application for real time kinetic studies of the microbial H_2 production by the photosynthetic *Rhodobacter Capsulatus* bacterial strain IR3 in RCV medium described in references (9, 10) in 10 ml reactor volume at anaerobic conditions in the presence of light.

Experimental

Reagents

All the reagents employed in the experiments were of analytical grade purity. The solutions were prepared with deionized water produced by Milli Q reverse osmosis installation (Millipore, USA). The working electrolyte employed for RHE characteristics determination as H_2 sensor was 1M H_2SO_4 from Sigma. The experiments with the photosynthetic *Rhodobacter Capsulatus* bacterial strain IR3 was carried out in RCV medium having the following composition: DL-malate 7.5 mmol L^{-1} , $(NH_4)_2SO_4$ 7.5 mmol L^{-1} , lactate 30 mmol L^{-1} , pH 6.8. The experimental conditions and the methodology for bacterial hydrogen production described by the authors earlier (8, 9) were applied.

Experimental setup for RHE characteristics determination as a H₂ sensor

The determination of the RHE characteristics as a hydrogen sensor was performed using palatinate Pt ring electrode which is part of a conductometric cell YSI model 3401 containing two equal ring electrodes. The cell was immersed vertically into a 100 ml beaker containing 1M H₂SO₄ almost to its bottom. The lower Pt ring electrode was employed as a cathode for hydrogen generation, connected to the negative terminal of a controlled power supply. Fisher Pt wire electrode Cat # 13-639-123 was used as anode, connected to the positive terminal immersed in the 1M H₂SO₄ but out of the conductometric cell and one inch higher from the beaker bottom, preventing thus the entering of the produced oxygen into the conductometric cell and to mixes with the hydrogen generated inside.

The upper Pt electrode was used as indicator electrode (hydrogen sensor) connected to the high impedance input of Orion/Thermo pH/mV meter. Model 420A Yokogawa Ag/AgCl 3M KCl was used as a reference electrode. The hydrogen generated on the lower Pt ring of the cell moved up reaching the indicator electrode determining its potential according the hydrogen concentration. This experimental setup is illustrated in Figure 1.

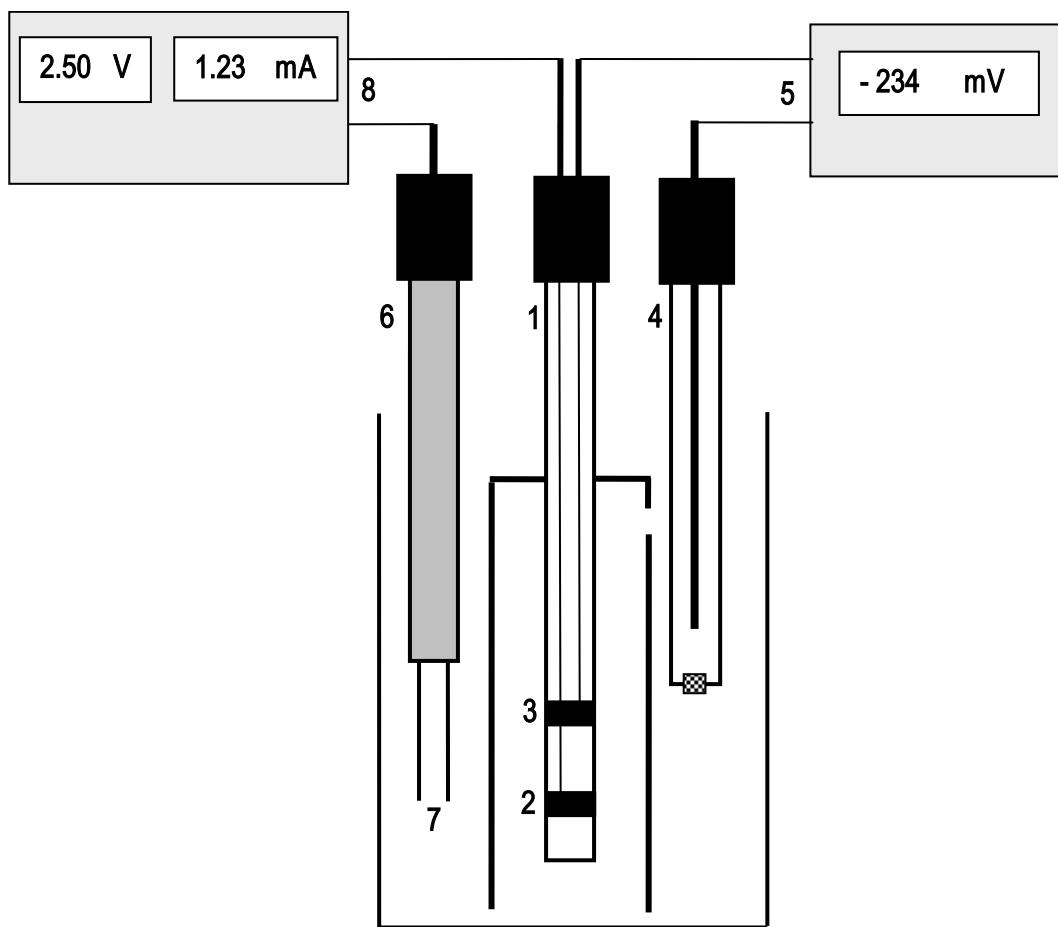


Figure 1. Experimental setup for RHE characteristics determination as a H₂ sensor

The same setup was used in the experiments with the bacterial H_2 production. The beaker containing the conductometric cell, the Pt anode and the reference electrode was put in a closed plastic cylinder in N_2 atmosphere made by N_2 flow. The RCV bacteria medium was kept for 24 hours at low pressure at 40 °C in air thermostat to remove the dissolved oxygen concentration. The N_2 flow purge cannot be applied since the N_2 solubility is a little more than this of the H_2 and the latter is not able to replace it.

Determination of the generated H_2 volume

A potential of 2.3 V was applied between the generator Pt electrode situated in the lower part of the conductometric cell and the outer anode resulting in hydrogen generation inside the conductometric cell. The mass of the produced hydrogen and then the volume was calculated applying the Faradays law using the electricity quantity evaluated by integration of the registered $i-t$ curve. The current was monitored applying a homemade current to voltage converter coupled with a National Instruments USB 6009 Data Acquisition System driven by National Instruments Lab View 8.0 based software.

Results and discussions

RHE calibration as H_2 sensor

The RHE calibration was made by plotting the established electrode potential vs. $\frac{1}{2}\ln[H_2]$ according to the equation [2]. First, the solution was saturated by H_2 generation for 30 minutes. Then RHE potential corresponding to the saturated solution was measured and found to be: -244 mV vs. Ag/AgCl, 3M KCl. The value of the H_2 concentration (at saturation) was evaluated taking into account the H_2 solubility at 1 bar and 25 °C (1.55 mg/L according to the reference (11)) and that the H_2 partial pressure in the air is 0.00005 bars. The saturated H_2 concentration was found to be 61 $\mu\text{g/L}$.

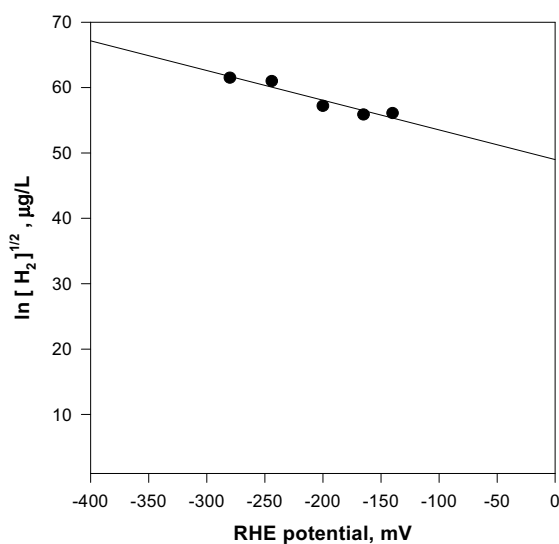


Figure 2. RHE calibration plot for artificial H_2 generating reactor

Since at H_2 concentration equal to zero the potential tend to be infinite $[\ln(0)]$ as seen from equation [2], in order to obtain different values for the dissolved H_2 concentration to be used for the calibration curve building in coordinates: $\frac{1}{2} \ln[H_2]$ vs RHE potential, two independent methods can be applied:

1. Changing the temperature from 20 to 40 °C with a step of 5 °C for example results in corresponding changes of the H_2 solubility and hence changes of the equilibrium H_2 concentrations. The corresponding RHE potential values after temperature correction according to the (RT/nF) term of the Nernst equation [2] have to be plotted vs. $\frac{1}{2} \ln[H_2]$.
2. Consecutives short voltage pulses application on the H_2 generating Pt ring electrode obtaining stepwise increase of dissolved H_2 concentration evaluated by calculation taking into account the quantity of the electricity during the pulse evaluated by the Faraday law.

The first method was preferred although its complicity resulting from the empirical way of determination of the pulses duration and the pause between them employed in the second method. Inadequate pulse and pause widths causes the H_2 concentration to increase nonlinearly. Shorter pulses provide better linearity than the larger but very small H_2 concentration range can be achieved. The calibration plot in coordinates: $\frac{1}{2} \ln[H_2]$ vs RHE potential built by the application of the first method is presented in Figure 2.

RHE application for determination of the bacterial H_2 generation kinetic parameters

The RHE potential monitoring yields data which can be easily converted in volume of bacterially generated H_2 by the employment of the calibration curve shown in Figure 1 and hence to calculate the process rate. A typical curve in coordinates: generated hydrogen volume vs. time calculated by monitoring of the RHE potential in 10 ml reactor is presented in Figure 3.

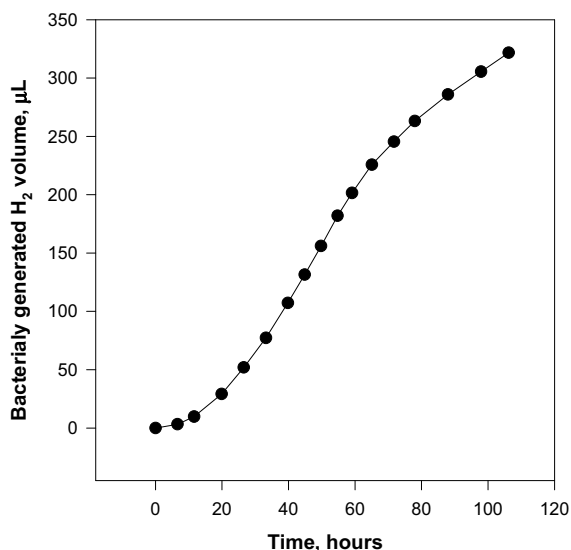


Figure 3. Curve of the H_2 generation calculated by the calibration plot application using the RHE potential monitoring data from 10 ml reactor with photosynthetic *Rhodobacter Capsulatus* bacterial strain IR3 in RCV medium

The precise measurements of small gas volumes measured in micro-liters are impossible in order to build this curve. That is why the RHE seems to be the right tool for bacterial H_2 generation conditions optimization. The corresponding kinetic curve in coordinates: H_2 generation rate vs. time is shown in Figure 4. It was built using the RHE potential values changes for a known period of time. A rate of H_2 generation of $5.49 \mu\text{L}/\text{hour}$ was determined with the application of 10 ml reactor.

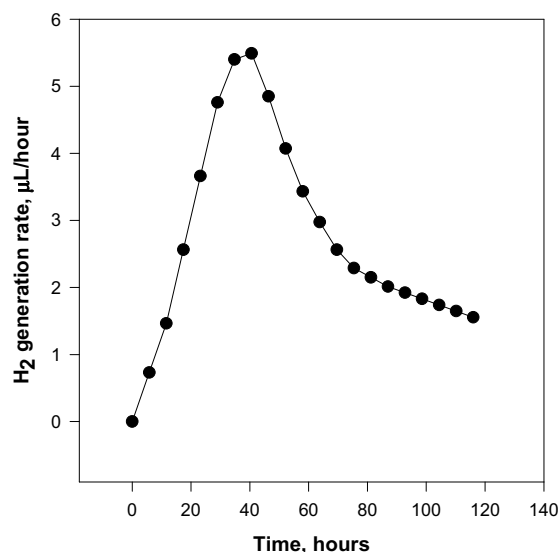


Figure 4. Kinetic curve of H_2 generation built on RHE potential changes monitoring. Reactor volume 10 ml; *Rodobacter Capsulatus* bacterial strain IR3 in RCV medium

RHE response time determination in 1M H_2SO_4

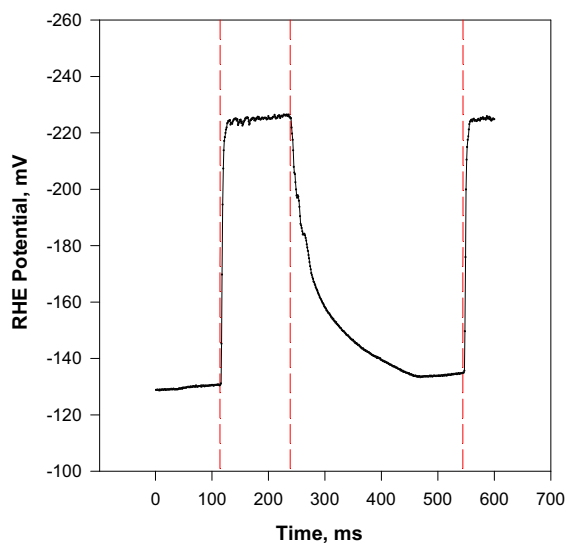


Figure 5. RHE potential vs. time at H_2 generation by short voltage pulses application

The response time is a sensor characteristic with a great importance for the kinetic studies where the correct measurements of time depending parameters is of a great importance for the data reliability. To determine the response time of the RHE short electrical pulses generating H_2 gas were applied to the electrodes in gas produced generator and the RHE response was registered. Since the H_2 transport time from the generator electrode to the RHE cannot be excluding from the response rising time an additional Pt ring was added closed to the RHE one at 1 mm distance used as a generator electrode. The sensor response to 95% was determined to be about 13 ms as seen from the zoomed curve presented in Figure 5. The vertical line there corresponds to the rising edge (the beginning) of the H_2 generating electrical pulse. About 3 ms later the first H_2 bubbles already reached the indicator RHE changing its potential.

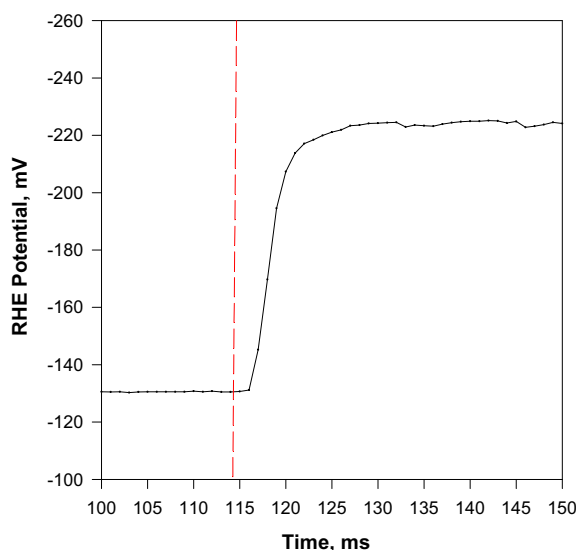


Figure 6. Zoomed curve of the rising RHE response obtained by voltage pulse application on the H_2 generating electrode in the artificial reactor shown in Figure 1.

The long time of the falling edge of the RHE response is not related to the sensor response time. It results from the slow escape rate of the dissolved H_2 from the solution causing the base line increase in Figure 5.

Conclusions

The ability of application of the RHE for real time kinetic studies of the biological H_2 production by *Rhodobacter Capsulatus* bacterial strain IR3 in RCV medium was tested and proved. RHE was applied as hydrogen sensor for real time bacterial hydrogen production rate evaluation employing the photosynthetic *Rhodobacter Capsulatus* strain IR3 in 10 ml reactor containing RCV medium without measuring of the produced gas volume.

REFERENCES

1. Park Yejun, Lee Byungjoo, Kim Chunjoong, Kim Jongmin, Nam Seunghoon, Oh Yuhong, Park Byungwoo, *Journal of Physical Chemistry C* 114 (2010) 3688
2. Ishihara Akimitsu, Ohgi Yoshiro, Matsuzawa Koichi, Mitsushima Shigenori, Ota Ken-ichiro, *Electrochimica Acta* 55 (2010) 8005-8012
3. Ji Yanfeng, Li Zhongfang, Wang Suwen, Xu Guofeng, Yu Xianjin, *International Journal of Hydrogen Energy*, 35 (2010) 8117
4. Chun Jang H., Ra Keuk H., Kim Nam Y., *Journal of the Electrochemical Society* 157 (2010) S14
5. Zhang Peng, Huang Sheng-Yang, B. N. Popov, *Journal of the Electrochemical Society* 157 (2010) B1163
6. Chun Jang H., Kim Nam Y., Chun Jin Y., *International Journal of Hydrogen Energy* 35 (2010) 7665
7. Chun Jin Y., Chun Jang H., *Journal of Chemical & Engineering Data* 55 (2010) 2942
8. J. Obeida, J-P Magnin, J-K Flaus, O. Adrobt, J. C. Willison, R. Zlatev, *Int. J. Hydrogen energy* 34 (2009) 180
9. H. Deliang, Y. Bultel, J-P. Magnin, C. Roux, J. Wilison, *J. Power Sources* 141 (2005) 19
10. G. Vertes, F. Nagy, *Magy. Kem. Folioirat.* 65 (1960) 450
11. R. M. Penner, *MRS Bulletin* 35 (2010) 771

A2

Titulo: Effect of NO_2^- in the Corrosion Behavior of Cerium Based Conversion Coatings on AA6061-T6.

Autores: S. Kiyota, B. Valdez, R. Zlatev, M. Stoytcheva, C. Iñiguez.

Revista: The Electrochemical Society, ECS Transactions, 33 (30) 23-30 (2011).

Effect of NO_2^- in the Corrosion Behavior of Cerium Based Conversion Coatings on AA6061-T6

S. Kiyota, B. Valdez, R. Zlatev, M. Stoytcheva, C. Iñiguez

Engineering Institute of UABC, Blvd. Benito Juárez s/n, 21280 Mexicali, B.C., México

Cerium based conversion coatings were immersion deposited on AA6061-T6 and characterized to determine the effect of NO_2^- as an additive in the conversion solution on the anticorrosion behavior. The NO_2^- addition to the cerium chloride and hydrogen peroxide solution improved the corrosion resistance and coating morphology. Electrochemical measurements were performed by potentiodynamic polarization (PDP) and electrochemical impedance spectroscopy (EIS) in 0.01 M NaCl aqueous solution and the coating morphology was analyzed by Atomic Force Microscopy (AFM).

Introduction

Conversion coatings are commonly produced on various engineering alloys, to improve paint adhesion and corrosion resistance (1-3). For military and commercial aircraft applications, a three layer coating system is often employed and consists in an inorganic conversion coating, an organic primer and a topcoat. Chromate conversion coatings (CrCC) have been used as anticorrosive treatments in the industry for over 50 years. Despite their undeniable qualities and advantages, such conversion treatments should be replaced since Cr^{+6} is highly toxic and carcinogenic (4-7).

Environmentally benign alternatives to CrCC have been investigated extensively. One of the most studied systems introduced by Hinton et al are salts with rare earth ions that form insoluble hydroxides having exceptional resistance to localized corrosion (8-10). Several papers explain that in aqueous solution of Ce^{+3} salts and H_2O_2 , cerium deposition occurs at cathodic sites due to the local pH increase produced by the reduction of H_2O_2 (11-15).

It is generally recognized that conversion conditions, such as solution composition, bath temperature, immersion time, type of anion, affect the formation and corrosion properties of the coatings. Different studies of cerium based conversion coatings explain the influence of anions such as Cl^- , NO_3^- , SO_4^{2-} and CH_3COO^- on the corrosion behavior (1,16).

The aim of this paper was to study the effect of NO_2^- in the corrosion behavior and morphology of cerium based conversion coatings using immersion treatment times lower than 10 minutes. The efficiency of the obtained coatings was compared with a conventional CeCl_3 and H_2O_2 solution. The protective performance of the coatings was investigated by means of potentiodynamic polarization (PDP) and electrochemical impedance spectroscopy measurements (EIS).

Experimental

Sample preparation

All experiments were performed using AA6061-T6 panels. This alloy is used in aircraft industry and has nominal composition of 0.8-1.20% Mg, 0.4-0.8% Si, 0.15-0.4% Cu, 0.04-0.35% Cr, 0.70% Fe, 0.15% Mn, 0.25% Zn and 0.20% of impurities.

For electrochemical measurements and surface analysis, samples were prepared from AA6061-T6 coupons mounted in epoxy resin leaving an exposed area of 1 cm². The samples surfaces were polished with different grades of SiC abrasive paper. Prior to the conversion treatment, the samples were degreased using a 5 wt. % commercial alkaline solution (Alcanox[®]) for 5 minutes at 55 ± 5 °C and activated with 10 wt. % HCl solution for 15 minutes at room temperature. After cleaning and activation, panels were rinsed with deionized water. The cerium based conversion treatment was accomplished by immersion with two different solutions (Table I), followed by a final rinsing and drying step with hot air at 60°C.

TABLE I. Conversion solution composition and experimental conditions.

Solution	Composition, g L ⁻¹	Immersion time, min	pH *	Immersion temperature, °C
1	1.5 CeCl ₃ ·7H ₂ O, 12 H ₂ O ₂	1, 5	3.0	35
2	1.5 CeCl ₃ ·7H ₂ O, 0.5 NaNO ₂ , 12 H ₂ O ₂	1, 5	3.0	35

*pH adjusted with HCl

Surface Analysis

Atomic force microscopy (AFM) analyses were performed using a Quesant Q-Scope 350 (Quesant Instruments, Agoura Hills, CA, USA) in contact mode in order to visualize the morphology of the conversion coatings surfaces obtained with solution 2.

Electrochemical Cell, Electrodes and Instrumentation

PC4 FAS1 (Gamry Instruments Inc.) potentiostat/galvanostat controlled by CMS300 software was employed for electrochemical measurements. A conventional three-electrode cell was used. Working electrodes consisted in AA6061-T6 with and without conversion treatment. The counter and reference electrodes were graphite and Ag/AgCl/3M KCl respectively.

Electrochemical measurements

The study of the corrosion behavior was evaluated in NaCl 0.01 M solution at room temperature using 1) potentiodynamic polarization (PDP) performed from -0.9 V_{Ag/AgCl} to 0.9 V_{Ag/AgCl} vs E_{corr} with a scan rate of 10 mV/s and 2) electrochemical impedance spectroscopy (EIS), with a frequency range from 0.05 to 10⁵ Hz, with a logarithmic sweeping frequency of 10 steps/decade and the amplitude of the sinusoidal perturbation signal was 10 mV vs E_{corr} .

Results and Discussion

Surface Analysis

In order to evaluate the relationship between the corrosion resistance and the surface morphology, the surface observation of the coatings was performed using AFM (Figure 1a-d). The images indicate that coatings consisted in spherical grains over the surface. The samples topography was strongly affected by the addition of NO_2^- to the coating solution, during 5 minutes of treatment the protective film seems more homogeneous and the presence of fine grains compared with the other systems is observed. Since the agglomeration of the grains begins over cathodic sites of the metal surface, the presence of NO_2^- promotes the formation kinetics and influences the microstructure of the coatings acting as a grain refiner and improving the corrosion protection performance (1,16).

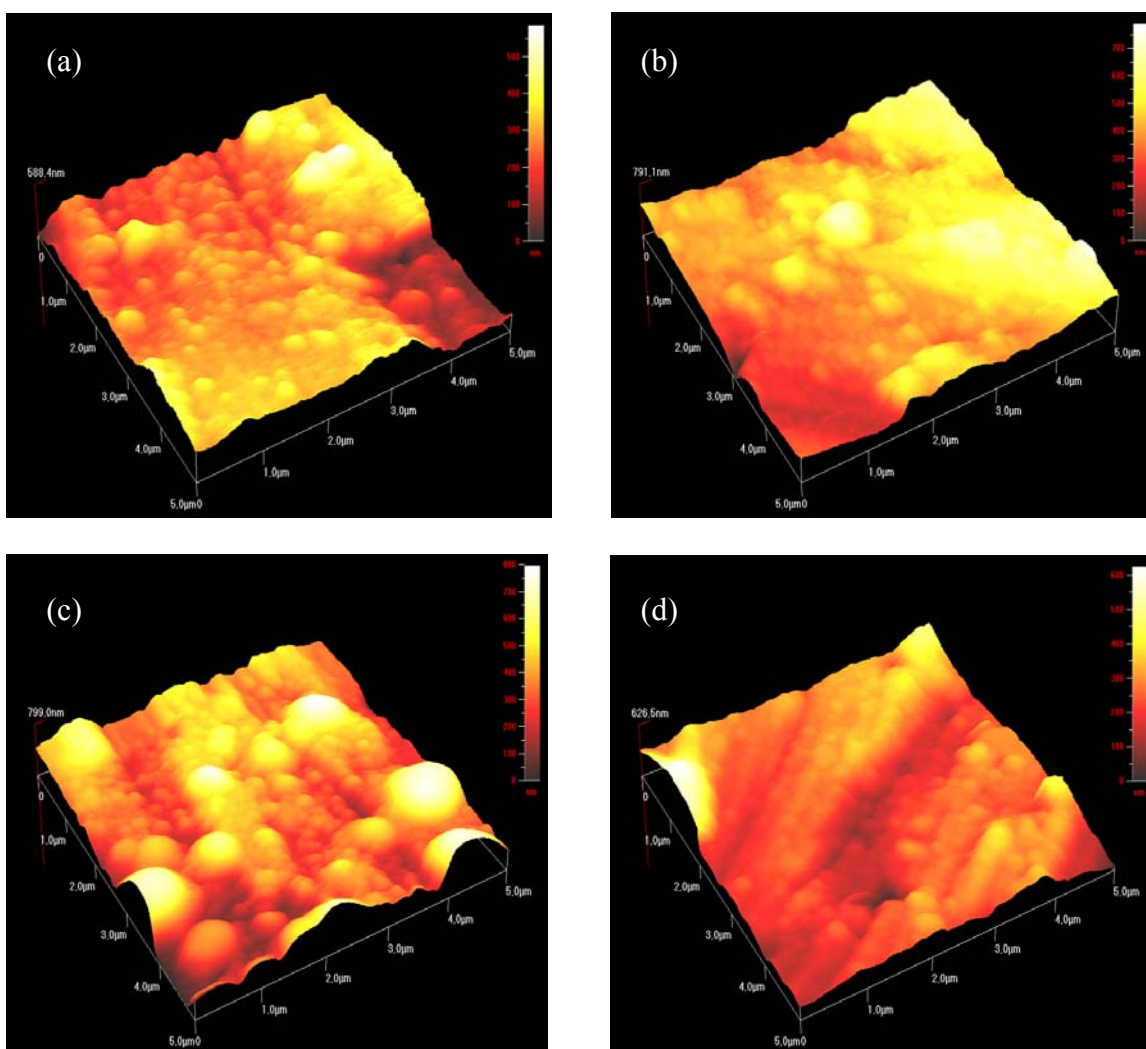


Figure 1. AFM images (a) conversion treatment with solution 1 for 1 minute (b) conversion treatment with solution 1 for 5 minutes, (c) conversion treatment with solution 2 for 1 minute and (d) conversion treatment with solution 2 for 5 minutes.

Potentiodynamic Polarization (PDP)

Potentiodynamic polarization plots are shown in Figures 2 and 3, the measurements were carried out after 30 minutes of immersion in 0.01 M NaCl solution to reach steady state conditions. Electrochemical parameters obtained by Tafel extrapolation are presented in Table II. PDP plots of the conversion coatings in electrolytic solution indicated a better corrosion behavior for all samples regarding to the bare substrate. A notable difference is observed in the corrosion current density between bare and coated panels. For samples prepared with solution 2, i_{corr} values were 0.434 and 0.365 $\mu\text{A cm}^{-2}$ (1 and 5 minutes of treatment), which are 6 and 7 times lower compared to the bare substrate and 5 times lower than those samples treated with solution 1. The corrosion potential (E_{corr}) of the treated samples moves toward nobler potentials in a range of 73 to 189 mV regarding to AA6061-T6 (-708 mV), this suggests that cerium based conversion coatings act as anodic inhibitors, improving the corrosion resistance due to the barrier effect which decreases the anodic current of the system. In summary, NO_2^- addition generates more resistant coatings showing the lowest values of i_{corr} , thereby reducing the corrosion rates, attributable to more homogeneous and compact films, good adhesion, etc. Moreover, the lower corrosion resistance of samples treated with solution 1 can be explained in terms of the coating thickness.

Table II. Electrochemical polarization parameters in NaCl 0.01 M solution obtained by Tafel extrapolation.

Solution/Sample	Immersion treatment time (min)	β_a , mV dec^{-1}	β_c , mV dec^{-1}	i_{corr} , $\mu\text{A cm}^{-2}$	$-E_{corr}$, mV
AA6061-T6	--	730.2	261.6	2.5	708
1	1	171.2	496.3	2.06	519
1	5	107	388.4	1.9	538
2	1	314.1	343.1	0.434	635
2	5	321.5	303.4	0.365	627

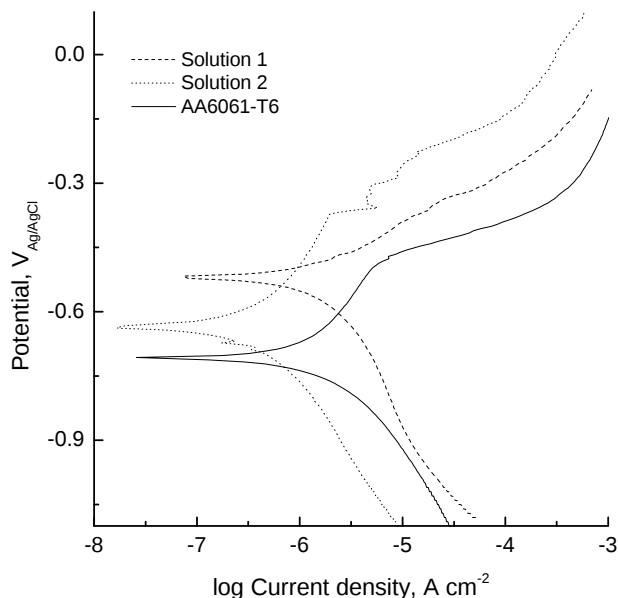


Figure 2. Potentiodynamic polarization for AA6061-T6 with and without treatment for 1 minute in the conversion solution after 30 minutes in 0.01 M NaCl.

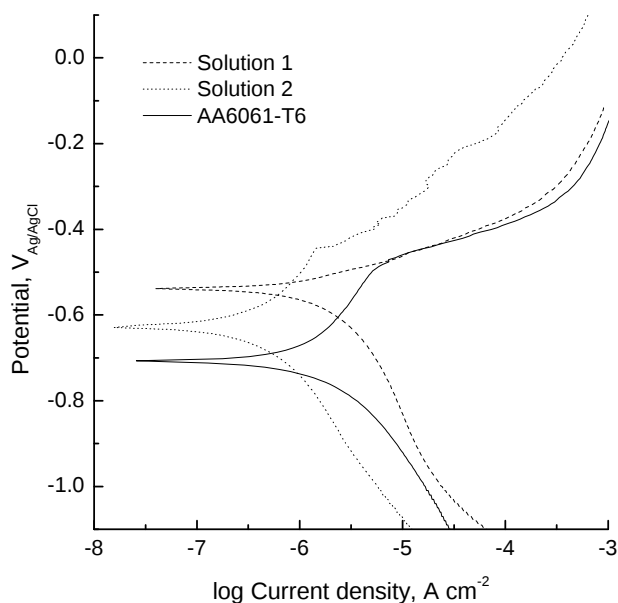


Figure 3. Potentiodynamic polarization for AA6061-T6 with and without treatment for 5 minutes in the conversion solution after 30 minutes in 0.01 M NaCl.

Electrochemical Impedance Spectroscopy (EIS)

Nyquist plots for treated and untreated samples evaluated in NaCl 0.01 M are shown in Figures 4 and 5. It is clear the presence of two capacitive loops, one is attributed to the conversion layer impedance and the other is due to the film porosity charge transfer resistance (R_{ct}). Most of the treated samples presented an improvement in the resistive and capacitive properties. In particular, NO_2^- addition allows an increase in the semicircle diameter of the second loop at medium and low frequencies regarding to coatings obtained with solution 1 and AA6061-T6, revealing higher R_{ct} .

Resistance values were calculated by fitting the EIS data to an equivalent circuit model that includes a resistor (R_{sol}) modeling the solution resistance in series with a constant phase element (CPE_1) in parallel with another resistor (R_{coat}) which correspond to the coating properties, and in series with a circuit constituted by CPE_2 and R_{ct} in parallel, that correlate the interaction between substrate and electrolyte and represent the double layer capacitance and charge transfer resistance. Constant phase elements were used instead of capacitors by the consideration of coating defects in the case of not perfect capacitors, which allow that ionic species and electrons cross the interface AA6061-T6/coating. This model was chosen because a cerium based coating consists in a compact but porous film. The same equivalent circuit was used to simulate the impedance spectrum of the untreated aluminum alloy assuming it has a thin film of Al_2O_3 , alumina/substrate.

Table III lists R_{sol} and R_{ct} obtained from the equivalent circuits described above. The experimental results are well matched with the equivalent circuits. At high frequencies R_{sol} is in a range of 343.3 to 415 $\Omega \text{ cm}^2$. The charge transfer resistance for the substrate was 12.593 $\Omega \text{ cm}^2$. The NO_2^- treated systems at 35 °C presented higher R_{ct} in various orders of magnitude compared with the substrate and it is more evident after 5 minutes of

treatment. Samples treated with solution 1, especially after 1 minute of treatment, are less effective and show poor corrosion resistance to the aluminum alloy. In the systems studied the impedance is proportional to the immersion treatment time in the conversion solution; hence, samples treated during 5 minutes in solution 2 seem to achieve the optimal corrosion resistance conditions. The variation of R_{ct} values can be related to the change in thickness, homogeneity and density of the coating; therefore, the charge transfer between the coating and solution becomes more difficult as a thicker and denser coating covers the sample surface. (16-22).

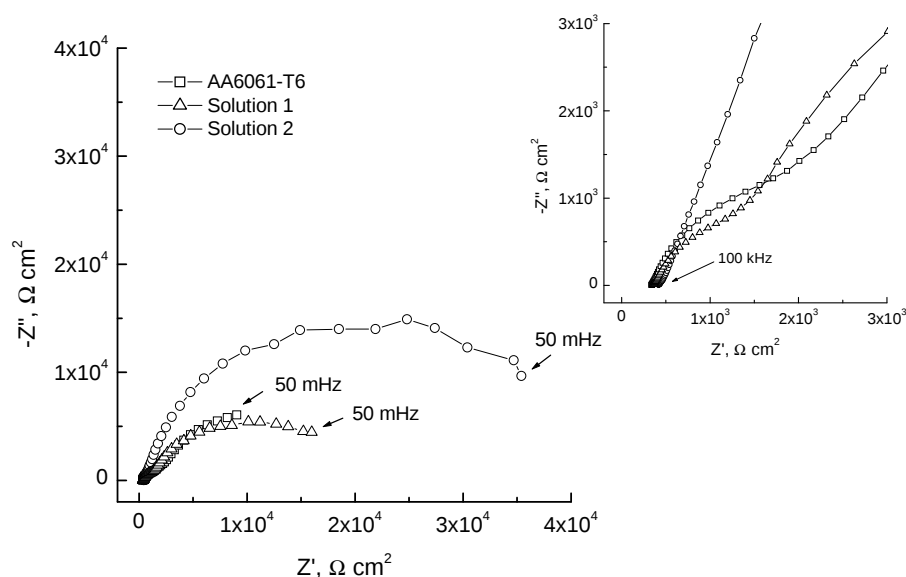


Figure 4. Nyquist diagrams at low and high frequencies for AA6061-T6 with and without treatment for 1 minute in the conversion solution after 30 minutes in 0.01 M NaCl.

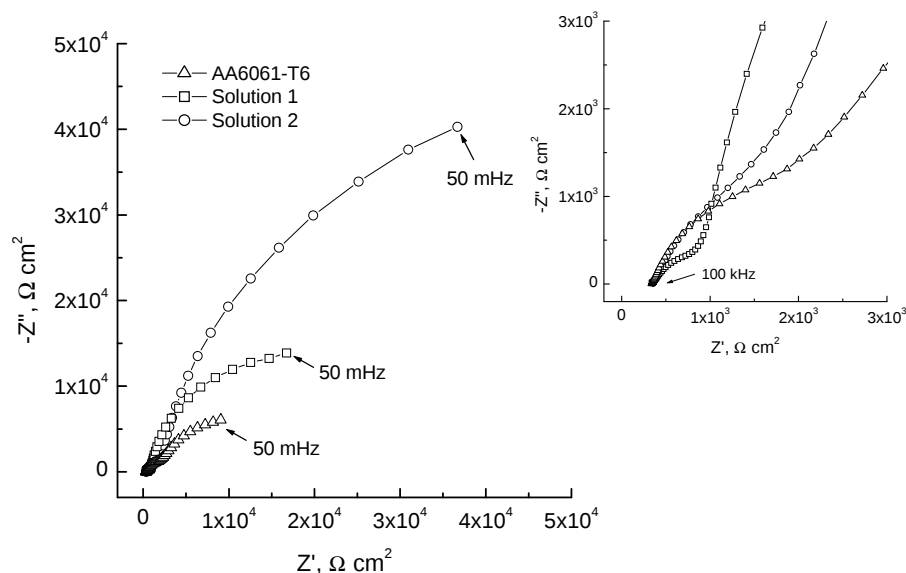


Figure 5. Nyquist diagrams at low and high frequencies for AA6061-T6 with and without treatment for 5 minutes in the conversion solution after 30 minutes in 0.01 M NaCl.

Table III. Parameters obtained from modeling of electrochemical impedance spectroscopy data for AA6061-T6 and cerium conversion coatings in 0.01 M NaCl solution.

Solution/Sample	Immersion time	Equivalent Circuit	$R_{sol}, \Omega \text{ cm}^2$	$R_{ct}, k\Omega \text{ cm}^2$
AA6061-T6	--	$R_{sol}\{CPE_1(R_p[CPE_2R_{ct}])\}$	344.1	12.593
1	1	$R_{sol}\{CPE_1(R_p[CPE_2R_{ct}])\}$	345.3	17.965
1	5	$R_{sol}\{CPE_1(R_p[CPE_2R_{ct}])\}$	343.3	39.175
2	1	$R_{sol}\{CPE_1(R_p[CPE_2R_{ct}])\}$	415	38.068
2	5	$R_{sol}\{CPE_1(R_p[CPE_2R_{ct}])\}$	360.4	109.110

Conclusion

From electrochemical analysis was concluded that samples treated with NO_2^- assisted solution (solution 2) showed better corrosion resistance behavior even for short times of treatment. A notable improvement in the corrosion current density (i_{corr}) and corrosion potential (E_{corr}) were obtained indicating a lower corrosion rate regarding to the untreated AA6061-T6. The optimal corrosion parameters were reached after 5 minutes of immersion in the conversion solution 2. This behavior is in agreement with the morphological features since the corrosion resistance can be related to the structure, uniformity, thickness of the protective film; NO_2^- addition favored the conversion coating formation kinetics providing an homogeneous deposition of the coating after 5 minutes of treatment.

Acknowledgements

The authors are grateful for the financial support provided by Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT).

References

1. Y. Kobayashi, Y. Fujiwara, *Electrochim. Acta*, **51**, 4236 (2006).
2. K. Brunelli, M. Dabala, I. Calliari, M. Magrini, *Corros. Sci.*, **47**, 989 (2005).
3. M. Dabalà, L. Armelao, A. Buchberger, I. Calliari, *Appl. Surf. Sci.*, **172**, 312 (2001).
4. S. Geng, S. Joshi, W. Pinc, W. G. Fahrenholtz, M. J. O'Keefe, T. J. O'Keefe, P. Yu, *NACE International's Tri-Service Corrosion Conference*, Denver, Co., (2007).
5. K. A. Korinek, *Chromate conversion coatings*, *Corrosion Vol. 13*, ASM International, p. 389, USA (1987).
6. R.G. Buchheit, A.E. Hughes, *Chromate and Chromate-Free Conversion Coatings*, *Corrosion: Fundamentals, Testing and Protection*, ASM International, 720, USA (1987).
7. A. Decroly, J.P. Petitjean, *Surf. Coat. Technol.*, **194**, 1 (2005).
8. H.J. Gibb., P.S.J. Lees, P.F. Pinsky, B.C. Rooney, *Am. J. Ind. Med.*, **38**, 115 (2000).
9. J. Hu, X.H. Zhao, S.W. Tang, M.R. Sun, *Coat. Surf. Tech.*, **253**, 3814 (2006).
10. B.R.W. Hinton, D.R. Arnott, N.E. Ryan, *Materials Forum*, **9**, 162 (1986).
11. B.R.W. Hinton, L. Wilson, *Corros. Sci.*, **29**, 967 (1989).
12. S.H. Hayes, P. Yu, T.J. O'Keefe, M.J. O'Keefe, W.G. Fahrenholtz, *J. Electrochem. Soc.*, **149**, C623 (2002).

13. C. Wang, F. Jiang, F. Wang, *Corrosion*, **60**, 237 (2004).
14. H. Ardelean, C. Fiaud, P. Marcus, *Mater. Corros.*, **52**, 889 (2001).
15. S. Böhm, R. Greef, H.N. McMurray, S.M. Powell, D.A. Worsley, *J. Electrochem. Soc.*, **147**, 3286 (2000).
16. Y. Kobayashi, N. Yamashita, Y. Fujiwara, M. Yamashita, *J. Surf. Fin. Soc, Jpn.*, **55**, 276 (2004).
17. J. F. Flores, J. J Olaya, R. Colás, S. Rodil, B. Valdez, I. Gómez de la Fuente, *Cor. Eng. Sci. Technol.*, **9**, 168 (2006).
18. G. Song, A. Atrens, *Adv. Eng. Mater.*, **1**, 11 (1999).
19. E. Cano, D.M. Bastidas, V. Argyropoulos, S. Fajardo, A. Siatou, J.M. Bastidas, C. Degrigny, *J. S. Stat. Electrochem.*, **14**, 453 (2010).
20. D. Loveday, P. Peterson, B. Rodgers, *J. Coat. Tech.*, **1**, 88 (2004).
21. J.M. Bastidas, J.L. Polo, C.L. Torres, E. Cano, *Corros. Sci.*, **42**, 275 (2000).
22. K. Brunelli, M. Dabala, I. Calliari, M. Magrini, *Corr. Sci.*, **47**, 989 (2005).

A3

Titulo: Generación Biológica de Hidrogeno por Rhodobacter Capsulatus Variedad B10 e IR3: Efecto de la Temperatura, Fuente de Luz e Intensidad Luminosa.

Autores: Cesar G. Iñiguez, Roumen Zlatev y Margarita Stoytcheva.

Congreso: 2do Congreso Nacional de Estudiantes de Posgrado del Instituto de Ingeniería, Instituto de Ingeniería-UABC, Maestría y Doctorado en Ciencias e Ingeniería (2010).

Generación Biológica de Hidrógeno por *Rhodobacter Capsulatus* Variedad B10 e IR3: Efecto de la Temperatura, Fuente de Luz e Intensidad Luminosa.

Cesar G. Iñiguez*, Roumen Zlatev² y Margarita Stoytcheva³

*E-mail: iniguezmonroy@prodigy.net.mx

Abstract

A laboratory protocol for the production of photosynthetic bio-hydrogen was developed. Two types of the bacteria *Rhodobacter capsulatus*, the wild type (B10) and a modified type (IR3), were used in this study.

Semi-flat glass jars were used as biological reactors. The biogas generated inside the bio-reactor, within an anoxygenic environment, was taken out of the reactor to a measurement device, immersed in a solution prepared for the separation of co-generated carbon dioxide in the biogas.

Hydrogen production rate, total production volume as well as substrate to hydrogen transformation efficiency, were evaluated. These experiments were carried out with a 75W tungsten filament lamp as light source. The evaluation was made as a function of the reactors to light source distance.

Results showed that the modified (IR3), type of bacteria has a better overall performance than the wild type.

In the other hand, experiments carried out with colored sun filters showed that the best performance was attained without filter, followed by red and green filters, in that order.

Geometry of reactor was found to have an effect on hydrogen production, since a semi-plane reactor with a higher surface to volume ratio performed better than a cylinder shaped reactor.

Keywords: Biological hydrogen, photosynthesis, reactor, light source, *Rhodobacter capsulatus*.

Resumen

Un protocolo para la producción de bio-hidrógeno fotosintético fue desarrollado. Dos tipos de la bacteria *Rhodobacter Capsulatus*, uno silvestre (B10), y el otro modificado (IR3); fueron utilizados en este estudio.

Frascos semiplanos de vidrio fueron utilizados como reactor. El biogás generado en el del biorreactor en condiciones anoxigénicas, fue transportado a un sistema de medición inmerso en una solución para la separación de dióxido de carbono generado.

La velocidad de producción de hidrógeno, el volumen total, así como la eficiencia de transformación de substrato en hidrógeno fueron evaluados. Estos experimentos fueron

realizados utilizando una lámpara de filamento de tungsteno, como fuente de iluminación. La evaluación fue efectuada en función de la distancia de los reactores a la fuente de luz. Los resultados muestran que la bacteria modificada tiene un mejor desempeño que la silvestre.

Por otro lado, experimentos realizados con el empleo de filtros de luz coloreados, mostraron que el mejor desempeño fue alcanzado por el reactor sin filtro, seguido por el reactor con filtro rojo y verde.

La geometría del reactor mostro un efecto importante sobre la producción de hidrógeno. Un reactor semiplano con un cociente de superficie a volumen mayor, tuvo un mejor desempeño que un reactor cilíndrico.

Palabras clave: Hidrógeno biológico, fotosíntesis, reactor, fuente de luz, *Rhodobacter capsulatus*.

1. Introducción

El hidrógeno tiene el mayor contenido energético por unidad de masa de todos los combustibles conocidos (142 kJ/g o 61000 BTU/lb) y puede ser transportado para consumo domestico e industrial por métodos convencionales. Su manejo es más seguro que el del gas natural. Es el único combustible libre de carbono, cuya oxidación produce solamente agua y puede ser utilizado directamente en una maquina de combustión, o bien en una celda de combustible [1-3]. Estas ventajas han generado un interés considerable en los vehículos de celda de combustible de hidrógeno entre los gobiernos y la industria automotriz [4]. El uso de métodos biológicos para la producción de hidrógeno deben reducir significativamente los costos de la energía, ya que estos procesos no requieren de calentamiento extenso o electricidad, como en las plantas de electrolisis [5,6]. Sin embargo, las velocidades reportadas de producción de biohidrógeno, la estabilidad de los sistemas y la eficiencia de estos procesos aun no son suficientes para hacerlos comercialmente viables [3].

La bacteria fotosintética *Rhodobacter capsulatus* es capaz de producir H_2 con rendimientos importantes en la luz[7, 3]. Esta foto-producción de H_2 es debida a la enzima nitrogenasa, la cual en ausencia de sustratos alternativos, es capaz de reducir protones a hidrógeno gas. Tanto condiciones anaerobias como altas intensidades de luz son requeridas, en adición a un sustrato efectivamente metabolizado . También se ha demostrado que cultivos mutantes pueden ser aislados y que han mostrado capacidades mejoradas de producción de hidrógeno comparadas con la variedad salvaje. La variedad mutante IR3 de esta bacteria ha demostrado una capacidad aumentada de producción sobre otras variedades mutantes y sobre la misma variedad salvaje B10 [8-10].

La productividad de este reactor está limitada por la luz, por lo cual una relación superficie/volumen de reactor alta es necesaria. Las eficiencias fotoquímicas son bajas (alrededor del 10%), y tienden a decrecer a medida que la intensidad de la luz crece (efecto de saturación de la luz[11,12].

La producción continua competitiva de bio-hidrógeno aun no ha sido lograda hasta el momento. Uno de los obstáculos consiste en que la salida de hidrógeno representa una pérdida de energía para la célula, mientras que la red metabólica microbiana ha

evolucionado para racionalizar el uso de energía [8-10]. Sin embargo, es posible utilizar la luz solar [13-14]; así como residuos alimenticios [15-20].

En este estudio se propone el estudio de la producción de hidrógeno de estos dos tipos bacterianos, con el objetivo de establecer las condiciones optimas de operación de un reactor biológico solar, con un substrato derivado de desechos alimenticios, de tal forma que pueda generar hidrógeno con un balance energético y financiero positivo.

2. Materiales y Métodos

2.1 Bacterias y Medio de Cultivo

Los microorganismos utilizados en este estudio fueron dos tipos diferentes de la bacteria *Rhodobacter Capsulatus*. El primero de ellos, el B10, corresponde a una variedad salvaje; mientras que el segundo, el IR3, corresponde a una modificación de la bacteria B10 [8-10]. Ambos microorganismos fueron donados por el Dr. J. P. Magnin, del Instituto Politécnico de Grenoble. El medio de cultivo utilizado contiene una base de sales minerales RCV [8-10], más un tampón fosfato. El substrato utilizado es el lactato de sodio DL en una concentración de 30 mM, mas L-glutamato de sodio en una concentración de 5 mM, como fuente de nitrógeno [7].

2.3 Reactores

Los reactores utilizados fueron de dos tipos. El primero, un reactor de vidrio de geometría cilíndrica, de 250 ml de capacidad total. El segundo, un reactor de vidrio de geometría semiplana, también de 250 ml de capacidad total.

Dos configuraciones de iluminación distintas fueron utilizadas. La primera de ellas consistió en una lámpara de filamento de tungsteno de 75 watts de potencia, ensamblada en un deflector de luz de aluminio. La luz fue dirigida hacia el interior de una incubadora, donde fueron colocados los reactores en pares B10/IR3 a una intensidad de luz equivalente. La segunda configuración consistió en un par de lámparas de filamento de tungsteno de 75 watts de potencia cada una, colocada una al lado de la otra, en el interior de una incubadora. En el interior de la incubadora fueron identificadas líneas de iluminación constante. Con esta configuración la distribución de la luz en el interior de la incubadora fue más uniforme, de forma tal que fue posible colocar hasta cuatro reactores expuestos a una iluminación equivalente

2.5 Preparación de Experimentos

Los experimentos de comparación entre los tipos B10 e IR3, así como la comparación entre geometrías de reactor; fueron llevados a cabo con la configuración de iluminación de lámpara con deflector. Por otro lado, los experimentos realizados con filtros de luz, fueron llevados a cabo con la configuración de iluminación de dos lámparas sin deflector.

El medio de cultivo y los reactores fueron esterilizados dentro de una autoclave. Nitrógeno gas fue burbujeado en el seno del liquido para mantener una atmosfera anoxigénica.

Posteriormente, solo una aguja fue dejada dentro del sistema, a la cual fue conectada una manguera destinada a transportar el biogás hasta el sistema de medición. Este sistema fue construido con una probeta graduada colocada con la boca hacia abajo en el seno de un

líquido conteniendo hidróxido de calcio. La manguera fue insertada dentro de la probeta con el objetivo de burbujear el biogás generado en el reactor, y eliminar el dióxido de carbono presente a través de la reacción de formación de carbonato de calcio insoluble.

3. Resultados y Discusión

La figura 1 muestra los resultados obtenidos de absorbancia de luz a una longitud de onda de 660nm, con respecto al tiempo. Las curvas de crecimiento muestran básicamente tres etapas, una de crecimiento lento o adaptación, seguida por una etapa de crecimiento rápido y finalmente una etapa estacionaria. Este comportamiento es el mismo cualitativamente para ambos tipos de bacteria. Sin embargo, en la etapa estacionaria la absorbancia de luz de los cultivos silvestres es mayor a la absorbancia de los cultivos modificados, lo cual sugiere una mayor población bacteriana. Los resultados de medición de biomasa con respecto al tiempo (figura 1), confirman los resultados obtenidos con absorbancia. Esta menor población de la bacteria IR3 sugiere que el consumo de medio nutritivo es menor, y que eventualmente la producción de biogás podría ser mayor. La observación cualitativa de los cultivos en este estudio muestra que la generación de burbujas, la cual es un efecto de la producción de biogás; comienza precisamente al inicio de la etapa estacionaria de crecimiento de ambos tipos de bacteria.

Por otro lado, los experimentos de producción y medición de hidrógeno, muestran que efectivamente bajo las condiciones de experimentación ya definidas; la bacteria modificada produce un volumen de hidrógeno mayor (figura 2). Asimismo, los datos de velocidad promedio de cada intervalo de puntos fueron calculados y reportados en la tabla 1. La velocidad máxima de producción de hidrógeno es mayor para la bacteria silvestre. Sin embargo, la velocidad promedio de generación de hidrógeno es mayor para el caso de la bacteria modificada (2.27 ml/hr), que el de la bacteria silvestre (1.60 ml/hr). Estos datos son consistentes con los datos del volumen total generado (tabla 1).

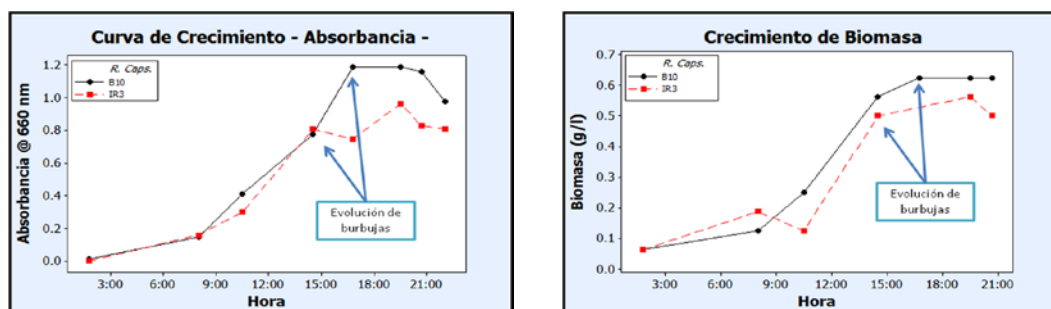


Figura 1. Curvas de crecimiento bacteriano relacionado a la absorbancia(izquierda) y biomasa(derecha), para la bacteria *R. Capsulatus* tipos B10 e IR3. La población de bacterias del tipo B10 es mayor a la población de bacterias tipo IR3, cuando ambas se encuentran en la etapa de crecimiento estacionario.

La tabla 1 muestra además los rendimientos de conversión de sustrato en hidrógeno; en función de la distancia de los reactores a la fuente de luz. Para cada una de las distancias evaluadas, el rendimiento de conversión es mayor para la bacteria modificada.

Por otro lado, el promedio del rendimiento de conversión se incrementa con la distancia de los reactores respecto a la fuente de luz (figura 3). Estos resultados establecen que la intensidad de la luz recibida es un factor importante en la capacidad productora de hidrógeno de la bacteria *R. capsulatus* tipos B10 e IR3.

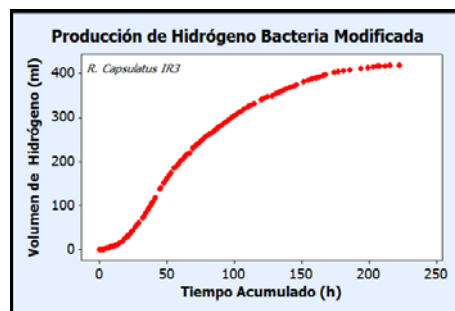
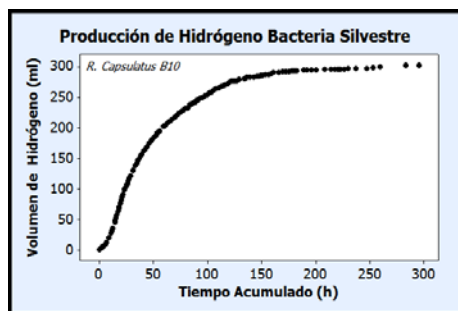


Figura 2. Gráfica de volumen generado de hidrógeno(ml), en función del tiempo(h), durante los experimentos realizados con lámpara de filamento de tungsteno como fuente de luz, para la bacteria tipo silvestre(a), y la bacteria modificada(b). Los reactores fueron colocados a una distancia de 50 cm de la fuente de iluminación.

Asimismo, los datos sugieren la presencia de foto-saturación [11-14], cuando la intensidad luminosa alcanza un límite, y que es posible encontrar un punto máximo de producción antes de alcanzarlo.

Tabla 1. Izquierda: Resultados de las pruebas de producción de hidrógeno con luz de filamento de tungsteno y un deflector de luz. La bacteria modificada IR3 muestra un mejor desempeño con respecto a la bacteria silvestre B10. Derecha: Resultados de las pruebas de producción de hidrógeno con luz de filamento de tungsteno sin deflector de luz. Las pruebas fueron realizadas aplicando filtros de colores a la superficie de los reactores y solo con la bacteria modificada IR3. El reactor sin filtro mostro un mejor desempeño.

VARIABLES RESPUESTA	B10	IR3	B10	IR3	B10	IR3
Velocidad Máxima de producción de H ₂	5.79	5.40	6.90	6.51	0.00	6.67
Volumen Total producido (ml)	302	419	135	246	0	128
Velocidad promedio de producción de H ₂	1.60	2.27	1.40	2.29	0.00	2.82
Rendimiento de conversión de sustrato	30.1	41.7	13.4	24.5	0.0	12.7

Color de Filtro	Sin Filtro	Rojo	Verde	Azul
Volumen Total producido (ml)	250.0	178.6	132.2	0
Velocidad promedio de producción de H ₂ (ml/hr)	2.971	2.210	1.860	0
Rendimiento de conversión de sustrato	26.40	18.86	13.96	0.000

Sin embargo, los resultados de la velocidad de producción en función de la distancia indican para la bacteria modificada, que la velocidad disminuye con la distancia(figura 3). Estos resultados sugieren que una mayor intensidad luminosa puede promover una mayor producción de hidrógeno al inicio, pero inhibe a la misma en el corto plazo, por lo cual una disminución posterior de la intensidad de la luz podría evitar el fenómeno de foto-saturación. Por otro lado, este fenómeno podría ser reducido mediante una agitación constante, ya que mientras las capas de bacterias cercanas a la luz reciben una intensidad alta, lo cual las conduciría a una saturación rápida; las capas interiores recibirían una intensidad menor, evitando así la foto-saturación. En el caso de la bacteria B10, a una distancia de 10 cm no hubo producción de biogás. Un factor que interacciona con la intensidad luminosa es la temperatura del reactor, ya que a una distancia de 10 cm, la temperatura de los reactores fue de 42 a 45°C. A esta temperatura, solo la bacteria modificada pudo alcanzar la etapa estacionaria de crecimiento, para continuar con la producción de biogás. Estos resultados indican que es necesario realizar experimentos para conocer la influencia de la intensidad luminosa y la temperatura, de forma simultánea. Los resultados de producción de hidrógeno en función del tiempo para las pruebas realizadas a una intensidad de 5000 lux, con la bacteria tipo IR3, utilizando filtros de luz; son mostrados en la figura 4. El reactor con el filtro de color azul no produjo biogás. El

volumen de hidrógeno y el rendimiento de conversión mayores fueron encontrados en el reactor sin filtro de luz (tabla 1). El reactor sin filtro también mostro la velocidad de producción de luz más alta. Por otro lado, el reactor con el filtro de color rojo resulto con una mayor producción de hidrógeno que el reactor con el filtro verde.

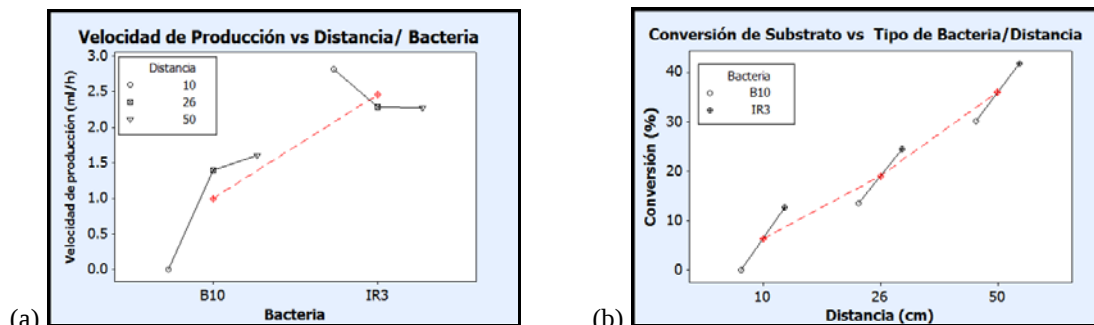


Figura 3. (a) Relación entre la velocidad de producción y la distancia de los reactores a la fuente de luz; para cada tipo de bacteria. (b) Relación entre la conversión de sustrato en hidrógeno y la distancia de los reactores a la fuente de luz, por tipo de bacteria.

Además, los resultados de producción de hidrógeno del reactor sin filtro, son consistentes con los resultados obtenidos en experimentos previos con lámpara de tungsteno utilizando deflector de luz, lo cual sugiere que a condiciones iguales de intensidad luminosa, las bacterias muestran la misma capacidad productora de hidrógeno, aun cuando la distancia del reactor a la fuente de luz fue mayor para el caso de la lámpara con deflector.

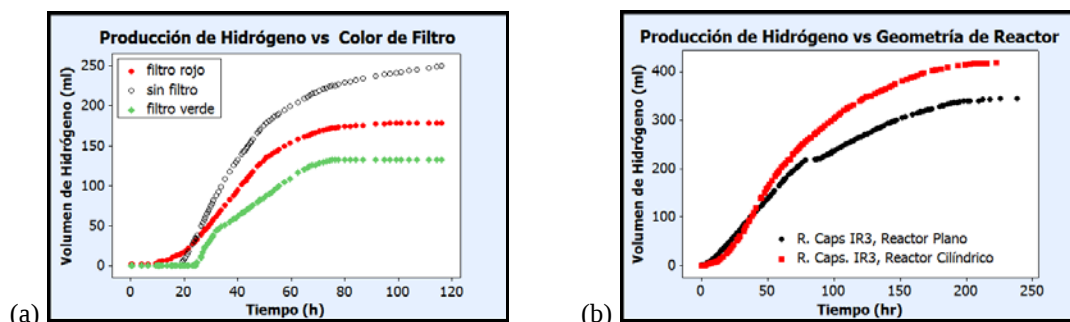


Figura 4. (a) Producción comparativa de hidrógeno cuando se aplica un filtro de color a la superficie del reactor. El reactor sin filtro muestra un mejor desempeño; (b) producción de hidrógeno comparativa para experimentos con la bacteria IR3, con una lámpara con filamento de tungsteno de 75W con deflector; variando la geometría del reactor. La geometría semiplana (línea roja), muestra un mejor desempeño que la geometría cilíndrica.

Finalmente, los resultados de las pruebas realizadas con dos diferentes geometrías de reactor, con una lámpara de filamento de tungsteno, a una distancia de 50 cm, solo con la bacteria modificada, mostraron que el mayor volumen de hidrógeno fue generado en el reactor semiplano (419 ml vs 344 ml generados en el reactor cilíndrico). La velocidad promedio de producción fue de 2.27 ml/hr para el reactor semiplano vs 1.9 ml/hr para el reactor cilíndrico. Finalmente, el rendimiento de conversión de sustrato fue de 41.7% para el reactor semiplano, y 31.2% para el cilíndrico.

4. Conclusiones y Recomendaciones

Los resultados de las curvas de crecimiento, sugieren que la bacteria tipo salvaje consume más sustrato antes de iniciar el proceso de generación de biogás.

La bacteria *R. capsulatus* IR3 tiene una mayor capacidad de producción de hidrógeno, ya que tanto la velocidad promedio de producción, como el volumen total generado y el rendimiento de conversión a sustrato son mayores en los reactores que contienen este tipo de microorganismo. Por otro lado, el promedio del rendimiento de conversión se incrementa con la distancia de los reactores respecto a la fuente de luz. Este hecho sugiere la aparición de foto-saturación y que es posible maximizar la generación de biohidrógeno a través del análisis de curvas de producción en función de la intensidad de la luz incidente.

Por otro lado, la velocidad promedio de producción fue más alta cuando el reactor se encontraba en la distancia mínima, aunque la producción total fue menor que en reactores más alejados. Esta información sugiere que posible entonces realizar ciclos de luz de intensidad alta a intensidad baja, con la finalidad de maximizar la velocidad de producción evitando la presencia de la saturación luminosa. Es necesario además evaluar la influencia de la temperatura en la producción de hidrógeno, cuando la intensidad luminosa también es modificada.

La producción de hidrógeno es mayor cuando no se coloca un filtro de luz a la superficie del reactor; aunque la producción en el caso del reactor con filtro rojo fue mayor a la del reactor con filtro verde. El reactor con filtro azul no generó hidrógeno. Los resultados obtenidos con diferentes configuraciones de lámparas son los mismos cuando los reactores son colocados en puntos donde la intensidad luminosa es la misma, independientemente de la distancia a la fuente.

Finalmente, los resultados obtenidos en reactores de diferente geometría nos indican que el empleo de reactores que tienen una relación superficie/volumen mayor, tiende a incrementar la producción de hidrógeno.

Agradecimientos

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, por el otorgamiento de la Beca de Doctorado #89724; así como por la extensión de la misma por un año.

Al Dr. Jean Pierre Magnin, del Politécnico de Grenoble y al Dr. Mario Velásquez, de la Universidad Nacional de Colombia (UNAL), por la donación de las cepas B10 e IR3. Al Dr. Roumen Zlatev y la Dra. Margarita Stoytcheva, Director y Co-Director de tesis respectivamente, por sus valiosas contribuciones en el desarrollo experimental y análisis de resultados.

Referencias

- [1] Qadrdan M, Saboohi Y and Shayegan J. A model for investigation of optimal hydrogen pathway, and evaluation of environmental impacts of hydrogen supply system. International Journal of Hydrogen Energy 2008; 33, 7314-7325.
- [2] Davila, G; Arriaga, S; Alatríste, F; De Leon, A; Rosales, L. and Razo, E., 2008. Fermentative biohydrogen production: trends and perspectives. Rev. Environ. Sci. Biotechnol., 7:27-45

- [3] Das, D and Veziroglu, T. Advances in biological hydrogen production processes. International Journal of Hydrogen Energy 2008; 33: 6046-6057.
- [4] Martin, E; Shaheen, S; Lipman, T. and Lidicker, J. Behavioral response to hydrogen fuel cell vehicles and refueling: Results of California drive clinics. International Journal of Hydrogen Energy 2009; XXX, I-II (article in press).
- [5] Society for General Microbiology. Microbiology Today Magazine, Life's a gas...and it's hydrogen. Issue August 2008.
- [6] Maeda, T; Sanchez, V. and Wood, T., 2007. Metabolic engineering to enhance bacterial hydrogen production. Microbial Biotechnology. Journal compilation © 2007 Society for Applied Microbiology and Blackwell Publishing Ltd.
- [7] Zlatev, R. Rapport Scientifique, Laboratoire d' Electrochimie et de Physico-Chimie des Matériaux et Interfaces, Equipe de Génie des Procédés Appliqués à l'Energie et à l'Environnement, GP2E. 2005.
- [8] WILLISON, J; Madern, D. and Vignais, P. Increased photoproduction of hydrogen by non-autotrophic mutants of *Rhodospseudomonas capsulate*. Biochem. J. 1984; 219: 593-600
- [9] He, D; Bultel, Y; Magnin, J; Roux, C. and Willison, J. Hydrogen photosynthesis by *Rhodobacter capsulatus* and its coupling to a PEM fuel cell. Journal of Power Sources 2005; 141: 19-23.
- [10] Vignais, P; Magnin, J. and Willison, J. Increasing biohydrogen production by metabolic engineering. International Journal of Hydrogen Energy 2006, 31, 1478 – 1483.
- [11] Akkerman, I; Janssen, M; Rocha, J. and Wijffels, R. Photobiological hydrogen production: photochemical efficiency and bioreactor design. International Journal of Hydrogen Energy 2002, 27, 11-12, 1195-1208.
- [12] Asada, Y. and Miyake, J. Photobiological Hydrogen Production. Journal of Bioscience and Bioengineering 1999, 88, No. 1, 1-6.
- [13] Miyake, J; Wakayama, T; Schnackenberg, J; Arai, T. and Asada Y. Simulation of daily sunlight illumination pattern for bacterial photo-hydrogen production. J. Biosci. Bioeng. 1999; 88:659–63.
- [14] Wakayama, T. and Miyake, J. Light shade bands for the improvement of solar hydrogen production efficiency by *Rhodobacter sphaeroides* RV. International Journal of Hydrogen Energy. 2002; 27:1495–500.
- [15] Kapdan, I. And Kargi, F. Bio-hydrogen production from waste materials. Enzyme and Microbial Technology. 2006; 38: 569–582.
- [16] Mohan, S; Babu, V. and Sarma, P. Anaerobic biohydrogen production from dairy wastewater treatment in sequencing batch reactor (AnSBR): Effect of organic loading rate. Enzyme and Microbial Technology 2007, 41, 4, 3 September 2007, 506-515.
- [17] Datar, R; Huang, J; Maness, P; Mohagheghi, R; Czernik, S. and Chornet, E. Hydrogen production from the fermentation of corn stover biomass pretreated with a steam-explosion process. International Journal of Hydrogen Energy 2007, 32, 8, 932-939.
- [18] Yokoi, H; Maki, R; Hirose, J. and Hayashi, S. Microbial production of hydrogen from starch manufacturing wastes. Biomass and Bioenergy 2002, 22, 5, Pages 389-395.
- [19] Eroglu, E; Gündüz, F; Yücel, M; Türker, L. and Eroglu, I. Photobiological hydrogen production by using olive mill wastewater as a sole substrate source. International Journal of Hydrogen Energy 2004, 29, 2, February 2004, 163-171.

[20] Gomez, X; Moran, A; Cuetos, M. and Sanchez, M. The production of hydrogen by dark fermentation of municipal solid wastes and slaughterhouse waste: A two-phase process. *Journal of Power Sources* 2006, 157, 727–732.

A4

Titulo: Diseño de un Reactor Solar para la Producción de Hidrogeno con Desechos Alimenticios.

Autores: Cesar Gonzalo Iñiguez Monroy, Roumen Koytchev Zlatev y Margarita Stilianova Stoytcheva.

Congreso: 1er Congreso Nacional de Estudiantes de Posgrado del Instituto de Ingeniería, Instituto de Ingeniería-UABC, Maestría y Doctorado en Ciencias e Ingeniería (2009).

Diseño de un Reactor Solar para la Producción de Hidrógeno con Desechos Alimenticios

Cesar Gonzalo Iñiguez Monroy¹, Roumen Koytchev Zlatev², Margarita Stilianova Stoytcheva³

¹Instituto de Ingeniería, Universidad Autónoma de Baja California, Mexicali, México,
e-mail iniguezmonroy@prodigy.net.mx

²Instituto de Ingeniería, Universidad Autónoma de Baja California, Mexicali, México,
e-mail roumen_zlatev@iing.mxl.uabc.mx

³Instituto de Ingeniería, Universidad Autónoma de Baja California, Mexicali, México,
e-mail margarita@iing.mxl.uabc.mx

RESUMEN

Un reactor cilíndrico de lecho empacado con perlas de vidrio fue diseñado para producir hidrógeno biológicamente, a partir de desechos alimenticios como sustrato y luz solar como fuente de energía; en la zona desértica de la ciudad de Mexicali, B.C. Asimismo, los sistemas de agitación del reactor, control de la temperatura, direccionamiento solar y medición de hidrógeno fueron desarrollados. Este reactor fue diseñado tomando en cuenta la necesidad de obtener hidrógeno con un balance energético-financiero positivo. El uso de energía solar para la fotosíntesis de la bacteria *Rhodobacter capsulatus*; el empleo de desechos alimenticios como sustrato; el uso de accesorios de bajo consumo de energía eléctrica y la utilización de paneles solares para el suplemento de dicha energía; constituyen factores de diseño de este biorreactor, los cuales favorecen un balance energético-financiero positivo. Asimismo, el hidrógeno obtenido en el método propuesto es renovable y ambientalmente amigable.

La cepa *R. capsulatus* ATCC 33303 fue desarrollada y tanto su crecimiento como su morfología fueron caracterizadas. Finalmente, la cepa mutante *R. capsulatus* IR3 fue inoculada en un medio de cultivo específico, para ser utilizada en el biorreactor. Esta cepa ha demostrado tener una capacidad superior de producción de hidrógeno.

Palabras clave: Biohidrógeno, Reactor Solar, *Rhodobacter capsulatus*.

1. INTRODUCCION

El uso de grandes cantidades de combustibles fósiles como fuente primaria de energía ha llevado a una crisis energética seria y a impactos ambientales adversos en una escala global [1]. El incremento de la concentración de CO₂ en la atmósfera está considerado la causa principal del calentamiento global y cambio climático [2]. Aunado a esto, asuntos relacionados con la seguridad energética en diversas regiones del mundo han motivado a los gobiernos a buscar un sistema proveedor de energía sustentable, segura y ambientalmente amigable. Entre las diferentes alternativas, el hidrógeno es de particular interés, debido a su abundancia, renovabilidad y ausencia de emisiones contaminantes durante su combustión [1].

El hidrógeno tiene el mayor contenido energético por unidad de masa de todos los combustibles conocidos (142 kJ/g o 61000 BTU/lb) y puede ser transportado para consumo doméstico e industrial por métodos convencionales. Su manejo es más seguro que el del gas natural. Es el único combustible libre de carbono, cuya oxidación produce solamente agua y puede ser utilizado directamente en una máquina de combustión, o bien en una celda de combustible [3]. Estas ventajas han generado un interés considerable en los vehículos de celda de combustible de hidrógeno entre los gobiernos y la industria automotriz [4]. Actualmente, el hidrógeno es producido en un 40% del gas natural, 30% de aceites pesados y nafta, 18% del carbón y 4% de la electrolisis [3].

Una multitud de microorganismos han desarrollado la habilidad para derivar energía a partir del hidrógeno. Sin embargo, existen circunstancias bajo las cuales los microorganismos no tienen otra opción para ganar energía, que la de liberar hidrógeno al ambiente [5]. El uso de métodos biológicos para la producción de hidrógeno deben reducir significativamente los costos de la energía, ya que estos procesos no requieren de calentamiento extenso (o electricidad, como en las plantas de electrolisis) [6].

La capacidad para la producción de biohidrógeno está asociada con la actividad de las enzimas hidrogenasa y nitrogenasa, pero son pocas las clases que pueden llevar a cabo la producción de este biogás. Entre ellas están las bacterias fermentativas y las bacterias fotosintéticas [5]. La bacteria fotosintética *Rhodobacter capsulatus* es capaz de producir H_2 con rendimientos importantes en la luz. Esta foto-producción de H_2 es debida a la enzima nitrogenasa, la cual en ausencia de sustratos alternativos, es capaz de reducir protones a hidrógeno gas. Tanto condiciones anaerobias como altas intensidades de luz son requeridas, en adición a un sustrato efectivamente metabolizado [7]. También se ha demostrado que cultivos mutantes pueden ser aislados y que han mostrado capacidades mejoradas de producción de hidrógeno comparadas con la variedad salvaje. La variedad mutante IR3 de esta bacteria ha demostrado una capacidad aumentada de producción sobre otras variedades mutantes y sobre la misma variedad salvaje B10 [8].

La utilización de efluentes industriales para la producción de hidrógeno gaseoso mediante bacterias fotosintéticas es posible, aunque estos cultivos prefieren ácidos orgánicos como fuentes de carbono [9]. Uno de los principales problemas en el uso de efluentes industriales es el color de los desechos, lo cual puede limitar la penetración de la luz. La concentración alta de amoníaco puede ser otro problema, la cual inhibe a la enzima nitrogenasa, reduciendo la productividad de hidrógeno. Alto contenido de materia orgánica, así como la presencia de compuestos tóxicos en los efluentes industriales podrían requerir pretratamiento antes de la producción de hidrógeno [9]. Diversos medios de cultivo, comúnmente productos de desecho han sido propuestos. Entre otros están el uso de desechos de la industria lechera [10], rastrojo de maíz [11], almidón [12], aceite de palma [13], aceite de oliva [14], desechos municipales, y rastros [15].

Otra fuente de optimización en la producción de H_2 se encuentra en el diseño de biorreactores, los cuales maximicen la absorción de luz por parte de las bacterias; ya sea mediante agitación o mediante el incremento del área superficial con respecto al volumen del reactor en un reactor de panel plano [16]. Entre los diversos diseños se encuentran el reactor batch de secuenciación SBR [10], microfiltración de membrana [17]; de flujo ascendente 'upflow' [18]; fotobiorreactores de columna [19], foto-biorreactor flotante [20]. La mayor parte de fotobiorreactores desarrollados para la producción de hidrógeno son tubulares, de panel plano y de columna burbujeante [9]. También han sido utilizados sistemas de células inmovilizadas con matrices sólidas como 'carrageenan', agar, vidrio poroso y poliuretano espumado [3]. La

eficiencia fotoquímica, la cual tiene un máximo teórico de 10%, juega un papel importante en la producción de hidrógeno [21]. Intensidades altas de iluminación provocan menores rendimientos de conversión de la luz, pero mayores velocidades de producción de H₂. Sin embargo, la luz en exceso puede desencadenar una foto-inhibición, disminuyendo la velocidad de producción [9].

En relación a la producción solar de hidrógeno, la eficiencia de conversión de luz puede disminuir durante el mediodía, debido a la alta intensidad [22]. La inclusión de bandas de sombreado demostró un incremento en la eficiencia de producción solar de hidrógeno durante el mediodía, evitando la foto-inhibición [23]. Los ciclos de luz/oscuridad inducidos por el mezclado, cuando se encuentran en el rango de micro o milisegundos, pueden mejorar la eficiencia fotoquímica [21].

Para el caso de las bacterias púrpura, la ventana de Radiación Fotosintética Activa PAR, se encuentra entre los 400 y los 950 nm y el 65.8% de la radiación solar se encuentra en esta ventana. Además, la magnitud de la radiación solar depende del lugar geográfico y las condiciones climáticas [21].

2. MATERIALES Y METODOS

Las bacterias utilizadas en este estudio son las siguientes:

1. *Rhodobacter capsulatus*, variedad salvaje B10 (ATCC 33303).
2. *Rhodobacter capsulatus*, variedad salvaje B10 (cultivada en medio RCV [24]). Esta bacteria fue donada por el Dr. Jean Pierre Magnin, y cultivada en las instalaciones del Laboratorio de Ingeniería Química de la Universidad Nacional de Colombia (UNAL), en convenio con la Universidad Autónoma de Baja California (UABC).
3. *Rhodobacter capsulatus* variedad mutante aislada IR3 (cultivada en medio RCV). [7, 24]. Esta bacteria fue aislada en el laboratorio LEPMI ENSEEG de la Universidad de Grenoble (Francia), donada por el Dr. Jean Pierre Magnin, y cultivada en las instalaciones del Laboratorio de Ingeniería Química de la UNAL, en convenio con la UABC.

El medio utilizado para el mantenimiento de la bacteria y la producción de hidrógeno de la variedad salvaje ATCC 33303, fue un medio de sales minerales denominado ATCC 1139, con ácido málico como fuente de carbono. Adicionalmente, este medio fue enriquecido con extracto de levadura y peptona de caseína.

El medio utilizado para la producción de hidrógeno de las variedades B10 e IR3 fue el RCV de sales minerales, enriquecido con DL- lactato como fuente de carbono y L-glutamato como fuente de nitrógeno [He]. La cepa IR3 es capaz de convertir este sustrato con una eficiencia del 84.8%, y un rendimiento de producción de hidrógeno de 3.9 L/L de cultivo [24]. Esta eficiencia de conversión de sustrato es la más alta entre las bacterias foto-fermentativas [9].

Las bacterias fueron inoculadas en viales de vidrio transparente de 10 ml. De un medio de cultivo con bacteria desarrollada, fueron tomados 1000 µl en condiciones asépticas y trasladados a un vial con 9 ml de medio de cultivo RCV enriquecido con lactato y glutamato, previamente esterilizado. El vial fue cerrado y agitado para homogenizar el contenido y exponerlo a la luz. La exposición a la luz de los viales con bacteria fue realizada en una cámara oscura (figura 1), con una lámpara de sodio de 600 W, a una distancia de 40 cm.

Un espectrofotómetro UV-Vis será utilizado para medir la absorbancia del medio de cultivo y caracterizar el crecimiento bacteriano, a una longitud de onda de 580 nm.

El cuerpo del reactor será construido con plexiglás comercial, y el empaque de perlas de vidrio común. Una bomba de rotor magnético operada a 12V será utilizada para recircular el

medio líquido a través de una manguera multicapa descrita en detalle en la siguiente sección. Los materiales tales como acero, plexiglás, cables de conexión, bombas, etc., serán de postconsumo.

3. RESULTADOS Y DISCUSION

3.1 Diseño del Reactor

El diseño propuesto del reactor puede ser subdividido en los siguientes sistemas: a) reactor (lecho empacado de flujo laminar); b) sistema de control de la temperatura; c) sistema de iluminación solar; d) sistema de agitación; y e) sistema de recolección de biogás (fig.1). El biorreactor propuesto será del tipo continuo, con geometría cilíndrica de lecho empacado con perlas de vidrio. El empacado del reactor se incluye con el propósito de incrementar la profundidad de la penetración de la luz solar. Al mismo tiempo tiene el objetivo de crear una película líquida de flujo laminar alrededor de cada perla, para la verificación de la reacción biológica. Finalmente, el flujo de recirculación permitirá la homogenización del caldo de reacción.

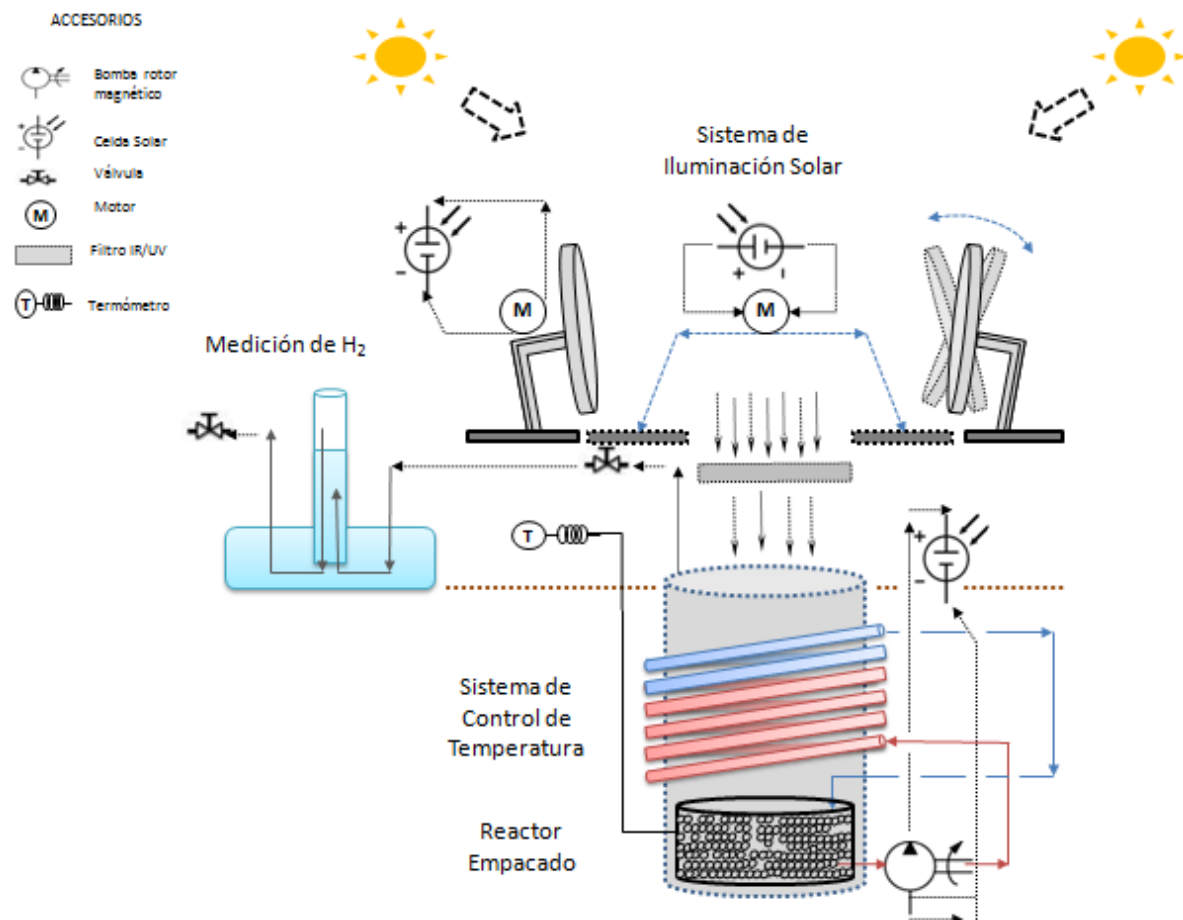


Figura 1. Esquema general del diseño del reactor de producción de hidrógeno y sus subsistemas.

El reactor será colocado en un orificio cavado en la tierra de forma perpendicular a la superficie. La geometría del orificio es cilíndrica, de 40 cm de diámetro por 120 cm de profundidad. El fluido dentro del reactor será recirculado a través de un serpentín de manguera

multicapa PEX-Al-PEX de 0.5 in de diámetro interno, colocada de forma subterránea con el objetivo de reducir la temperatura en el interior del reactor (fig. 1). El sistema de recolección de hidrógeno consistirá en un recipiente de vidrio de forma cilíndrica alargada, colocado con la apertura hacia abajo. El tubo estará parcialmente lleno de una solución salina de sodio, con el objetivo de hacer reaccionar el dióxido de carbono que pueda formarse junto con el hidrógeno, debido a la presencia de oxígeno disuelto en el medio. El volumen de hidrógeno generado estará dado por el volumen desplazado de la solución salina en el interior del tubo invertido (fig. 1).

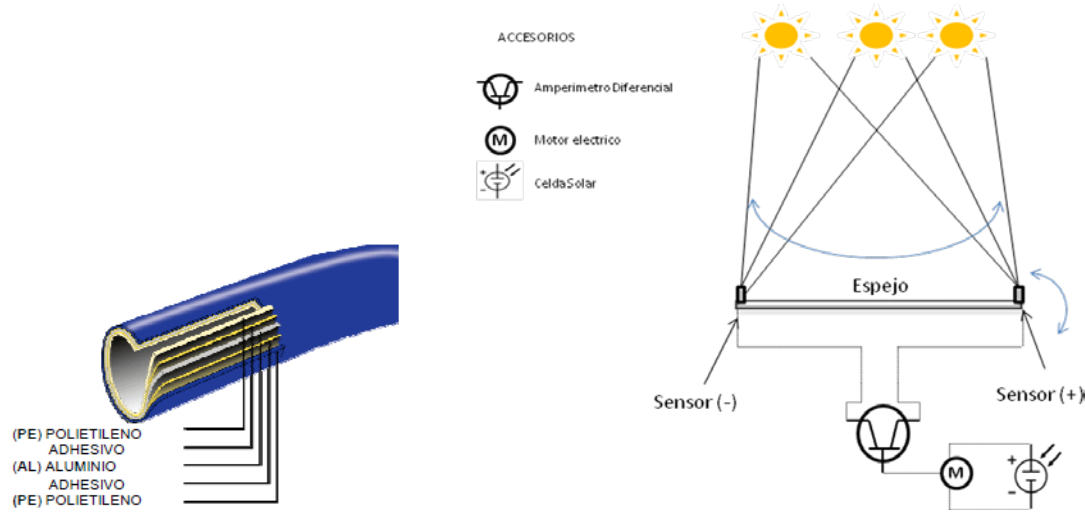


Figura 2. Detalle de la manguera multicapa que es parte del sistema de enfriamiento propuesto en este diseño (izquierda). Sistema de direccionamiento de la luz solar (derecha).

El medio de cultivo será impulsado por una bomba de rotor magnético, a un potencial de operación de 10V. La energía para la operación de esta bomba procederá de una celda solar, con el propósito de mantener la sustentabilidad del sistema y al mismo tiempo mantener los costos de operación bajos. Con el propósito de evitar los problemas potenciales de contaminación y muerte bacteriana por corrosión, una tubería PEX-Al-PEX, la cual es una tubería multicapa de polietileno reticulado liso y aluminio (fig. 2). La capa interna de polietileno reticulado evita la formación de fuentes contaminantes tales como la corrosión, y al mismo tiempo provee una superficie que evita la adherencia de bacterias. Además de eso, este material provee resistencia a diversos ácidos y álcalis. La capa interna de aluminio evita la permeabilidad del aire hacia el interior del tubo, y mejora la transferencia de calor a través de la pared del mismo. La energía luminosa será llevada al interior del reactor con ayuda de un espejo móvil. La señal de movimiento del espejo será generada por dos sensores fotosensibles colocados en los extremos del espejo. Un amperímetro diferencial determinará la dirección del movimiento en dos coordenadas diferentes (fig. 2).

3.2 Cepas Microbianas

Las cepas cultivadas en los viales de vidrio mostraron un crecimiento visible después de 48 h de haber sido inoculados. Durante la etapa de desarrollo bacteriano, los tubos fueron expuestos a la luz de una lámpara de sodio en una cámara oscura. El enturbiamiento del medio de cultivo dentro de cada tubo y el color característico marrón pudieron también ser observados.

Por otro lado, la variedad salvaje B10 ATCC 33303 fue cultivada en el medio ATCC 1139 enriquecido con extracto de levadura y peptona de caseína. La absorbancia del medio fue medida a 580 nm en función del tiempo. La *figura 3* muestra la curva de absorbancia en función del tiempo obtenida, después del enriquecimiento del medio ATCC 1139 con extracto de levadura y peptona de caseína. Antes del enriquecimiento solo fue posible observar una absorbancia constante igual a la del blanco (medio de cultivo sin inóculo). Es posible observar después de la fase de adaptación un crecimiento exponencial cuya duración es de aproximadamente 30 h., seguida de la fase estacionaria.

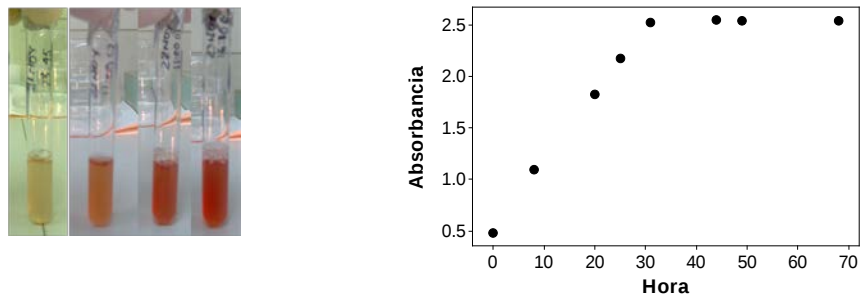


Figura 3. Curva absorbancia vs tiempo después del enriquecimiento del medio con extracto de levadura y peptona de caseína (derecha). La fotografía de la izquierda muestra el cambio progresivo del color del medio de cultivo.

Finalmente, un portaobjetos con tinción de Gram de una muestra del medio de cultivo inoculado fue observado bajo el microscopio óptico. El análisis de la tinción de Gram muestra que la bacteria *R. capsulatus* 33303 es gramnegativa, con una geometría en bastón con tendencia ovoide, con una agrupación en empalizada reticular. Las colonias son de color rojo oscuro, brillante, característico de esta especie bacteriana.

4. CONCLUSIONES

El diseño del reactor de producción biológica de hidrógeno aquí propuesto incorpora elementos no utilizados hasta el momento en otros estudios, debido en parte a las condiciones climatológicas particulares de la región de la ciudad de Mexicali, B.C. La utilización de este esquema de producción permitiría obtener hidrógeno con un balance energético-financiero positivo, lo cual es hasta el momento uno de los obstáculos en el desarrollo de estas tecnologías a escala mayor.

La tecnología aquí propuesta es además completamente sustentable, ya que para la operación de los elementos mecánicos incluidos se propone el uso de celdas solares. Aun así, la demanda energética de los elementos mecánicos es mínima, con el propósito de reducir el tamaño de las celdas solares y por tanto, su costo.

Las curvas de absorbancia en función del tiempo de la cepa ATCC 33303 muestran un comportamiento típico de etapas de adaptación, crecimiento exponencial y fase estacionaria de las bacterias. El desarrollo bacteriano en el interior del reactor deberá ser mantenido en la fase exponencial, para obtener una velocidad máxima de producción de hidrógeno.

Estas curvas deberán ser comparadas con la cepa mutante IR3. Asimismo, pruebas de generación de hidrógeno deberán ser llevadas a cabo con ambas cepas, para comparar sus

capacidades de producción en condiciones controladas de laboratorio, previo a las pruebas en el reactor solar.

5. AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, por el otorgamiento de la Beca de Doctorado #89724.

Al Dr. Jean Pierre Magnin, Profesor del Laboratorio LEPMI ENSEEG perteneciente a la Universidad de Grenoble, Francia, y al Dr. Mario Velásquez, Profesor del Laboratorio de Ingeniería Química de la Universidad Nacional de Colombia (UNAL), por la donación de las cepas B10 e IR3 de la bacteria *Rhodobacter Capsulatus*; así como por sus contribuciones en la metodología de manipulación de la cepa.

Al Dr. Roumen Zlatev y la Dra. Margarita Stoytcheva, Director y Co-Director de tesis respectivamente, por sus contribuciones en el diseño del biorreactor.

6. REFERENCIAS

- [1] Qadrdan M, Saboohi Y and Shayegan J. A model for investigation of optimal hydrogen pathway, and evaluation of environmental impacts of hydrogen supply system. *International Journal of Hydrogen Energy* 2008; 33, 7314-7325.
- [2] Davila, G; Arriaga, S; Alatríste, F; De Leon, A; Rosales, L. and Razo, E., 2008. Fermentative biohydrogen production: trends and perspectives. *Rev. Environ. Sci. Biotechnol.*, 7:27–45
- [3] Das, D and Veziroglu, T. Advances in biological hydrogen production processes. *International Journal of Hydrogen Energy* 2008; 33: 6046-6057.
- [4] Martin, E; Shaheen, S; Lipman, T. and Lidicker, J. Behavioral response to hydrogen fuel cell vehicles and refueling: Results of California drive clinics. *International Journal of Hydrogen Energy*, 2009, 34, 20, 8670-8680.
- [5] Society for General Microbiology. *Microbiology Today Magazine*, Life's a gas...and it's hydrogen. Issue August 2008.
- [6] Maeda, T; Sanchez, V. and Wood, T., 2007. Metabolic engineering to enhance bacterial hydrogen production. *Microbial Biotechnology*. Journal compilation © 2007 Society for Applied Microbiology and Blackwell Publishing Ltd.
- [7] WILLISON, J; Madern, D. and Vignais, P. Increased photoproduction of hydrogen by non-autotrophic mutants of *Rhodospseudomonas capsulate*. *Biochem. J.* 1984; 219: 593-600
- [8] He, D; Bultel, Y; Magnin, J; Roux, C. and Willison, J. Hydrogen photosynthesis by *Rhodobacter capsulatus* and its coupling to a PEM fuel cell. *Journal of Power Sources* 2005; 141: 19-23.
- [9] Kapdan, I. And Kargi, F. Bio-hydrogen production from waste materials. *Enzyme and Microbial Technology*. 2006; 38: 569–582.
- [10] Mohan, S; Babu, V. and Sarma, P. Anaerobic biohydrogen production from dairy wastewater treatment in sequencing batch reactor (AnSBR): Effect of organic loading rate. *Enzyme and Microbial Technology* 2007, 41, 4, 3 September 2007, 506-515.

- [11] Datar, R; Huang, J; Maness, P; Mohagheghi, R; Czernik, S. and Chornet, E. Hydrogen production from the fermentation of corn stover biomass pretreated with a steam-explosion process. *International Journal of Hydrogen Energy* 2007, 32, 8, 932-939.
- [12] Yokoi, H; Maki, R; Hirose, J. and Hayashi, S. Microbial production of hydrogen from starch manufacturing wastes. *Biomass and Bioenergy* 2002, 22, 5, Pages 389-395.
- [13] O-Thong, S; Prasertsan, P; Intrasukkha, N; Dhamwichukorn, S. and Birkeland, N. Improvement of biohydrogen production and treatment efficiency on palm oil mill effluent with nutrient supplementation at thermophilic condition using an anaerobic sequencing batch reactor. *Enzyme and Microbial Technology* 2007, 41, 5, 583-590.
- [14] Eroglu, E; Gündüz, F; Yücel, M; Türker, L. and Eroglu, I. Photobiological hydrogen production by using olive mill wastewater as a sole substrate source. *International Journal of Hydrogen Energy* 2004, 29, 2, February 2004, 163-171.
- [15] Gomez, X; Moran, A; Cuertos, M. and Sanchez, M. The production of hydrogen by dark fermentation of municipal solid wastes and slaughterhouse waste: A two-phase process. *Journal of Power Sources* 2006, 157, 727–732.
- [16] Zlatev, R. Rapport Scientifique, Laboratoire d' Electrochimie et de Physico-Chimie des Matériaux et Interfaces, Equipe de Génie des Procédés Appliqués à l'Energie et à l'Environnement, GP2E. 2005.
- [17] Lee, K; Lin, P; Fangchiang, K. and Chang, J. Continuous hydrogen production by anaerobic mixed microflora using a hollow-fiber microfiltration membrane bioreactor. *International Journal of Hydrogen Energy* 2007, 32, 8, 950-957.
- [18] Wang, Y; Mu, Y. and Yu, H. Comparative performance of two upflow anaerobic biohydrogen-producing reactors seeded with different sludges. *International Journal of Hydrogen Energy* 2007, 32, 8, 1086-1094.
- [19] Eroglu, I; Aslan, K; Gündüz, U; Yücel, M. and Türker, L. Substrate consumption rates for hydrogen production by *Rhodobacter sphaeroides* in a column photobioreactor. *Journal of Biotechnology* 1999, 70, Issues 1-3: 103-113.
- [20] Asada, Y. and Miyake, J. Photobiological Hydrogen Production. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 1999, 88, No. 1, 1-6.
- [21] Akkerman, I; Janssen, M; Rocha, J. and Wijffels, R. Photobiological hydrogen production: photochemical efficiency and bioreactor design. *International Journal of Hydrogen Energy* 2002, 27, 11-12, 1195-1208.
- [22] Miyake, J; Wakayama, T; Schnackenberg, J; Arai, T. and Asada Y. Simulation of daily sunlight illumination pattern for bacterial photo-hydrogen production. *J. Biosci. Bioeng.* 1999; 88:659–63.
- [23] Wakayama, T. and Miyake, J. Light shade bands for the improvement of solar hydrogen production efficiency by *Rhodobacter sphaeroides* RV. *International Journal of Hydrogen Energy*. 2002; 27:1495–500.
- [24] He, D.; Bultel, Y.; Magnin, J.; Roux, C. & Willison, J. C. Hydrogen photosynthesis by *Rhodobacter capsulatus* and its coupling to a PEM fuel cell. *Journal of Power Sources* 2005, 141, 19-23.

A5

Titulo: Producción de Hidrogeno Utilizando Luz Solar y Desechos Alimenticios.

Autores: Cesar Gonzalo Iñiguez Monroy, Roumen Koytchev Zlatev y Margarita Stilianova Stoytcheva.

Congreso: XIV Simposio en Ciencia de Materiales. Centro de Nanociencias y Nanotecnología, UNAM (2009).



Centro de Nanociencias y Nanotecnología

Km. 107 carret. Tijuana-Ensenada, Ensenada, B.C.

Tel. (646) 174-4602, Fax (646) 174-4603



C. Iñiguez,
Instituto de Ingeniería,
Universidad Autónoma de Baja California,
iniguezmonroy@prodigy.net.mx

Estimado participante:

En nombre del Comité Organizador del XIV Simposio en Ciencia de Materiales, nos es grato informarle que su trabajo titulado:

“PRODUCCION DE HIDROGENO UTILIZANDO LUZ SOLAR Y DESECHOS ALIMENTICIOS”

ha sido aceptado para presentación en la Sesión de Carteles No. I del día miércoles 11 de febrero de 2009.

Le agradecemos su participación.

Atentamente,
“POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU”
Ensenada, B.C., a 13 de enero de 2009.

Dra. Amelia Olivas Sarabia
simposio@cnyn.unam.mx



PRODUCCION DE HIDROGENO UTILIZANDO LUZ SOLAR Y DESECHOS ALIMENTICIOS

C. Iñiguez*, R. Zlatev, M. Stoytcheva, B. Valdez

*Instituto de Ingeniería, Universidad Autónoma de Baja California,
Blvd. Benito Juárez s/n, 21280 Mexicali, Baja California, México*

El hidrógeno es un combustible prometedor para sustituir los combustibles fósiles en declive. Es el único combustible con un contenido de energía lo suficientemente alto para las necesidades de la exploración espacial, y su único subproducto es el agua. Los métodos actuales de producción de H_2 son caros, debido a que requieren la alimentación de grandes cantidades de energía, como en el caso de la electrolisis, la reforma del gas natural, gasificación de carbón, etc. Una metodología alternativa consiste en la utilización de bacterias capaces de producir hidrógeno dentro de un biorreactor. Los compuestos utilizados como sustrato, la fuente de energía para iluminación o calentamiento, y la energía para la agitación del reactor incrementan los costos del hidrógeno generado. En este estudio se propone la producción de H_2 con la ayuda de la bacteria fototrófica *Rhodobacter Capsulatus*, utilizando desechos alimenticios como sustrato, y luz solar como fuente de energía. La utilización del sol como fuente de energía conlleva el obstáculo del incremento de la temperatura en el biorreactor, con la desventaja de la disminución de la población bacteriana, cuando la temperatura excede los 35 °C. Para evitar el sobrecalentamiento, se propone que el reactor sea colocado a una determinada profundidad bajo el suelo. Este modelo de reactor incluye la utilización de un sistema de espejo con motor, el cual transmita la radiación solar hasta la superficie del reactor, siguiendo el movimiento relativo del sol. El uso de desechos alimenticios mantendría los costos de generación a un nivel mínimo.

La caracterización hidrodinámica del biorreactor, así como las curvas de crecimiento bacteriano son reportadas y discutidas.

Referencias

1. D. Das, N. Khanna, T. Veziroglu, "Recent Developments In Biological Hydrogen Production Processes.", Chemical Industry & Chemical Engineering Quarterly, 14/2 (2008), 57-67.
2. R. Zlatev, Rapport Scientifique, Laboratoire d' Electrochimie et de Physico-Chimie des Matériaux et Interfaces, Equipe de Génie des Procédés Appliqués à l'Energie et à l'Environnement, GP2E (2005).

* iniguezmonroy@prodigy.net.mx



- ² Centro de Nanociencias y Nanotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México
³ Facultad de Física, Universidad Complutense de Madrid
⁴ Walter Shottky Institute, Technical University Munich
⁵ Center for Micro and Nanotechnologies, Technical University Munich

-----84

1-16

DEPOSITION OF MULTICOMPONENT NANOSTRUCTURED COATINGS
(TIN/TIALN) BY PLD TECHNIQUE

Luis C. Hernández(*)^{1,2}, Osmel Cruzata¹, Abel Fundora Cruz¹, Luis V. Ponce², Jesús Siquieros³

- ¹ Instituto de Ciencias y Tecnología de Materiales, IMRE, Universidad de La Habana, San Lázaro y L, Vedado, Cuba Postgrado: Ciencias de Materiales del IMRE,
² CICATA-IPN, Altamira, km 14,5 Carretera Tampico- Puerto Industrial, Altamira 89600, Tamps., Mexico.
³ Centro de Nanociencia y Nanotecnología, CnyN-UNAM, Ensenada BC, México

-----85

1-17

CALORES DE ADSORCIÓN A BAJOS GRADOS DE COBERTURA DE N-HEXANO, N-HEPTANO, N-OCTANO Y N-NONANO EN MICROPOROS (ERIONITA, CLINOPTILOLITA Y SiO₂).

Hernández, M. A.^{1*}, F. Rojas, F.², M. Asomoza², **Caamaño J.³**

- ¹ Departamento de Investigación en Zeolitas, Instituto de Ciencias de la Universidad Autónoma de Puebla. Edificio 76, Complejo de Ciencias, Ciudad Universitaria, CP 72570, Puebla. México.
² Departamento de Química, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa.
³ Colegio de Ingeniería de Materiales, Fac de Ingeniería Química de la BUAP.

-----87

1-18

PRÁCTICAS PROFESIONALES EN EL MICROSCÓPIO DE FUERZA ATÓMICA

Jesús Rigoberto Herrera García^{1*}, Guadalupe Lydia Álvarez Camacho²

- ¹ Estudiante de licenciatura de la Facultad de Ingeniería Universidad Autónoma de Baja California, Bvd. Benito Juárez esq. Calle de la Normal. Col Insurgentes Este. C.P. 21280, Mexicali, B.C.
² Instituto de Ingeniería Universidad Autónoma de Baja California. Bvd. Benito Juárez esq. Calle de la Normal. Col Insurgentes Este. C.P. 21280, Mexicali, B.C.

-----88

1-19

PRODUCCION DE HIDROGENO UTILIZANDO LUZ SOLAR Y DESECHOS ALIMENTICIOS

C. Iñiguez*, R. Zlatev, M. Stoytcheva, B. Valdez

- Instituto de Ingeniería, Universidad Autónoma de Baja California,
Blvd. Benito Juárez s/n, 21280 Mexicali, Baja California, México

-----89

A6

Titulo: Producción Biológica de Hidrogeno en un Reactor de Flujo Continuo, Utilizando Productos de Desecho Industriales como Substrato y Luz Solar como Fuente de Energía.

Autores: Cesar Gonzalo Iñiguez Monroy, Roumen Koytchev Zlatev y Margarita Stilianova Stoytcheva.

Congreso: Coloquio Nacional de Estudiantes de Posgrado del Instituto de Ingeniería, Instituto de Ingeniería-UABC, Maestría y Doctorado en Ciencias e Ingeniería (2008).

Producción Biológica de Hidrógeno en un Reactor de Flujo Continuo, Utilizando Productos de Desecho Industriales como Substrato y Luz Solar como Fuente de energía.

Cesar Gonzalo Iñiguez Monroy*, Roumen Koytchev Zlatev** y Margarita Stoytcheva***

Instituto de Ingeniería

Maestría y Doctorado en Ciencias e Ingeniería

* Estudiante de Doctorado Campo del conocimiento: Química

** Director de tesis: Roumen Zlatev

***Codirectora de tesis: Margarita Stoytcheva

Mexicali, Baja California, MEXICO

email: iniguezmonroy@prodigy.net.mx

Resumen

La economía del hidrógeno contempla que la electricidad para aplicaciones estacionarias, así como la fuerza motriz para automóviles, sea derivada de la reacción del hidrógeno y el oxígeno, en una celda de combustible.

El hidrógeno es uno de los 'acarreadores de energía' mas estudiados en la actualidad, debido a que entrega la mayor cantidad de energía por unidad de masa, pero también por la limpieza de sus subproductos, durante su conversión a energía. La producción de hidrógeno debe ser también un proceso limpio ambientalmente, para evitar las emisiones generadas actualmente por la electrólisis del agua, y otros procesos de producción.

Una opción viable es la producción biológica del hidrógeno, partiendo de bacterias fotoheterotróficas, es decir, que pueden tomar energía de la luz solar, y cuya fuente de carbono es externa, de productos de desecho industriales.

En este estudio se muestra la caracterización del flujo volumétrico en función del voltaje de una bomba de rotor magnético, para un reactor biológico construido para la producción de hidrógeno.

Por otro lado se muestran los resultados de la caracterización de la bacteria *Rhodobacter Capsulatus*, con el propósito del desarrollo de la carga bacteriana capaz de generar hidrógeno en el interior del reactor.

Palabras clave: energía, hidrogeno, bacteria, reactor biológico.

I. INTRODUCCION

Una gran proporción de las necesidades energéticas mundiales están siendo cubiertas por los combustibles fósiles, lo cual ha llevado a un consumo acelerado de estos recursos no renovables. Esto ha resultado tanto en el incremento en la concentración de CO₂ en la atmósfera, como en el rápido agotamiento de los recursos fósiles. El incremento del primero esta considerado la causa principal del calentamiento global y cambio climático. El agotamiento de los recursos fósiles llevara a una crisis energética en el futuro cercano (Davila et al, 2008).

Las fuentes de energía renovables han recibido una gran atención por parte de la comunidad internacional en la última década. Estas incluyen la energía solar, eólica, hidroeléctrica, biomasa, etc. (Das et al, 2008).

El hidrogeno es un combustible prometedor, ya que tiene un contenido energético mayor al del petróleo (142 MJ kg^{-1} para H_2 versus 42 MJ kg^{-1} para el petróleo), (Maeda, 2007).

Es el único combustible con un contenido de energía lo suficientemente alto para las necesidades de la exploración espacial, y su único subproducto es el agua, por lo cual es ambientalmente limpio (Microbiology Today, 2008).

Actualmente, el 40% del hidrógeno es producido a partir del gas natural, el 30% de fracciones pesadas del petróleo y nafta, el 18% del carbón, el 4% de la electrolisis y cerca del 1% es producido a partir de biomasa (Das et al, 2008).

El hidrógeno tiene otros usos varios, los cuales pueden ser divididos en las siguientes categorías:

- a) Como reactante en procesos de hidrogenación.
- b) Como removedor de trazas de oxígeno para evitar oxidación y corrosión.
- c) Como combustible de cohetes.
- d) Como refrigerante en generadores eléctricos.

Estos usos del hidrógeno corresponden al 3% del consumo de energía actualmente y se espera que crezca significativamente en los próximos años (Das and Veziroglu, 2001).

Una multitud de microorganismos han desarrollado la habilidad para derivar energía a partir del hidrogeno. Sin embargo, existen circunstancias bajo las cuales los microorganismos no tienen otra opción para ganar energía, que la de liberar hidrógeno al ambiente. El estudio de este fenómeno comenzó a principios del siglo pasado, pero el biohidrógeno (hidrógeno producido

biológicamente), permaneció como curiosidad académica antes de la crisis de combustible de la década de 1980. Una mayor preocupación por los asuntos energéticos en la opinión pública y en las agendas políticas, así como nuevos descubrimientos científicos han contribuido al desarrollo de la tecnología del biohidrogeno (Microbiología Today, 2008).

El uso de métodos biológicos para la producción de hidrogeno deben reducir significativamente los costos de la energía, ya que estos procesos no requieren de calentamiento extenso (o electricidad, como en las plantas de electrolisis), (Maeda et al, 2007).

Hoy en día, los procesos de producción de H_2 han adquirido una mayor importancia principalmente por dos razones: (1) pueden utilizar fuentes de energía renovables y (2) son operados usualmente a temperatura ambiente y presión atmosférica. Sin embargo, las velocidades reportadas de producción de biohidrogeno, la estabilidad de los sistemas y la eficiencia de estos procesos aun no son suficientes para hacerlos comercialmente viables.

Por otro lado, pueden utilizar diversos productos de desecho, lo cual facilita el reciclado de los mismos (Das and Veziroglu, 2001).

1.1 producción de Biohidrogeno por Microorganismos

La capacidad para la producción de biohidrógeno esta asociada con la actividad de las enzimas hidrogenasa y nitrogenasa, pero son pocas las clases que pueden llevar a cabo la producción de este biogás. Entre ellas están las bacterias fermentativas y las bacterias fotosintéticas. La forma en la cual producen hidrógeno se muestra en la

figura 1. Los mecanismos de la producción de biohidrógeno dentro de estos grupos es diversa, pero pueden realizarse algunas generalizaciones. La primera, la producción de biohidrógeno es estrictamente un fenómeno anaerobio, ya que las enzimas hidrogenasa y nitrogenasa son destruidas por el oxígeno. La segunda, las circunstancias bajo las cuales ocurre la producción, siempre impone un reto a la célula, ya sea el disponer de mayor energía, de aceptar una sustancia tóxica o de tolerar la falta de algún nutriente importante (Microbiology Today, 2008)

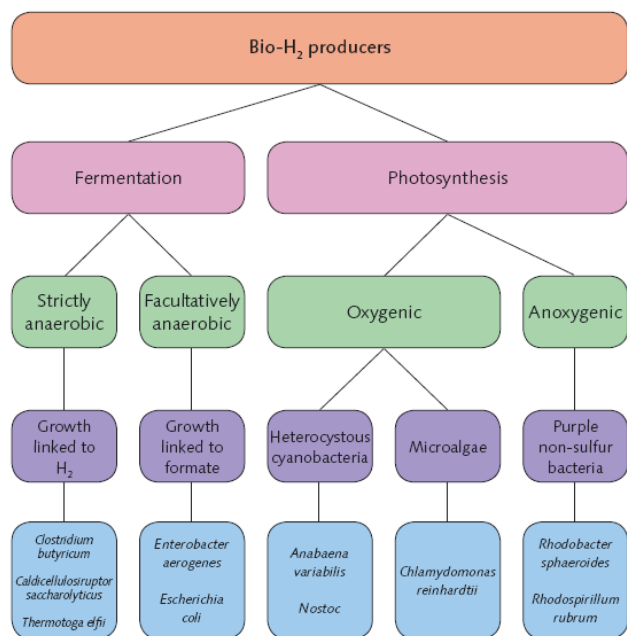


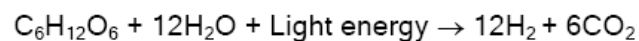
Figura 1. Clasificación de bacterias productoras de hidrógeno (Microbiology Today, 2008).

Estos sistemas, además, pueden utilizar la luz solar como fuente de energía primaria. Las eficiencias de conversión menores, respecto a la de las celdas solares, puede ser compensada por sus requerimientos de energía más bajos, así como por su menor inversión inicial (Asada and Miyake, 1999).

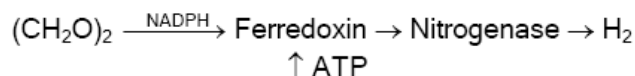
Todos los procesos de producción biológica de hidrógeno dependen fundamentalmente en la presencia de una enzima que lo produzca. Las enzimas que producen hidrógeno catalizan una de las reacciones químicas más simples: $2\text{H}^+ + 2\text{e}^- \leftrightarrow \text{H}_2$.

1.2 Fotomermentación

La producción de H_2 por bacterias purpuras sin azufre, es principalmente debida a la presencia de nitrogenasa bajo condiciones deficientes de oxígeno, usando energía luminosa y compuestos reducidos (ácidos orgánicos). La reacción es como sigue:



La ruta bioquímica global para la fotofermentación puede ser expresada de forma siguiente:



Las bacterias fototróficas requieren una fuente de electrones orgánica o inorgánica, para iniciar la fotosíntesis. Pueden utilizar un amplio rango de compuestos económicos (Das et al, 2008).

El acceso a energía luminosa permite a los microorganismos fotosintéticos vivir mediante reacciones químicas endotérmicas, las cuales podrían no soportar la vida en la oscuridad. Por ejemplo las bacterias fotosintéticas anoxigenicas (APB), pueden derivar carbono para su crecimiento de sustratos relativamente inaccesibles, incluyendo ácidos orgánicos, como los que se forman durante el proceso de fermentación en la oscuridad (Microbiology Today, 2008).

Estas bacterias fotoheterotróficas han sido investigadas por su disponibilidad para convertir la energía luminosa en hidrógeno utilizando desechos orgánicos como sustrato, tanto en procesos batch, cultivos

continuos, y sistemas de células inmovilizadas utilizando matrices sólidas como 'carrageenan', agar gel, vidrio poroso y poliuretano espumado (Das et al, 2008).

Los mayores cuellos de botella en el proceso involucran eficiencias fotoquímicas bajas (3-10%). Mas aun, la distribución no homogénea de la luz en el interior del reactor también contribuye a la disminución de la eficiencia global de conversión de la luz.

Estos obstáculos pueden ser superados:

- 1) Utilizando combinación de bacterias que tengan diferentes características de utilización de la luz,
- 2) Mejorando el diseño del foto-bio-reactor, con una mayor capacidad de difusión de la luz,
- 3) Manteniendo una actividad máxima de nitrogenasa, y una actividad mínima de la hidrogenasa,
- 4) Manteniendo una relación molar de la fuente de carbono sobre la fuente de nitrógeno.

Otro problema para la aplicación práctica de este proceso es la gran área superficial requerida para coleccionar la energía luminosa, ya que la construcción de tales biorreactores con una relación superficie/volumen alta, pueden incrementarse. Una posible alternativa podría ser la utilización de colectores solares (Das et al, 2008).

Las bacterias fototróficas presentan las siguientes ventajas:

- 1) Rendimientos teóricos de conversión altos.
- 2) Ausencia de producción de oxígeno.
- 3) Capacidad de utilizar un amplio espectro de luz.

- 4) Capacidad de consumir sustratos orgánicos derivados de productos de desecho y por lo tanto, su capacidad de acoplarse a un sistema de tratamiento de aguas.
(Das and Veziroglu, 2001).

1.3 Sustratos y Condiciones de Proceso

Diversos medios de cultivo, comúnmente productos de desecho han sido propuestos. Entre otros están el uso de desechos de la industria lechera (Mohan et al., 2007); rastrojo de maíz (Datar et al., 2006); almidón (Yokoi et al., 2002); aceite de palma (O-Thong et al., 2007); aceite de oliva (Eroglu et al., 2003); desechos municipales, y rastros (Gómez et al., 2006).

Por otro lado, también ciertos parámetros de proceso como el pH (Khanal et al., 2003; Kim et al., 2003; Zhao and Yu, 2007), temperatura (Mu et al., 2006; Valdez et al., 2004), el tipo de luz y su intensidad (Miyake et al., 1999; Akkerman et al., 2002) han sido investigados.

Melis and Melnicki, 2006, utilizaron un cultivo mixto constituido en primer lugar de algas verdes, las cuales tienen la capacidad de captar la porción visible de la luz solar; y en segundo lugar de bacterias fotosintéticas anoxigénicas, las cuales pueden captar las emisiones solares cercanas al infrarrojo.

Además, métodos estadísticos y de diseño de experimentos han sido empleados con el objetivo de optimizar los rendimientos de hidrógeno (Cuetos et al., 2007; Chen et al., 2006; Mu et al., 2005).

Finalmente, otra fuente de optimización en la producción de H₂ se encuentra en el diseño de biorreactores, los cuales maximicen la absorción de luz por parte de las bacterias; ya sea mediante agitación o mediante el incremento del área superficial

con respecto al volumen del reactor (Zlatev, 2005). Entre los diversos diseños se encuentran el reactor batch de secuenciación SBR (Mohan et al., 2007); microfiltración de membrana (Lee et al., 2006); de flujo ascendente 'upflow' (Wang et al., 2006); fotobiorreactores de columna (Eroglu et al., 1999); fotobiorreactor flotante (Asada and Miyake, 1999).

1.4 Reactor

Ya que el hidrógeno producido debe ser colectado, el fotorreactor debe ser un sistema cerrado. Debe ser también práctico de esterilizar. La productividad de este reactor esta limitada por la luz, por lo cual una relación superficie/volumen de reactor alta es necesaria. Las eficiencias fotoquímicas son bajas (alrededor del 10%), y tienden a decrecer a medida que la intensidad de la luz crece (efecto de saturación de la luz, ya que no todos los fotones son utilizados para la energía de reacción, sino que son disipados como calor). Esto significa que para crear un proceso biológico eficiente es importante ya sea diluir la luz y distribuirla en lo posible en el volumen del reactor y/o mezclar el cultivo a una velocidad alta para que las células sean expuestas a la luz solo por un periodo corto de tiempo (Akkerman et al., 2002).

Dependiendo del tipo de reactor y la forma en que este es operado, las células son acarreadas durante cierto periodo de tiempo a superficies expuestas a la luz y luego a superficies oscuras. Estos ciclos de luz/oscuridad inducidos por el mezclado, cuando se encuentran en el rango de micro o milisegundos, pueden mejorar la eficiencia fotoquímica (Akkerman et al., 2002).

Zlatev, 2005 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 semicontínuos, en los cuales la superficie de contacto de las bacterias con la luz es maximizada.

1.5 *Rhodobacter Capsulatus*

Entre las bacterias fotosintéticas heterótrofas, la *Rhodobacter capsulatus* fue elegida por su fuerte capacidad de producir hidrógeno (He et al., 2005; Willison et al., 1984; Hillmer and Gest, 1977; Nakada et al., 1999, Jounneau and Vignais, 1985). 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 (Zlatev 2005, Miyamoto and Miura, 1980). De acuerdo con Das and Veziroglu, 2001; el máximo rendimiento de esta bacteria es de 5.3 mmol H₂/l.hr, el cual es de los mas competitivos; solo superado por las bacterias fermentativas *Enterobacter aerogens* con 11.36 mmol H₂/l.hr, la *Citrobacter intermedius* con 11 mmol H₂/l.hr y por la *Enterobacter cloacae* con 37 mmol H₂/l.hr; aunque estas ultimas producen también altas concentraciones de ácidos grasos.

Akkerman et al., 2002 encontraron que para el caso de las bacterias púrpura, la ventana de Radiación Fotosintética Activa PAR, se encuentra entre los 400 y los 950 nm y que el 65.8% de la radiación solar se encuentra en esta ventana. Sin embargo, para el caso de las microalgas, este porcentaje es de 43%, ya que su ventana PAR se encuentra entre los 400 y los 700 nm.

Además, la magnitud de la radiación solar depende del lugar geográfico y las condiciones climáticas. Por ejemplo la magnitud de esta radiación es de 18 MJm⁻²

d^{-1} en Ámsterdam, mientras que en Sevilla es de $26.6 \text{ MJm}^{-2}d^{-1}$. La intensidad de la luz solar tiene una incidencia directa en la cantidad de hidrógeno producida por las bacterias fotosintéticas (Akkerman et al., 2002).

II. MATERIALES Y METODOS

2.1 Cepas/Medios de Cultivo

La bacteria utilizada en este estudio es la *Rhodobacter Capsulatus*, variedad salvaje B10 (ATCC No. 33303). El medio de crecimiento líquido utilizado fue el ATCC 1139, definido para *Rhodospseudomonas*; mientras que el medio sólido fue una combinación de medio líquido ATCC 1139 extracto de carne % y extracto de peptona %.

ATCC medium: 1139 Defined medium for *Rhodospseudomonas*

EDTA.....	20.0 mg
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	1.0 g
Malic acid.....	4.0 g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	200.0 mg
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	75.0 mg
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	12.0 mg
Trace Elements (see below).....	1.0 ml
Thiamine.....	1.0 mg
Biotin.....	15.0 mcg
K_2HPO_4	0.9 g
KH_2PO_4	0.6 g
Distilled water.....	1.0 L

Adjust medium for a final pH of 6.8. Autoclave at 121C for 15 minutes.

Trace Elements:

H_3BO_3	700.0 mg
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	398.0 mg
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	188.0 mg
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	60.0 mg
$\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$	10.0 mg
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	50.0 mg
Distilled water.....	250.0 ml

Figura 2. Formulacion del Medio ATCC 1139, utilizado para *Rhodobacter Capsulatus*.

2.2 Densidad Optica

Las mediciones de densidad optica fueron realizadas a una longitud de onda de 580 cm^{-1} , en un espectrofotometro , de forma directa sobre el cultivo, y haciendo dilucion 1:10.

2.3 Conteo Bacteriano

La determinación de bacterias viables fue realizada con el metodo de diluciones seriadas desde 10^{-1} hasta 10^{-15} , para determinar el numero de Unidades Formadoras de Colonia (UFC).

2.4 Reactor

El reactor fue construido con placas de plexiglas comercial, de pulgadas de espesor. Los espacios fueron cerrados con una disolución de plexiglas en cloroformo.

Se utilizo una bomba de rotor magnético , de 24 V nominales de operación. Fue utilizada también una fuente de poder, con potencial variable.

2.5 Caracterización de Substrato

El substrato caracterizado fue suero de desecho de la producción de queso, en empresas familiares del Ejido Nuevo Leon, en el Valle de Mexicali. Fue utilizado un equipo analizador de leche por ultrasonido Lacti-check, para obtener % de grasa, solidos no grasos y proteína, así como densidad y punto de congelación.

III. RESULTADOS Y DISCUSION

3.1 Diseño del Reactor Biologico.

El reactor piloto fue disenado tomando como base el área de irradiación luminosa de una lámpara de tungsteno. Fue utilizado un diseño plano de flujo laminar.

La figura 3 muestra el diseño de planta del reactor, el cual posee dos cámaras. La cámara b tiene un volumen de lt, y esta disenada para estar siempre llena, y crear un flujo laminar sobre la superficie de la placa que divide ambas

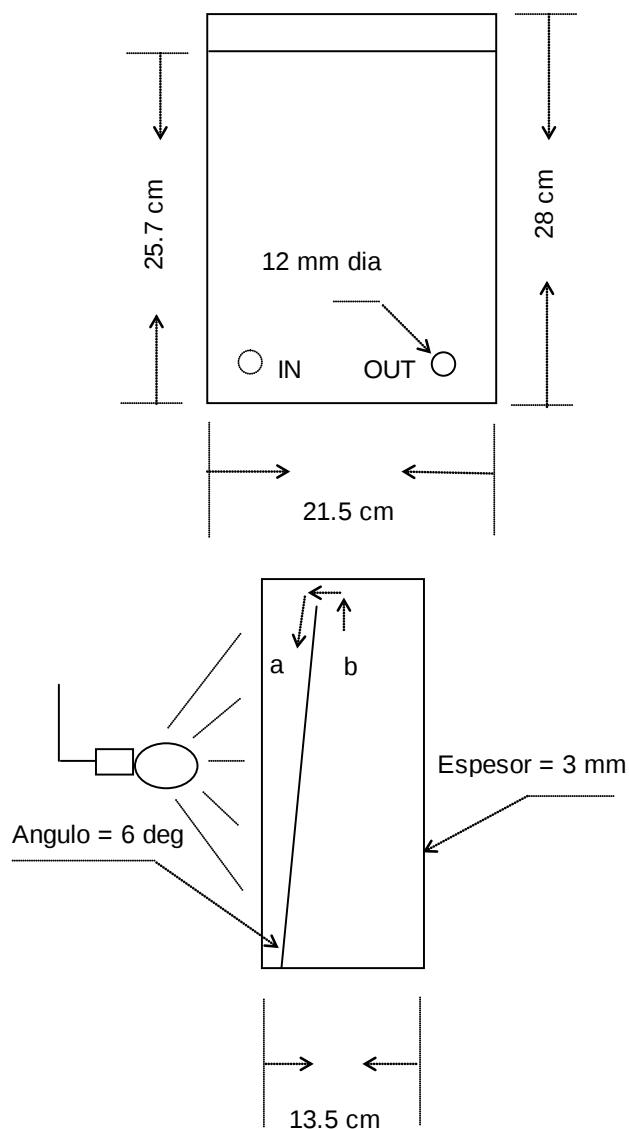


Figura 3. Diseño de planta del biorreactor plano de flujo laminar.

cámaras. El fluido cae en el fondo de la cámara a, y es jalado hacia fuera por la bomba, con el propósito de mantener una recirculación que mantenga el fluido homogéneo.

Cuando el sustrato con la bacteria se desliza sobre la placa, esta será expuesta a la luz por una fracción de segundo, para

luego pasar a una zona de menor iluminación.

La figura 4 muestra imágenes del sistema del reactor en operación, junto con la bomba de rotor magnético, la fuente de poder, y la lámpara. La segunda imagen muestra el flujo laminar, deslizándose por la placa que divide ambas cámaras.

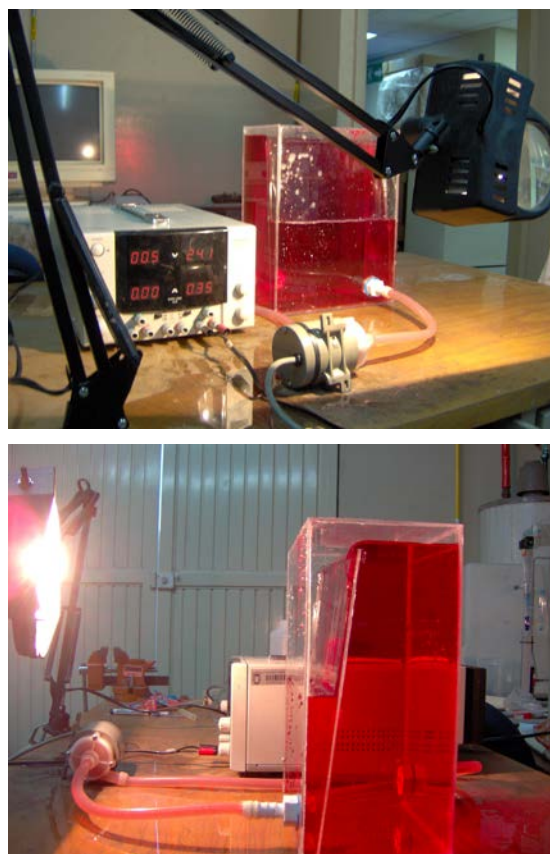


Figura 4. Imágenes del sistema de reactor en operación, junto con fuente de poder, lámpara y bomba magnética.

3.2 Caracterización Hidrodinámica del Reactor

La inducción de ciclos de luz/oscuridad puede mejorar la eficiencia fotoquímica del proceso. El flujo volumétrico entonces, debe ser regulado con el propósito de investigar el efecto del tiempo de

exposición a una mayor intensidad luminosa sobre la producción de hidrógeno. A partir de esta caracterización, es posible también controlar el espesor de la capa de flujo laminar y por lo tanto modificar la homogeneidad de la distribución de la luz.

Finalmente, si se combina el conocimiento del espesor de la capa de flujo laminar, con el conocimiento de la población bacteriana en el interior del reactor, es posible conocer la densidad poblacional bacteriana en la placa de flujo. Con el propósito de conocer el cambio del flujo volumétrico del fluido con respecto al voltaje aplicado a la bomba de rotor magnético.

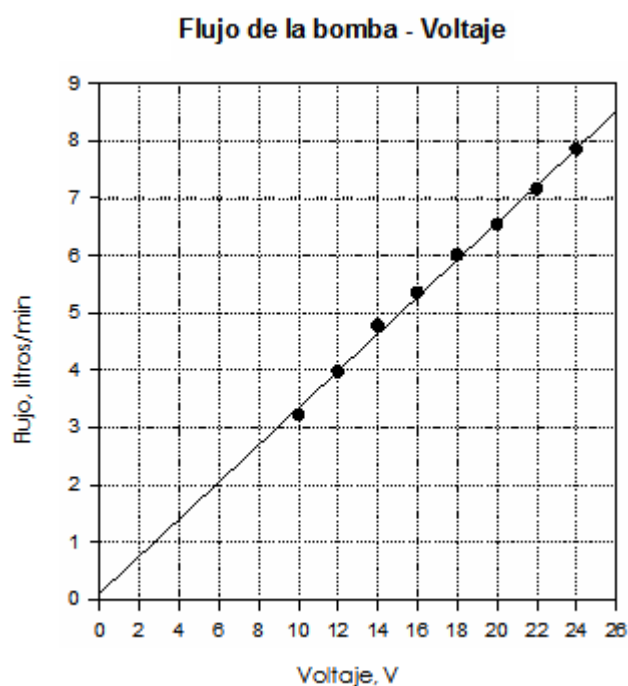


Figura 5. Gráfica de caracterización hidrodinámica del sistema de reactor.

La figura 5 muestra la gráfica flujo volumétrico vs. voltaje, la cual se ajusta a una línea recta con un coeficiente de correlación $R = 0.997$.

La prolongación de esta línea recta cruza por el origen, lo cual también demuestra que la capacidad de predecir el flujo

volumétrico a través del voltaje aplicado a la bomba es adecuada.

3.3 Restitución de Bacteria e Inoculación

La cepa ATCC 33303 correspondiente a la bacteria *Rhodobacter Capsulatus* B10 fue recibida en estado liofilizado, dentro de un dispositivo de vidrio de doble capsula. Dicha capsula fue abierta en condiciones asépticas, primero desinfectando la superficie de trabajo con un producto comercial, y después manipulando la bacteria dos mecheros Fisher. La figura 6 muestra un matraz erlenmeyer y un tubo de vidrio inoculados, donde la bacteria se encuentra en la fase de adaptación.

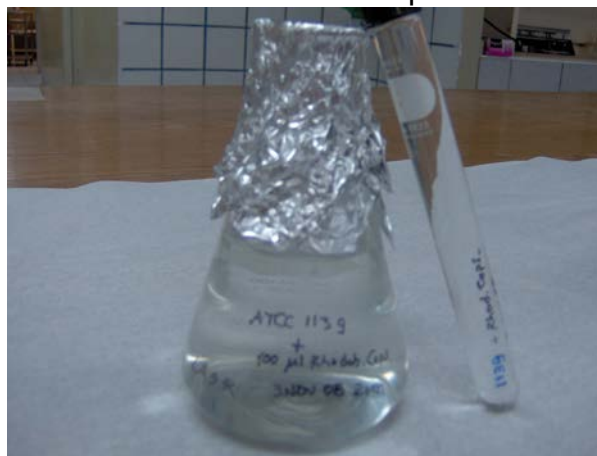


Figura 6. Medio de cultivo ATCC 1139 inoculado. La bacteria *Rhodobacter Capsulatus* se encuentra en fase de adaptación.

3.4 Caracterización del Substrato

Suero de leche proveniente de los desechos de la producción de queso fue caracterizado, utilizando los métodos típicos de caracterización de leche.

La figura 7 muestra los resultados de la caracterización de muestras de suero, que será utilizado como sustrato en el reactor. Estos parámetros serán monitoreados, con la finalidad de investigar una posible

correlación de la producción de hidrógeno con el contenido de grasa o proteína en el sustrato. Este análisis servirá de comparativo con efluentes industriales con características distintas, o bien con efluentes provenientes de procesos distintos. Trabajar con reducir la variación de los factores no controlados sobre los datos de producción de hidrógeno.

Sample	% Grasa	% Solidos No Grasos	% Proteína
1	0.69	7.52	2.82
2	0.71	7.56	2.83
3	0.74	7.58	2.84
4	0.69	7.40	2.77
Media	0.708	7.515	2.815
Desv. Std.	0.024	0.081	0.031

Figura 7. Caracterización de suero de leche de productores del Ejido Nuevo León, en el Valle de Mexicali.

3.5 Diferenciación de cepa *Rhodobacter Capsulatus*.

Un muestreo de bacterias ambientales potencialmente contaminantes fue realizado en las inmediaciones del área de manipulación de la cepa.



Figura 8. Muestreo de bacterias potencialmente contaminantes.

La figura 8 muestra una imagen con diversas cepas obtenidas de este muestreo, mientras

que la figura 9 muestra imágenes de pruebas bioquímicas realizadas a las mismas.



Figura 9. Resultados de pruebas bioquímicas TSI, CS y LIA sobre una cepa potencialmente contaminante.

Las pruebas bioquímicas realizadas corresponden al agar TSI 'triple sugar iron', Citrato de Simmons y LIA 'Lysine Iron Agar'. Estas pruebas fueron realizadas con el objetivo de diferenciar la cepa de interés *Rhodobacter Capsulatus*, una vez que esta se encuentre en fase de crecimiento y puedan ser realizadas las pruebas bioquímicas correspondientes.

IV. CONCLUSIONES

El diseño del reactor construido permite crear un flujo laminar, en el cual solo una fracción de la población de bacterias sea expuesta a la máxima intensidad de la luz, con la posibilidad de disminuir el efecto de saturación luminosa.

El control del ángulo de la placa de separación entre las cámaras del reactor, permitirá su modificación en la búsqueda de una posición óptima, de acuerdo al tipo de fuente luminosa, así como a su ubicación.

Los resultados de la caracterización hidrodinámica del sistema indican que es

posible predecir el flujo volumétrico en función del voltaje de la bomba magnética. Este hecho constituye una ventaja, ya que al ser un sistema cerrado, la medición de flujo volumétrico solo podría realizarse colocando un medidor en línea, lo cual incrementaría el costo del sistema. Por otro lado, es deseable minimizar la inclusión de elementos al medio de cultivo, lo cual puede ser fuente potencial de contaminación bacteriana.

A través de los resultados obtenidos en esta caracterización, es posible además desarrollar expresiones matemáticas que relacionen la cantidad de bacterias por unidad de superficie expuestas a la mayor intensidad de la luz, en función del voltaje. Asimismo, puede obtenerse una expresión para determinar el tiempo de residencia de una bacteria que pasa a través de la placa de separación, en función del voltaje de la bomba.

Al mismo tiempo el flujo generado por la bomba cumple con la función de homogeneizar el contenido del biorreactor, y así evitar la aparición de zonas muertas con bacterias inactivas.

Los datos obtenidos en la caracterización del suero de leche como substrato, permiten establecer un punto de comparación entre diversos productores de lácteos, ya que los efluentes de sus procesos de producción pueden ser mezclados con otros desechos. Servirá, además como una referencia contra otro tipo de desechos alimenticios.

Finalmente, la restitución de la bacteria permitirá su crecimiento en condiciones asépticas, con el objetivo de realizar la carga del reactor y comenzar con el ciclo de producción del hidrógeno. La caracterización de bacterias ambientales potencialmente contaminantes permitirá la diferenciación de estas con la bacteria

Rhodobacter Capsulatus, en caso de sospecha de contaminación.

V. AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, por el otorgamiento de la Beca de Doctorado #89724.

Al Dr. Mario Abasolo, Jefe del Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Medicina de la UABC, y a la Dra. Mónica Carrillo, Profesora de Microbiología Industrial del Instituto de Ingeniería de la UABC por sus contribuciones en la metodología de manipulación de la cepa.

Al Dr. Roumen Zlatev y la Dra. Margarita Stoytcheva, Director y Co-Director de tesis respectivamente, por sus contribuciones en el diseño del biorreactor y la metodología de manipulación de la cepa.

VI. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

Akkerman, I; Janssen, M; Rocha, J. and Wijffels, R., 2002. Photobiological hydrogen production: photochemical efficiency and bioreactor design. *International Journal of Hydrogen Energy*, 27, 11-12, 1195-1208.

Asada, Y. and Miyake, J., 1999. Photobiological Hydrogen Production. *JOURNAL OF BIOSCIENCE AND BIOENGINEERING*, 88, No. 1, 1-6.

Chen, C; Lu, W; Wu, J. and Chang, J., 2007. Enhancing phototrophic hydrogen production of *Rhodospseudomonas palustris* via statistical experimental design. *International Journal of Hydrogen Energy*, 32, 8, 940-949.

Cuetos, M; Gómez, A; Escapa, A. and Morán, A., 2007. Evaluation and simultaneous optimization of biohydrogen production using 32 factorial design and the desirability function. *Journal of Power Sources*, 169, 1, 131-139.

- Das, D. and Veziroglu, T., 2001. Hydrogen production by biological processes: a survey of literature. *International Journal of Hydrogen Energy*, 26, 1, 13-28.
- Das, D; Khanna, N. and Veziroglu, T., 2008. Recent Developments In Biological Hydrogen Production Processes. *Chemical Industry & Chemical Engineering Quarterly* 14 (2), 57-67.
- Datar, R; Huang, J; Maness, P; Mohagheghi, R; Czernik, S. and Chornet, E., 2007. Hydrogen production from the fermentation of corn stover biomass pretreated with a steam-explosion process. *International Journal of Hydrogen Energy*, 32, 8, 932-939.
- Davila, G; Arriaga, S; Alatríste, F; De Leon, A; Rosales, L. and Razo, E., 2008. Fermentative biohydrogen production: trends and perspectives. *Rev Environ Sci Biotechnol.*, 7:27-45
- Eroglu, E; Gündüz, F; Yücel, M; Türker, L. and Eroglu, I., 2004. Photobiological hydrogen production by using olive mill wastewater as a sole substrate source. *International Journal of Hydrogen Energy*, 29, 2, February 2004, 163-171.
- Eroglu, I; Aslan, K; Gündüz, U; Yücel, M. and Türker, L., 1999. Substrate consumption rates for hydrogen production by *Rhodobacter sphaeroides* in a column photobioreactor. *Journal of Biotechnology* 70, Issues 1-3, 30 April 1999, Pages 103-113.
- Francou, N. & Vignais, P. M., 1984. Hydrogen production by *Rhodopseudomonas capsulata* cells entrapped in carrageenan beads. *Biotechnology Letters*, Vol. 6, No. 10, 639-644.
- Gomez, X; Moran, A; Cuetos, M. and Sanchez, M., 2006. The production of hydrogen by dark fermentation of municipal solid wastes and slaughterhouse waste: A two-phase process. *Journal of Power Sources*, 157, 727-732.
- He, D.; Bultel, Y.; Magnin, J.; 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.
- Hillmer, P. & Gest, H., 1977. H₂ Metabolism in the Photosynthetic Bacterium *Rhodopseudomonas capsulata*: H₂ Production by Growing Cultures. *Journal of Bacteriology*, Vol 129, No. 2, 724-731.
- Hillmer, P. & Gest, H., 1977. H₂ Metabolism in the Photosynthetic Bacterium *Rhodopseudomonas capsulata*: Production and Utilization of H₂ by Resting Cells. *Journal of Bacteriology*, Vol 129, No. 2, 732-739.
- Jounneau, Y.; Wong, B. & Vignais, P. M., 1985. Stimulation by Light of nitrogenase síntesis in cells of *Rhodopseudomonas capsulata* growing in N-limited continuous cultures. *Biochimica et Biophysica Acta*, 808, 149-155.
- Khanal, S; Chen, W; Li, L. and Sung, S., 2004. Biological hydrogen production: effects of pH and intermediate products. *International Journal of Hydrogen Energy*, 29, 11, 1123-1131.
- Kim, I; Hwang, M; Jang, N; Hyun, S. and Lee, S., 2004. Effect of low pH on the activity of hydrogen utilizing methanogen in bio-hydrogen process. *International Journal of Hydrogen Energy*, 29, 11, 1133-1140.
- Kleerebezem, R. and van Loosdrecht, M., 2007. Mixed culture biotechnology for bioenergy production. *Current Opinion in Biotechnology*, 18, 3, 207-212.
- Lee, K; Lin, P; Fangchiang, K. and Chang, J., 2007. Continuous hydrogen production by anaerobic mixed microflora using a hollow-fiber microfiltration membrane bioreactor. *International Journal of Hydrogen Energy*, 32, 8, 950-957.
- Levin, D; Pitt, L. and Murray, L., 2004. Biohydrogen production: prospects and limitations to practical Application. *International Journal of Hydrogen Energy*, 29, 2, 173-185.
- McFarland, Hunt, Campbell., 1993. *Energy, Physics and the Environment*. Wuerz Pub.
- Maeda, T; Sanchez, V. and Wood, T., 2007. Metabolic engineering to enhance bacterial hydrogen production. *Microbial Biotechnology*. *Journal compilation* © 2007 Society for Applied Microbiology and Blackwell Publishing Ltd.
- Melis, A. and Melnicki, M., 2006. Integrated biological hydrogen production. *International Journal of Hydrogen Energy*, 31, 11, 1563-1573.

Society for General Microbiology. Microbiology Today Magazine, Life's a gas...and it's hydrogen. Issue August 2008.

Miyake, J; Wakayama, T; SCHNACKENBERG, J; Takaaki, A. and Asada, Y., 1999. Simulation of the Daily Sunlight Illumination Pattern for Bacterial Photo-Hydrogen Production. JOURNAL OF BIOSCIENCE AND BIOENGINEERING, 88, 6, 659-663.

Miyamoto, K. & Miura, Y., 1980. Problems in Photobiological Production of Hydrogen. Process Biochemistry, June/July, 23-26.

Mohan, S; Babu, V. and Sarma, P., 2007. Anaerobic biohydrogen production from dairy wastewater treatment in sequencing batch reactor (AnSBR): Effect of organic loading rate. Enzyme and Microbial Technology, 41, 4, 3 September 2007, 506-515.

Mohan, S; Bhaskar, Y. and Sarma, P., 2007. Biohydrogen production from chemical wastewater treatment in biofilm configured reactor operated in periodic discontinuous batch mode by selectively enriched anaerobic mixed consortia. Water Research, 41, 12, June 2007, 2652-2664.

Mu, Y; Zheng, X; Yu, H. and Zhu, R., 2006. Biological hydrogen production by anaerobic sludge at various temperatures. International Journal of Hydrogen Energy, 31, 780 - 785.

Mu, Y; Wang, G. and Yu, H., 2006. Response surface methodological analysis on biohydrogen production by enriched anaerobic cultures. Enzyme and Microbial Technology, 38, 905-913.

Nakada, E.; Nishikata, S.; Asada, Y. & Miyake, J., 1999. Photosynthetic bacterial hydrogen production combined with a fuel cell. International Journal of Hydrogen Energy, 24, 1053-1057.

Ohta, Y.; Frank, J. & Mitsui, A. 1981. Hydrogen production by marine photosynthetic bacteria: Effect of environmental factors and substrate specificity on the growth of a hydrogen-producing marine photosynthetic bacterium, Chromatium SP. Miami

PBS 1071. Internacional J. Hydrogen Energy, Vol. 6, No. 5, 451-460.

O-Thong, S; Prasertsan, P; Intrasingkha, N; Dhamwichukorn, S. and Birkeland, N., 2007. Improvement of biohydrogen production and treatment efficiency on palm oil mill effluent with nutrient supplementation at thermophilic condition using an anaerobic sequencing batch reactor. Enzyme and Microbial Technology, 41, 5, 583-590.

Tsygankov, A., 2007. Nitrogen-Fixing Cyanobacteria: A Review. Applied Biochemistry and Microbiology, 43, 3, 250-259.

Valdez, I.; Rios, E.; Esparza, F.; Cecchi, F. and Poggi, M., 2004. Semi-continuous solid substrate anaerobic reactors for H₂ production from organic waste: Mesophilic versus thermophilic regime. International Journal of Hydrogen Energy, 30, 13-14, 1383-1391.

Vignais, P; Magnin, J. And Willison, J., 2006. Increasing biohydrogen production by metabolic Engineering. International Journal of Hydrogen Energy, 31, 11, 1478-1483.

Wang, Y; Mu, Y. and Yu, H., 2007. Comparative performance of two upflow anaerobic biohydrogen-producing reactors seeded with different sludges. International Journal of Hydrogen Energy, 32, 8, 1086-1094.

Willison, J. C.; Madern, D. & Vignais, P. M., 1984. Increased photoproduction of hydrogen by non-autotrophic mutants of Rhodospseudomonas capsulata. Biochem. J., 219, 593-600.

Yokoi, H; Maki, R; Hirose, J. and Hayashi, S., 2002. Microbial production of hydrogen from starch manufacturing wastes. Biomass and Bioenergy, 22, 5, Pages 389-395.

Zlatev, R., 2005. Rapport Scientifique, Laboratoire d' Electrochimie et de Physico-Chimie des Matériaux et Interfaces, Equipe de Génie des Procédés Appliqués à l'Energie et à l'Environnement, GP2E.

A7

Titulo: Producción Biológica de Hidrogeno Utilizando Productos de Desecho Industriales como Substrato y Luz Solar como Fuente de Energía.

Autores: Cesar Gonzalo Iñiguez Monroy, Roumen Koytchev Zlatev y Margarita Stilianova Stoytcheva.

Congreso: Coloquio Nacional de Estudiantes de Posgrado del Instituto de Ingeniería, Instituto de Ingeniería-UABC, Maestría y Doctorado en Ciencias e Ingeniería (2007).

Producción Biológica de Hidrógeno en un Reactor de Flujo Continuo, Utilizando Productos de Desecho Industriales como Substrato y Luz Solar como Fuente de energía.

Cesar Gonzalo Iñiguez Monroy*, Roumen Koytchev Zlatev** y Margarita Stoytcheva***

Instituto de Ingeniería

Maestría y Doctorado en Ciencias e Ingeniería

* Estudiante de Doctorado Campo del conocimiento: Química

** Director de tesis: Roumen Zlatev

***Codirectora de tesis: Margarita Stoytcheva

Mexicali, Baja California, MEXICO

email: iniguezmonroy@prodigy.net.mx

Resumen

La energía es vital para la prosperidad global, aunque la dependencia en combustibles fósiles como nuestra fuente primaria de energía contribuye al cambio climático global y problemas de salud. El cociente de las reservas petroleras sobre la producción de petróleo anual, nos dice que las reservas de algunos países (USA, México, Canadá, Noruega, Reino Unido), se estarían agotando en un máximo de 12 años, mientras que para otros (Arabia, Irak, Irán, Venezuela, Emiratos Árabes), este cociente se extiende desde los 75 hasta los 168 años, considerando los volúmenes de producción actuales y las reservas encontradas hasta el momento.

El hidrógeno es un recurso energético limpio y renovable. Tiene la mayor densidad energética gravimétrica conocida, y es compatible con procesos electroquímicos y de combustión para la conversión a energía, sin la producción de emisiones de carbono.

La producción fotobiológica de hidrógeno es una opción más ecológica que la electrolisis o la reforma del metano. Las bacterias fototróficas tienen la capacidad de utilizar la luz solar como fuente de energía y pueden alimentarse de substratos orgánicos derivados de productos de desecho. Por ende, este proceso tiene la capacidad de acoplarse a un sistema de tratamiento de aguas adicionalmente.

Palabras Clave – Hidrógeno, Reactor Biológico, Bacterias Fototróficas.

I. ANTECEDENTES

Los requerimientos actuales de energía a nivel global dependen mayormente de combustibles fósiles (cerca del 80% de la demanda energética mundial). Esta situación llevara eventualmente a un consumo de estos limitados recursos fósiles.

Hoy en día, la utilización de combustibles fósiles esta causando un cambio climático global, debido principalmente a la emisión de contaminantes que pueden nombrarse genéricamente como CO_x, NO_x, SO_x, C_xH_x, polvo de carbón, cenizas y otros compuestos orgánicos (Das and Veziroglu, 2001).

El efecto invernadero, el cual ha sido atribuido al incremento en la concentración de dióxido de carbono en el aire, debido al uso de los combustibles fósiles, ha estimulado la investigación en el campo de fuentes alternas de energía (Asada and Miyake, 1999).

El hidrógeno ofrece un gran potencial como un recurso energético limpio y renovable. El hidrógeno tiene la mayor densidad

energética gravimétrica que cualquier otro combustible conocido y es compatible con procesos electroquímicos y de combustión para la conversión a energía, sin la producción de emisiones de carbono, las cuales contribuyen a la contaminación ambiental y al cambio climático. Las celdas de combustible de hidrógeno y la tecnología relacionada a ellas proveen la conexión esencial entre fuentes renovables de energía y servicios energéticos sostenibles. La transición de una economía basada en combustibles fósiles a una economía basada en energía de hidrógeno sin embargo, esta acompañada de muchos retos técnicos; desde la producción de cantidades suficientes de hidrógeno, hasta su almacenamiento, transmisión y distribución (Levin et al., 2004).

El hidrógeno tiene otros usos varios, los cuales pueden ser divididos en las siguientes categorías:

- a) Como reactante en procesos de hidrogenación.
- b) Como removedor de trazas de oxígeno para evitar oxidación y corrosión.
- c) Como combustible de cohetes.
- d) Como refrigerante en generadores eléctricos.

Estos usos del hidrógeno corresponden al 3% del consumo de energía actualmente y se espera que crezca significativamente en los próximos años (Das and Veziroglu, 2001).

El hidrógeno puede ser producido por una diversidad de procesos, incluyendo la electrolisis del agua, la reforma termo catalítica de compuestos orgánicos ricos en hidrógeno y procesos biológicos. Actualmente, el hidrógeno es producido casi exclusivamente mediante la electrolisis del agua y la reforma con vapor del metano. La

producción biológica de hidrógeno (biohidrógeno), utilizando microorganismos es una nueva área de la tecnología que ofrece el potencial de producción de hidrógeno partiendo de diversas fuentes renovables (Levin et al., 2004).

Por otro lado, pueden utilizar diversos productos de desecho, lo cual facilita el reciclado de los mismos (Das and Veziroglu, 2001).

Estos sistemas, además, pueden utilizar la luz solar como fuente de energía primaria. Las eficiencias de conversión menores, respecto a la de las celdas solares, puede ser compensada por sus requerimientos de energía más bajos, así como por su menor inversión inicial (Asada and Miyake, 1999).

Todos los procesos de producción biológica de hidrógeno dependen fundamentalmente en la presencia de una enzima que lo produzca. Las enzimas que producen hidrógeno catalizan una de las reacciones químicas mas simples: $2H^+ + 2e^- \leftrightarrow H_2$.

Dos tipos de enzimas pueden catalizar la reducción de protones a H_2 , nitrogenasa e hidrogenasa. A pesar de los esfuerzos en dilucidar la estructura, regulación y expresión genética de estas enzimas, no existe un proceso práctico y económicamente competitivo para la producción continua de biohidrógeno, que haya sido puesto en el mercado.

Una de las razones principales es que la salida de H_2 representa una pérdida energética para la célula, mientras que las rutas metabólicas microbianas han evolucionado para la racionalización del uso de energía y la optimización de la velocidad de crecimiento (Vignais et al., 2006).

Sin embargo, Levin et al., 2004, encontraron que teóricamente los sistemas acoplados de producción de hidrógeno con

celdas de combustible, pueden proveer la energía necesaria para cumplir con los requerimientos energéticos de una casa habitación en Canadá. Los volúmenes de reactores varían desde los 500 l hasta los 17,000 l, dependiendo del sistema biológico utilizado y sus condiciones de operación.

Las celdas de combustible son dispositivos electroquímicos capaces de crear un flujo de electrones usando iones cargados. Una gran variedad de sistemas de celdas de combustible han sido desarrollados, los cuales difieren en el tipo de electrolito usado, condiciones de operación, rango de densidad de potencia, etc.

La producción biológica de hidrógeno puede ser clasificada como sigue (Das and Veziroglu, 2001):

1. Biofotólisis del agua, utilizando algas y cianobacterias.
2. Fotodescomposición de compuestos orgánicos mediante bacterias fotosintéticas.
3. Producción fermentativa de hidrógeno de compuestos orgánicos.
4. Sistemas híbridos que utilizan bacterias fotosintéticas y fermentativas.

Uno de los mayores obstáculos para obtener una producción sostenida de H_2 en la biofotólisis del agua, es la producción de oxígeno, el cual desactiva irreversiblemente los sistemas productores de hidrógeno y soporta el proceso de consumo del H_2 (Das and Veziroglu, 2001).

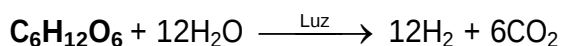
Fotodescomposición de Compuestos Orgánicos

Este proceso es también llamado fotofermentación y a las bacterias involucradas se les llama fototróficas, las cuales están indicadas en la literatura como los sistemas microbianos más prometedores para la producción de hidrógeno (Das and Veziroglu, 2001).

Presenta las siguientes ventajas:

- 1) Rendimientos teóricos de conversión altos.
- 2) Ausencia de producción de oxígeno.
- 3) Capacidad de utilizar un amplio espectro de luz.
- 4) Capacidad de consumir substratos orgánicos derivados de productos de desecho y por lo tanto, su capacidad de acoplarse a un sistema de tratamiento de aguas.

Las bacterias púrpura no sulfuradas producen H_2 catalizado por la nitrogenasa bajo condiciones de deficiencia de nitrógeno, utilizando energía luminosa y ácidos orgánicos (Levin et al., 2004):



Otra ventaja de este proceso es que la producción de H_2 continúa, aun cuando el líquido de fermentación se encuentra saturado con hidrógeno.

Producción Fermentativa de Hidrógeno

Aunque se le ha puesto menor atención, esta presenta diversas ventajas:

- 1) Producción alta de hidrógeno.
- 2) Producción continua durante día y noche.
- 3) Buena velocidad de crecimiento de microorganismos para abastecer el sistema de producción.

Estas características le proporcionan ventajas sobre la producción fotoquímica. Sin embargo, el hidrógeno producido también puede contener, además de dióxido de carbono, monóxido de carbono, metano y sulfuro de hidrógeno, los cuales a ciertos niveles pueden constituir un veneno para las celdas de combustión (Levin et al., 2004).

Sistemas híbridos

Algunos investigadores han propuesto el uso de un cultivo mixto (*Kleerebezem and van Loosdrecht, 2007; Lee et al., 2006; Mohan et al., 2007, Melis and Melnicki, 2006*), generalmente bacterias fototróficas con bacterias fermentativas, con el objetivo de incrementar las cantidades de hidrógeno producidas.

Substratos y Condiciones de Proceso

Diversos medios de cultivo, comúnmente productos de desecho han sido propuestos. Entre otros están el uso de desechos de la industria lechera (*Mohan et al., 2007*); rastrojo de maíz (*Datar et al., 2006*); almidón (*Yokoi et al., 2002*); aceite de palma (*O-Thong et al., 2007*); aceite de oliva (*Eroglu et al., 2003*); desechos municipales, y rastros (*Gómez et al., 2006*).

Por otro lado, también ciertos parámetros de proceso como el pH (*Khanal et al., 2003; Kim et al., 2003; Zhao and Yu, 2007*), temperatura (*Mu et al., 2006; Valdez et al., 2004*), el tipo de luz y su intensidad (*Miyake et al., 1999; Akkerman et al., 2002*) han sido investigados.

Melis and Melnicki, 2006, utilizaron un cultivo mixto constituido en primer lugar de algas verdes, las cuales tienen la capacidad de captar la porción visible de la luz solar; y en segundo lugar de bacterias fotosintéticas

anoxigénicas, las cuales pueden captar las emisiones solares cercanas al infrarrojo.

Además, métodos estadísticos y de diseño de experimentos han sido empleados con el objetivo de optimizar los rendimientos de hidrógeno (*Cuetos et al., 2007; Chen et al., 2006; Mu et al., 2005*).

Finalmente, otra fuente de optimización en la producción de H_2 se encuentra en el diseño de biorreactores, los cuales maximicen la absorción de luz por parte de las bacterias; ya sea mediante agitación o mediante el incremento del área superficial con respecto al volumen del reactor (*Zlatev, 2005*). Entre los diversos diseños se encuentran el reactor batch de secuenciación SBR (*Mohan et al., 2007*); microfiltración de membrana (*Lee et al., 2006*); de flujo ascendente 'upflow' (*Wang et al., 2006*); fotobiorreactores de columna (*Eroglu et al., 1999*); fotobiorreactor flotante (*Asada and Miyake, 1999*).

Reactor

Ya que el hidrógeno producido debe ser colectado, el fotorreactor debe ser un sistema cerrado. Debe ser también práctico de esterilizar. La productividad de este reactor esta limitada por la luz, por lo cual una relación superficie/volumen de reactor alta es necesaria. Las eficiencias fotoquímicas son bajas (alrededor del 10%), y tienden a decrecer a medida que la intensidad de la luz crece (efecto de saturación de la luz, ya que no todos los fotones son utilizados para la energía de reacción, sino que son disipados como calor). Esto significa que para crear un proceso biológico eficiente es importante ya sea diluir la luz y distribuirla en lo posible en el volumen del reactor y/o mezclar el cultivo a una velocidad alta para que las células sean expuestas a la luz solo por un

periodo corto de tiempo (Akkerman et al., 2002).

Dependiendo del tipo de reactor y la forma en que este es operado, las células son acarreadas durante cierto periodo de tiempo a superficies expuestas a la luz y luego a superficies oscuras. Estos ciclos de luz/oscuridad inducidos por el mezclado, cuando se encuentran en el rango de micro o milisegundos, pueden mejorar la eficiencia fotoquímica (Akkerman et al., 2002).

Zlatev, 2005 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 semicontínuos, en los cuales la superficie de contacto de las bacterias con la luz es maximizada.

Microorganismos

Entre las bacterias fotosintéticas heterótrofas, la *Rhodobacter capsulatus* fue elegida por su fuerte capacidad de producir hidrógeno (He et al., 2005; Willison et al., 1984; Hillmer and Gest, 1977; Nakada et al., 1999, Jounneau and Vignais, 1985). 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 (Zlatev 2005, Miyamoto and Miura, 1980). De acuerdo con Das and Veziroglu, 2001; el máximo rendimiento de esta bacteria es de 5.3 mmol H₂/l.hr, el cual es de los mas competitivos; solo superado por las bacterias fermentativas *Enterobacter aerogens* con 11.36 mmol H₂/l.hr, la *Citrobacter intermedius* con 11 mmol H₂/l.hr y por la *Enterobacter cloacae* con 37 mmol H₂/l.hr; aunque estas ultimas producen también altas concentraciones de ácidos grasos.

Akkerman et al., 2002 encontraron que para el caso de las bacterias púrpura, la ventana de Radiación Fotosintética Activa PAR, se encuentra entre los 400 y los 950 nm y que el 65.8% de la radiación solar se encuentra en esta ventana. Sin embargo, para el caso de las microalgas, este porcentaje es de 43%, ya que su ventana PAR se encuentra entre los 400 y los 700 nm.

Además, la magnitud de la radiación solar depende del lugar geográfico y las condiciones climáticas. Por ejemplo la magnitud de esta radiación es de 18 MJm⁻² d⁻¹ en Ámsterdam, mientras que en Sevilla es de 26.6 MJm⁻²d⁻¹. La intensidad de la luz solar tiene una incidencia directa en la cantidad de hidrógeno producida por las bacterias fotosintéticas (Akkerman et al., 2002).

II. PROBLEMÁTICA

De acuerdo al modelo de Hubbert acerca de la duración de las reservas petroleras, la cantidad de barriles producidos alcanzara un pico, para después decrecer a medida que se consumen las reservas, formando una gráfica en campana. Tomando datos de reservas reales y proyectadas del Departamento de energía de los Estados Unidos, este modelo predice que la producción de barriles de petróleo alcanzará su máximo en el 2009, cayendo hasta cero en el 2090 (McFarland et al., 1993). Ver *tabla 1*.

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

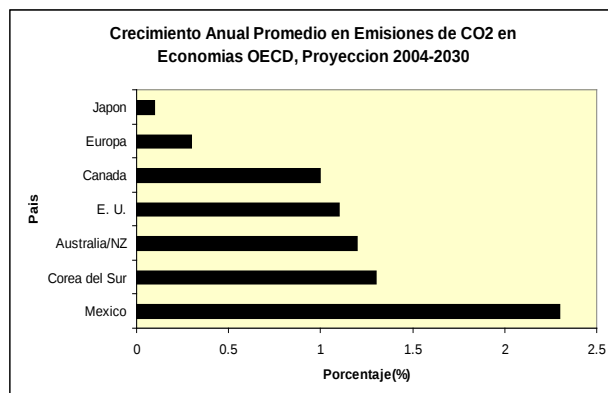
Tabla 1. Producción petrolera en millones de barriles diarios y relación Reserva/Producción petrolera en años, mostrando la duración pronosticada de las reservas al ritmo de consumo actual. Fuentes: Producción del 2005: US Energy Information Administration, Short-Term Energy Outlook (Octubre 2006). Reservas: Worldwide Look at Reserves and Production, Oil and Gas Journal, vol. 104, No 47, (December 18, 2006), pp. 24-25.

Pais	Produccion en 2005 (millones de barriles diarios)	% de la Produccion Mundial	Relacion Reserva/Produccion (años)
Arabia Saudita	9.55	13.3	75
Rusia	9.04	12.6	18
Estados Unidos	5.18	7.2	11
Iran	4.14	5.7	83
China	3.61	5	14
Mexico	3.33	4.6	12
Noruega	2.7	3.7	9
Nigeria	2.63	3.6	37
Emiratos Arabes	2.54	3.5	106
Kuwait	2.53	3.5	110
Venezuela	1.98	2.7	107
Iraq	1.88	2.6	168
Algeria	1.8	2.5	18
Reino Unido	1.65	2.3	7
Brazil	1.63	2.3	18
Libia	1.63	2.3	65
Canada	1.28	1.8	10
Angola	1.26	1.7	12
Indonesia	1.07	1.5	12
Kazakhstan	1.05	1.5	23
Qatar	0.84	1.2	50
Oman	0.77	1.1	19
Malasia	0.75	1	11
Argentina	0.7	1	10
India	0.66	0.9	22

Hoy en día, la utilización de combustibles fósiles esta causando un cambio climático global, debido principalmente a la emisión de contaminantes que pueden nombrarse genéricamente como CO_x, NO_x, SO_x, C_xH_x, polvo de carbón, cenizas y otros compuestos orgánicos (Das and Veziroglu, 2001).

México es uno de los países cuyas emisiones de dióxido de carbono crece a mayor porcentaje anual, tal como lo muestra la tabla 2.

Tabla 2. Proyección de crecimiento anual promedio de emisiones de CO₂, relacionadas con combustibles fósiles, para países miembros de la Organización para la Cooperación Económica y el Desarrollo. Fuentes: 2004: Energy Information Administration (EIA), International Energy Annual 2004; 2030: EIA, System for the Analysis of Global Energy Markets (2007).



El impacto en la economía de los países importadores de petróleo, así como en el medio ambiente global, han llevado a países como Estados Unidos a iniciar programas como el 'Programa Hidrógeno' (US Department of Energy, Energy Program), bajo el cual se destinan recursos a la investigación en el desarrollo de la tecnología de la producción, almacenamiento y uso del hidrógeno.

El hidrógeno puede ser producido por una diversidad de procesos, incluyendo la electrolisis del agua, la reforma termocatalítica de compuestos orgánicos ricos en hidrógeno y procesos biológicos. Actualmente, el hidrógeno es producido casi exclusivamente mediante la electrólisis del agua y la reforma con vapor del metano. La producción biológica de hidrógeno (biohidrógeno), utilizando microorganismos es una nueva área de la tecnología que ofrece el potencial de producción de

hidrógeno partiendo de diversas fuentes renovables (Levin et al., 2004).

Uno de los principales problemas a resolver para hacer posible el uso industrial del H₂ como combustible, consiste en desarrollar métodos de producción ecológicamente puros (Tsygankov, 2007). Las bacterias fototróficas tienen la capacidad de consumir sustratos orgánicos derivados de productos de desecho y por lo tanto, tienen la capacidad de acoplarse a un sistema de tratamiento de aguas, lo cual las hace mas atractivas desde el punto de vista ecológico (Das and Veziroglu, 2001).

Si a esto le sumamos el empleo de la luz solar como fuente de energía, entonces el costo de la producción de H₂ se reduce, mientras que el proceso en si es ecológicamente limpio al evitar el uso de lámparas y su consecuente consumo de electricidad.

III. OBJETIVOS

Objetivo General

Producir hidrógeno gaseoso mediante la operación de un reactor plano continuo, utilizando productos industriales de desecho como sustrato y empleando la luz solar como fuente de energía.

Objetivos Particulares

1. Diseñar un reactor biológico plano, el cual optimice la producción de hidrógeno, maximizando al mismo tiempo la relación superficie/volumen del reactor y la distribución lumínica a través del cuerpo del mismo.
2. Establecer la combinación óptima de parámetros de pH, temperatura, iluminación y flujo de sustrato, los cuales en conjunto con el diseño del

reactor maximicen la producción de hidrógeno.

3. Desarrollar el sustrato o formulación de sustrato óptimo para la bacteria *Rhodobacter Capsulatus*, en régimen sencillo o integrado, tomando como base productos de desecho industriales de la región.
4. Determinar el rango óptimo de frecuencias luminosas para la producción de hidrógeno con la bacteria mencionada, así como las condiciones necesarias para operar el reactor biológico con luz solar.
5. Evaluar la factibilidad de utilizar un reactor de este tipo a escala, para el tratamiento de productos de desecho a nivel industrial.

IV. FUNDAMENTACION

Este estudio se basa en primera instancia, en la hipótesis de que es posible obtener hidrógeno gaseoso a través del proceso fotosintético de una bacteria de la familia de las *Rhodopseudomonas* (Zlatev, 2005, He et al., 2005, Levin et al., 2004; Hillmer and Gest, 1977), entre otros.

Por otro lado, se basa en la hipótesis de que es posible mejorar los rendimientos de producción de hidrógeno, mediante el uso de reactores planos que maximicen la relación superficie/volumen (Zlatev, 2005; Akkerman et al., 2002).

Además, este estudio se apoya en el hecho de que es posible utilizar desechos industriales como sustrato en la producción de biohidrógeno (Mohan et al., 2007; Datar et al., 2006; Yokoi et al., 2002; O-Thong et al., 2007; Eroglu et al., 2003; Gómez et al., 2006).

Finalmente, este estudio se basa en el hecho de que puede utilizarse como fuente

de energía la luz solar, en lugar de lámparas para iniciar la fotosíntesis de las bacterias (Akkerman et al., 2002; Asada and Miyake, 1999; Melis and Melnicki, 2006).

V. BOSQUEJO METODOLOGICO

La fuente bacteriana de producción de hidrógeno será la *Rhodobacter capsulatus*, variedad salvaje B10 y una variedad mutante llamada IR3 (Willison et al., 1984).

El reactor fotosintético será un reactor plano de plexiglás. Las placas de plexiglás en este nuevo diseño estarán superpuestas, con la finalidad de mejorar la absorción luminosa de las bacterias. Además, un recubrimiento de material reflejante será adherido a la primera placa, con el objetivo de reflejar la luz y mejorar su aprovechamiento.

Este reactor se alimentara en un régimen continuo, por un efluente proveniente de un contenedor estéril. Para ello, el substrato pasará por un generador de luz ultravioleta.

El reactor será hecho básicamente con placas de plexiglás de 4 mm de espesor, con un espaciamiento de 20 a 30 mm entre si, creando un compartimiento. Los cierres serán herméticos, dejando tres aperturas, una para la salida de hidrógeno producido y otras dos - para sondas de pH y temperatura.

Una bomba será la responsable de mantener una recirculación dentro del reactor, permitiendo su agitación. El hidrógeno generado pasara por un flujómetro de masa y luego a un recipiente con un tubo de vidrio invertido, lleno de una solución alcalina, destinada a la absorción del dióxido de carbono mínimamente generado. Al mismo tiempo, la variación en el nivel del líquido dentro del tubo invertido será

una medida proporcional del flujo de hidrógeno producido.

Además, su construcción cumplirá los requisitos de:

1. Elevar la relación superficie/volumen de reactor.
2. Disminuir el fenómeno de saturación por la luz (dilución de la luz), lo que implica mejorar la repartición de luz en el reactor.
3. Disminuir la limitación de penetración de la luz en el seno del medio.
4. Trabajar con luz solar como fuente de energía.

IV. CONCLUSION

La producción de hidrógeno en la forma aquí propuesta es compatible con la necesidad del desarrollo de fuentes de energía renovables alternativas. No solamente es una fuente de energía limpia, en el sentido de la combustión del hidrógeno, que produce solamente agua. Lo es también en el hecho de que durante su producción se utilizarán únicamente productos de desecho, con el valor añadido de que es posible crear al mismo tiempo un método de tratamiento de aguas residuales en la industria alimenticia.

V. AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, por el otorgamiento de la Beca de Doctorado #89724.

VI. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Akkerman, I; Janssen, M; Rocha, J. and Wijffels, R., 2002. Photobiological hydrogen production: photochemical efficiency and bioreactor design. *International Journal of Hydrogen Energy*, 27, 11-12, 1195-1208.
- Asada, Y. and Miyake, J., 1999. Photobiological Hydrogen Production. *JOURNAL OF BIOSCIENCE AND BIOENGINEERING*, 88, No. 1, 1-6.
- Chen, C; Lu, W; Wu, J. and Chang, J., 2007. Enhancing phototrophic hydrogen production of *Rhodopseudomonas palustris* via statistical experimental design. *International Journal of Hydrogen Energy*, 32, 8, 940-949.
- Cuetos, M; Gómez, A; Escapa, A. and . Morán, A., 2007. Evaluation and simultaneous optimization of biohydrogen production using 32 factorial design and the desirability function. *Journal of Power Sources*, 169, 1, 131-139.
- Das, D. and Veziroglu, T., 2001. Hydrogen production by biological processes: a survey of literature. *International Journal of Hydrogen Energy*, 26, 1, 13-28.
- Datar, R; Huang, J; Maness, P; Mohagheghi, R; Czernik, S. and Chornet, E., 2007. Hydrogen production from the fermentation of corn stover biomass pretreated with a steam-explosion process. *International Journal of Hydrogen Energy*, 32, 8, 932-939.
- Eroglu, E; Gündüz, F; Yücel, M; Türker, L. and Eroglu, I., 2004. Photobiological hydrogen production by using olive mill wastewater as a sole substrate source. *International Journal of Hydrogen Energy*, 29, 2, February 2004, 163-171.
- Eroglu, I; Aslan, K; Gündüz, U; Yücel, M. and Türker, L., 1999. Substrate consumption rates for hydrogen production by *Rhodobacter sphaeroides* in a column photobioreactor. *Journal of Biotechnology* 70, Issues 1-3, 30 April 1999, Pages 103-113.
- Francou, N. & Vignais, P. M., 1984. Hydrogen production by *Rhodopseudomonas capsulata* cells entrapped in carrageenan beads. *Biotechnology Letters*, Vol. 6, No. 10, 639-644.
- Gomez, X; Moran, A; Cuetos, M. and Sanchez, M., 2006. The production of hydrogen by dark fermentation of municipal solid wastes and slaughterhouse waste: A two-phase process. *Journal of Power Sources*, 157, 727-732.
- He, D.; Bultel, Y.; Magnin, J.; 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.
- Hillmer, P. & Gest, H., 1977. H₂ Metabolism in the Photosynthetic Bacterium *Rhodopseudomonas capsulata*: H₂ Production by Growing Cultures. *Journal of Bacteriology*, Vol 129, No. 2, 724-731.
- Hillmer, P. & Gest, H., 1977. H₂ Metabolism in the Photosynthetic Bacterium *Rhodopseudomonas capsulata*: Production and Utilization of H₂ by Resting Cells. *Journal of Bacteriology*, Vol 129, No. 2, 732-739.
- Jounneau, Y.; Wong, B. & Vignais, P. M., 1985. Stimulation by Light of nitrogenase síntesis in cells of *Rhodopseudomonas capsulata* growing in N-limited continuous cultures. *Biochimica et Biophysica Acta*, 808, 149-155.
- Khanal, S; Chen, W; Li, L. and Sung, S., 2004. Biological hydrogen production: effects of pH and intermediate products. *International Journal of Hydrogen Energy*, 29, 11, 1123-1131.
- Kim, I; Hwang, M; Jang, N; Hyun, S. and Lee, S., 2004. Effect of low pH on the activity of hydrogen utilizing methanogen in bio-hydrogen process. *International Journal of Hydrogen Energy*, 29, 11, 1133-1140.
- Kleerebezem, R. and van Loosdrecht, M., 2007. Mixed culture biotechnology for bioenergy production. *Current Opinion in Biotechnology*, 18, 3, 207-212.
- Lee, K; Lin, P; Fangchiang, K. and Chang, J., 2007. Continuous hydrogen production by anaerobic mixed microflora using a hollow-fiber microfiltration membrane bioreactor. *International Journal of Hydrogen Energy*, 32, 8, 950-957.
- Levin, D; Pitt, L. and Murray, L., 2004. Biohydrogen production: prospects and limitations to practical Application. *International Journal of Hydrogen Energy*, 29, 2, 173-185.

McFarland, Hunt, Campbell., 1993. Energy, Physics and the Environment. Wuerz Pub.

Melis, A. and Melnicki, M., 2006. Integrated biological hydrogen production. *International Journal of Hydrogen Energy*, 31, 11, 1563-1573.

Miyake, J; Wakayama, T; SCHNACKENBERG, J; Takaaki, A. and Asada, Y., 1999. Simulation of the Daily Sunlight Illumination Pattern for Bacterial Photo-Hydrogen Production. *JOURNAL OF BIOSCIENCE AND BIOENGINEERING*, 88, 6, 659-663.

Miyamoto, K. & Miura, Y., 1980. Problems in Photobiological Production of Hydrogen. *Process Biochemistry*, June/July, 23-26.

Mohan, S; Babu, V. and Sarma, P., 2007. Anaerobic biohydrogen production from dairy wastewater treatment in sequencing batch reactor (AnSBR): Effect of organic loading rate. *Enzyme and Microbial Technology*, 41, 4, 3 September 2007, 506-515.

Mohan, S; Bhaskar, Y. and Sarma, P., 2007. Biohydrogen production from chemical wastewater treatment in biofilm configured reactor operated in periodic discontinuous batch mode by selectively enriched anaerobic mixed consortia. *Water Research*, 41, 12, June 2007, 2652-2664.

Mu, Y; Zheng, X; Yu, H. and Zhu, R., 2006. Biological hydrogen production by anaerobic sludge at various temperatures. *International Journal of Hydrogen Energy*, 31, 780 - 785.

Mu, Y; Wang, G. and Yu, H., 2006. Response surface methodological analysis on biohydrogen production by enriched anaerobic cultures. *Enzyme and Microbial Technology*, 38, 905-913.

Nakada, E.; Nishikata, S.; Asada, Y. & Miyake, J., 1999. Photosynthetic bacterial hydrogen production combined with a fuel cell. *International Journal of Hydrogen Energy*, 24, 1053-1057.

Ohta, Y.; Frank, J. & Mitsui, A. 1981. Hydrogen production by marine photosynthetic bacteria: Effect of environmental factors and substrate specificity on the growth of a hydrogen-producing marine photosynthetic bacterium, *Chromatium SP.* Miami PBS 1071. *Internacional J. Hydrogen Energy*, Vol. 6, No. 5, 451-460.

O-Thong, S; Prasertsan, P; Intrasungkha, N; Dhamwichukorn, S. and Birkeland, N., 2007. Improvement of biohydrogen production and treatment efficiency on palm oil mill effluent with nutrient supplementation at thermophilic condition using an anaerobic sequencing batch reactor. *Enzyme and Microbial Technology*, 41, 5, 583-590.

Tsygankov, A., 2007. Nitrogen-Fixing Cyanobacteria: A Review. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 43, 3, 250-259.

Valdez, I.; Rios, E.; Esparza, F.; Cecchi, F. and Poggi, M., 2004. Semi-continuous solid substrate anaerobic reactors for H₂ production from organic waste: Mesophilic versus thermophilic regime. *International Journal of Hydrogen Energy*, 30, 13-14, 1383-1391.

Vignais, P; Magnin, J. And Willison, J., 2006. Increasing biohydrogen production by metabolic Engineering. *International Journal of Hydrogen Energy*, 31, 11, 1478-1483.

Von Felten, P.; Zurrer, H. & Bachofen, R., 1985. Production of molecular hydrogen with immobilized cells of *Rhodospirillum rubrum*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 23: 15-20.

Wang, Y; Mu, Y. and Yu, H., 2007. Comparative performance of two upflow anaerobic biohydrogen-producing reactors seeded with different sludges. *International Journal of Hydrogen Energy*, 32, 8, 1086-1094.

Willison, J. C.; Madern, D. & Vignais, P. M., 1984. Increased photoproduction of hydrogen by non-autotrophic mutants of *Rhodopseudomonas capsulata*. *Biochem. J.*, 219, 593-600.

Yokoi, H; Maki, R; Hirose, J. and Hayashi, S., 2002. Microbial production of hydrogen from starch manufacturing wastes. *Biomass and Bioenergy*, 22, 5, Pages 389-395.

Zlatev, R., 2005. Rapport Scientifique, Laboratoire d' Electrochimie et de Physico-Chimie des Matériaux et Interfaces, Equipe de Génie des Procédés Appliqués à l'Energie et à l'Environnement, GP2E.

