



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

---

---

**PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN  
INGENIERÍA**

**CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN ENERGÍA**

**“PRODUCCIÓN DE HIDRÓGENO A PARTIR DE  
MICROORGANISMOS FOTOSINTÉTICOS PARA SU  
EMPLEO EN CELDAS DE COMBUSTIBLE TIPO  
PEM”**

**T E S I S**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

**DOCTOR EN INGENIERÍA**

ENERGÍA – FUENTES RENOVABLES

P R E S E N T A:

**M en Ingeniería. Alina Juantorena Ugás**

TUTOR:

**Dr. Sebastian Pathiyamattom Joseph**



Temixco, Morelos, México, 2007



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

**JURADO ASIGNADO:**

Presidente: Dr. Edgar Rolando Santoyo Gutiérrez  
Secretario: Dr. Sebastian Pathiyamattom Joseph  
Vocal: Dr. Dr. Alberto Armando Álvarez Gallegos  
1<sup>er</sup> Suplente: Dr. Sergio Alberto Gamboa Sánchez  
2<sup>do</sup> suplente: Dra. Susana Silva Martínez

**Lugar o lugares donde se realizó la tesis:**

CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN ENERGÍA, UNAM

**TUTOR DE TESIS**

Dr. Sebastian Pathiyamattom Joseph

**FIRMA**

# DEDICATORIA

A MIS PRINCESAS: HILDA LIZ, LIZ AMELIA Y

LAURA LIZ

A MI REINA: MARÍA AMELIA

AL GRAN AMOR DE MI VIDA: ARMANDO

A TODOS MIS FAMILIARES Y AMIGOS: POR LA PACIENCIA DE ESPERAR Y

APOYARME CON SU ALEGRÍA HASTA LA CULMINACIÓN DE ESTA ETAPA

DE MI VIDA.

“NO DEJES QUE TERMINE EL DÍA SIN HABER  
CRECIDO UN POCO,  
SIN HABER SIDO FELIZ,  
SIN HABER AUMENTADO TUS SUEÑOS.  
NO TE DEJES VENCER POR EL DESALIENTO.  
NO PERMITAS QUE NADIE TE quite EL DERECHO A  
EXPRESARTE,  
QUE ES CASI UN DEBER.  
NO ABANDONES LAS ANSIAS DE HACER DE TU  
VIDA ALGO EXTRAORDINARIO.  
NO PERMITAS QUE LA VIDA PASE POR TI, SIN QUE  
LA VIVAS”.

# AGRADECIMIENTOS

Mis sinceros agradecimientos:

A la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), al Centro de Investigación en Energía (CIE-UNAM) y al Posgrado de Ingeniería (UNAM).

A la Dirección General de Estudios de Posgrado (DEGEP-UNAM), por haberme otorgado una beca para realizar mis estudios de Doctorado.

A los Proyectos CUenergía\_1\_16 (UNAM), Grant G38618U (CONACYT) y UPCHIS-PTC-007 (PROMEP).

Al Jurado revisor de la tesis:

Dr. Sebastian Pathiyamattom Joseph CIE-UNAM

Dr. Edgar Santoyo Gutiérrez (CIE-UNAM)

Dr. Sergio Gamboa Sánchez (CIE-UNAM)

Dr. Alberto Álvarez Gallegos (CICAP-UAEM)

Dra. Susana Silva Martínez (CICAP-UAEM)

A todos por la dedicación de parte de su tiempo a la revisión y las sugerencias para el mejoramiento de este trabajo de tesis y muy en especial al Dr. Edgar Santoyo.

Al Dr. P. J. Sebastian, por no ser sólo mi Jefe sino mi amigo.

Al Instituto de Biotecnología (UNAM) y al grupo de trabajo del Dr. Rafael Vázquez Duhalt, en especial al Dr. Vázquez por aceptarme en su grupo, parte del tiempo de realización de este trabajo, brindarme asesoría, apoyo material y equipamiento necesario para la realización de parte de este trabajo. Al Téc. Académico MSc. Raunel Tinoco y la Lic. Rosa Román, por el adiestramiento para el trabajo en ese laboratorio, a la Dra. Brenda Valderrama y a los que fueron estudiantes durante algún tiempo junto conmigo y dedicaron parte de su tiempo a darme valiosas enseñanzas (Gabriela Mortera, Gustavo Dávila, Jorge Verdín, Nuria Jiménez, Juan Carlos Canul, Adriana Longoria, Paloma Gil, Rosalía Goicochea).

Al grupo de la Planta Piloto del (IBT-UNAM), al Dr. Leobardo Serrano, MSc. Manuel Patiño, a la Ing. Verónica Albiter y Lic. Miriam Ortiz y en especial al Téc. Mario Alberto Caro, por sus valiosas enseñanzas y colaboración en algunos momentos necesarios, para la conservación de los cultivos de microorganismos.

En otros laboratorios del IBT-UNAM, a la Dra. Alejandra Covarrubias por la prestación de uno de los equipos fundamentales en el trabajo de tesis, a la Lic. Lizbeth Cabrera, a la MSc. Celia Flores, al Dr. Alfredo Martínez.

A los amigos cercanos que me han acompañado en estos años de estudio: Joel Moreira, Joel Pantoja, Airel Núñez, Yamilet Lezcano, Liliana Echeverría, Carlos Rodríguez, Guillermo Ibáñez, Hugo Cortina, Pedro Gallart, Geovannis Hernández, Rafael Dorrego y en especial a Orlando Lastres, por ser además colaborador en este trabajo.

En el Centro de Investigación en Energía (CIE-UNAM) al M. Sc. José Campos por su valiosa ayuda y colaboración en los montajes eléctricos, al Dr. Nair y Dra. Nair, al Téc. Académico Oscar Gómez Daza, por permitirme utilizar su laboratorio para realizar algunas mediciones, al Dr. Xavier Mathiew y Téc. Académico Gildardo Casarrubias, por prestarme equipamiento para la realización de algunos experimentos. Al Ing. Rubén Guevara, por la asistencia técnica para la realización de algunos experimentos. A la Dra. Liliana Alzate, al Téc. Académico José de Jesús Quiñones Aguilar. A mis compañeros del grupo de Hidrógeno-Celdas Combustible del CIE.

En el Centro de Ciencias Físicas (CCF-UNAM), al Ing. Armando Bustos Gómez, por su asistencia técnica y colaboración en gran parte de este trabajo; al Dr. Jaime Urquijo, Dr. Horacio Martínez, Ing. Anselmo González Trujillo, por la prestación de equipamiento para la realización del trabajo; **Téc. José A. Reyes** por su atención a mi equipo de cómputo, a las compañeras de la Biblioteca, personal de administración, limpieza y vigilantes, que me han acompañado y brindado sus servicios en estos años.

En el Centro de Investigaciones Aplicadas (CICAP-UAEM), al Dr. Isaií Rosales, por las revisiones de trabajos realizados. Al MSc. René Guardián, por su colaboración para la realización de trabajos en el microscopio óptico.

En el Instituto de Investigaciones Eléctricas, al Jefe de Departamento de Geotermia Enrique Portugal, al Dr. Peter Birkle, al Ing. Domingo Sánchez y al Téc. Vicente Betancourt, por su colaboración y prestación de equipamiento para la realización de parte de este trabajo.

A la Dra. Mascha Smit y Jaime Padilla por haber participado en mi Comité Tutorial.

A la Facultad de Ingeniería Química de la Universidad de Oriente (CUBA), donde realicé mis estudios de Ingeniería Química y Maestría en Ingeniería de Procesos y al Centro de Investigación en Energía (CUBA), en donde comencé a realizar trabajos de investigación y a formarme como Investigadora.

A mis padres: María Amelia y Abraham.

A mis hijas: Hilda Liz, Liz Amelia y Laura Liz.

A mis hermanos: Abraham, Adalberto, Arianna y Leticia.

A mis sobrinas: Arlett y e Isachi Karla.

A mis familiares y amigos: que han apoyado y cuidado a mi mamá y a mis hijas durante todo este tiempo: Caridad Ramírez, Reina Calderín, Graciela Olivares, Francisco Barrios (Paquitín), Julián, Estrellita, Rubén Cobo, José Raúl González, Edith Torres, José Carlos Puente, César Mesa, Matthy, José Cobo, Esteban Leyva, Orestico, Daniel Dupuy y muchos otros más.

A mis compañeros de trabajo del Departamento de Biotecnología Solar y a todos los trabajadores del Centro de Investigaciones de Energía Solar de CUBA y toda su comunidad.

En general a todos los que de una forma u otra han colaborado para la realización de este trabajo y al pueblo mexicano que me ha acogido en su seno. A todos, muchas gracias.

## ARTÍCULOS

1. **A.U. Juantorena;** P. J. Sebastian, R. Vázquez Duhalt and R. Tinoco Valencia, "Photobiological hydrogen production employing *Spirulina maxima*", SNMES03-02-111. Journal of New Materials for Electrochemical Systems. 2003. V. 5, p 49. (Artículo completo)
2. **A.U. Juantorena;** P.J. Sebastian, S. Gamboa S., O. Lastres D. and A. Bustos.: "Determination of the hydrogen production by *Spirulina maxima* through the electricity generation in a PEMFC". Journal of New Materials For Electrochemical Systems. (Artículo completo aceptado en abril del 2005).
3. **A.U. Juantorena;** E. Santoyo, P.J. Sebastian, S. Gamboa S., O. Lastres D., D. Sánchez-Escamilla and A. Bustos. : "Hydrogen production employing *Spirulina maxima* 2342: A chemical analysis". International Journal of Hydrogen Energy. 2007 (Artículo completo in Press).
4. **A.U. Juantorena;** R. Tinoco Valencia P. J. Sebastian and R. Vázquez Duhalt: "Hydrogen bioproduction using *Spirulina maxima*". Proceedings XII International Symposium on Solar-Hydrogen-Fuel Cells-7 (International Materials Research Congress 2003). 17-21 de Agosto. 2003. Cancún. México. (Resumen)
5. **A.U. Juantorena;** R. Tinoco Valencia P. J. Sebastian, R. Vázquez Duhalt: "Producción biológica de hidrógeno a partir de *Spirulina maxima* y su uso en una Celda de combustible tipo PEM". Memorias de la XII Semana Nacional de Energía Solar. 6-10 de Octubre 2003. Chihuahua. México. TSIA 13-01. (Artículo completo)
6. **A.U. Juantorena;** R. Tinoco Valencia P. J. Sebastian and R. Vázquez Duhalt "Photobiological hydrogen production-*Spirulina maxima*". Proceedings 2nd ICPB. The Development and Perspectives of Biotechnology Applied to the Oil Industry. Petroleum Biotechnology Research Program. 5-7. Nov. 2003. DF México. ISBN 968-489-018-4. (Resumen in extenso)

7. **A.U. Juantorena;** P. J. Sebastian, A. Bustos G., R. Guevara. J. and R. Vázquez D.: "Photobiological hydrogen production using *Scenedesmus obliquus*". Proceedings XIII International Symposium on Solar-Hydrogen-Fuel Cells-8 (International Materials Research Congress 2004). 22-26 de Agosto 2004. Cancún. México. (Resumen)
8. **A.U. Juantorena;** P.J. Sebastian,., Santoyo, E.; Gamboa S. A., Lastres O. D. Sánchez-Escamilla, D.; A. Bustos. : "Characterzation of the gas generated by *Spirulina maxima* 2342". Proceedings XIV International Symposium on Solar-Hydrogen-Fuel Cells-9 (International Materials Research Congress 2005). 21-25 de Agosto 2005. Cancún. México. (Resumen)
9. **A.U. Juantorena;** P.J. Sebastian, S. Gamboa S., O. Lastres D., A. Bustos.: "Metodología para la determinación de los flujos de hidrógeno generados por microorganismos fotosintéticos". XXIX Semana Nacional de Energía Solar. 3 al 7 de octubre 2005. Tuxtla Gutiérrez. Chiapas. México TSIA 01. (Artículo completo)
10. **A.U. Juantorena;** P.J. Sebastian, S. Gamboa S., O. Lastres D., A. Bustos.: "A methodology to determine the hydrogen flow a photosynthetic bioreactor". Memorias del 2do Congreso Europeo del Hidrógeno. 2do Encuentro Empresarial del Hidrógeno y las Pilas de Combustible. 22-25 Noviembre 2005.Zaragoza. España. (Resumen in extenso)

## **PARTICIPACIÓN EN CONGRESOS**

- **ACEPTACIONES DE TRABAJOS (2003)**

1. II Congreso de Estudiantes. CIE-UNAM. 29-30 de Mayo 2003. Temixco. Morelos. México.
2. 5th International Symposium on New Materials for Electrochemical Systems. July 6-11.2003. Montreal. Canadá.
3. XII International Materials Research Congress. 17-21 de Agosto 2003. Cancún. México.
4. 2nd ICPB. The Development and Perspectives of Biotechnology Applied to the Oil Industry. Petroleum Biotechnology Research Program. 5-7 de Noviembre. 2003. DF México.
5. XII Semana Nacional de Energía Solar. 6-10 de Octubre 2003. Chihuahua. México.

- **PARTICIPACIÓN (2003)**

1. II Congreso de Estudiantes. CIE-UNAM. 29-30 de Mayo 2003. Temixco. Morelos. México.
2. XII International Materials Research Congress. 17-21 de Agosto 2003. Cancún. México.
3. 2nd ICPB. The Development and Perspectives of Biotechnology Applied to the Oil Industry. Petroleum Biotechnology Research Program. 5-7 de Noviembre. 2003. DF México.

- **ACEPTACIONES DE TRABAJOS (2004)**

1. III Congreso de Estudiantes. CIE-UNAM. 20-21 Mayo 2004. Temixco. Morelos. México.
2. XIII International Materials Research Congress. 22-26 de Agosto 2004. Cancún. México.

- **PARTICIPACIÓN (2004)**

1. III Congreso de Estudiantes. CIE-UNAM. 20-21 Mayo 2004. Temixco. Morelos. México.
2. XIII International Materials Research Congress. 22-26 de Agosto 2004. Cancún. México.

- **ACEPTACIONES DE TRABAJOS (2005)**

1. IV Congreso de Estudiantes. CIE-UNAM. 19-20 Mayo 2005. Temixco. Morelos. México.
2. XIV International Materials Research Congress. 21-25 de Agosto 2005. Cancún. México.
3. XXIX Semana Nacional de Energía Solar. 3 al 7 de octubre 2005. Tuxtla Gutiérrez. Chiapas. México.
4. 18 International Congress of Mechanical Engineering. 6-11 Noviembre 2005. Ouo Preto, MG. Brasil.
5. 2do Congreso Europeo del Hidrógeno. 2do Encuentro Empresarial del Hidrógeno y las Pilas de Combustible. 22-25 Noviembre 2005.

- **PARTICIPACIÓN (2005)**

1. IV Congreso de Estudiantes. CIE-UNAM. 19-20 Mayo 2004. Temixco. Morelos. México.
2. 2do Congreso Europeo del Hidrógeno. 2do Encuentro Empresarial del Hidrógeno y las Pilas de Combustible. 22-25 Noviembre 2005. Zaragoza. España.

INDICE	
Abstract	i
Resumen	iii
Publicaciones	v
INTRODUCCIÓN	1
Antecedentes	2
Objetivo General	4
Objetivos Específicos	4
CAPÍTULO I	6
1. FUNDAMENTOS TEÓRICOS	7
1.1 Producción de hidrógeno	7
1.1.2 Principales características del hidrógeno	7
1.1.3 Métodos de obtención de hidrógeno	7
1.2 Métodos biológicos de obtención de hidrógeno	8
1.2.1 Fotosíntesis	9
1.2.2 Producción de hidrógeno por microorganismos fotosintéticos	12
1.2.3 Producción de hidrógeno en dos etapas	18
1.2.4 Hidrogenasas	18
1.3 Cromatografía	20
1.3.1 Cromatografía de gases	21
1.3.2 Detectores en cromatografía de gases	22
1.4 Hidrógeno y celdas de combustible	25
1.4.1 Funcionamiento de las celdas de combustible	26
1.4.2 Eficiencia de las celdas de combustible	28
1.4.3 Curva característica de las celdas de combustible tipo PEM	28
1.4.4 Eficiencia de Faraday	30
1.5 Eficiencia fotosintética	31
CAPÍTULO II	34
2. MATERIALES Y MÉTODOS	35
2.1 Material biológico empleado en los experimentos	35
2.1.1 Características de <i>Scenedesmus</i>	36

2.1.2	Características de <i>Spirulina</i>	38
2.2	Medios de cultivo	40
2.2.1	Medio de cultivo para <i>Scenedesmus obliquus</i>	40
2.2.2	Medio de cultivo para <i>Spirulina maxima</i>	42
2.3	Técnicas analíticas	44
2.3.1	Determinación de la concentración de biomasa	44
2.3.2	Determinación de pH	45
2.3.3	Determinación de pigmentos	46
2.4	Instalaciones experimentales básicas	47
2.4.1	Bioreactores en Planta Piloto	47
2.4.2	Cromatógrafo de gases con Detector de conductividad térmica	48
2.4.3	Módulo Electrolizador-PEMFC	50
CAPÍTULO III		51
3.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	52
3.1	Selección de los microorganismos para la producción de hidrógeno	52
3.1.1	Determinación del hidrógeno usado por una PEMFC ( <i>Scenedesmus obliquus</i> 393)	52
3.1.1.1	Conclusiones	58
3.1.2	Determinación del hidrógeno usado por una PEMFC ( <i>Spirulina maxima</i> 2342)	58
3.1.2.1	Conclusiones	61
3.1.3	Conclusiones de los epígrafes 3.1.1 y 3.1.2	61
3.2	Cinética de crecimiento ( <i>Spirulina maxima</i> 2342)	62
3.2.1	Conclusiones	65
3.3	Detección del hidrógeno generado ( <i>Spirulina maxima</i> 2342)	65
3.3.1	Empleando espectrometría de masas	65
3.3.1.1	Conclusiones	68
3.3.2	Empleando cromatografía de gases con TCD	68
3.3.2.1	Inyectando gas de calibración estándar (entre 0 y 40 mm Hg)	68
3.3.2.1.1	Metodología para la cuantificación del hidrógeno generado	76
3.3.2.1.2	Conclusiones	79
3.3.2.2	Inyectando gas de calibración estándar (entre 0 y 10 mm Hg)	79
3.3.2.2.1	Conclusiones	88
3.4	Generación de energía eléctrica en una PEMFC	88

3.4.1	Determinación del hidrógeno usado por una PEMFC ( <i>Spirulina maxima</i> 2342, células intactas y células permeabilizadas)	88
3.4.1.1	Conclusiones	93
3.4.2	Determinación del flujo de hidrógeno, generado por <i>Spirulina maxima</i> 2342 a partir de una PEMFC	94
3.4.2.1	Metodología para la determinación del flujo de hidrógeno generado por los microorganismos fotosintéticos	96
3.4.2.2	Conclusiones	116
3.5	Determinación de la eficiencia energética de la producción de hidrógeno	117
3.5.1	Conclusiones	118
	CONCLUSIONES GENERALES	119
	RECOMENDACIONES	123
	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	124
	ANEXO	130

## INTRODUCCIÓN

La carencia de altas eficiencias energéticas en los equipos utilizados en la actualidad para los servicios de la sociedad, la preocupación por la disminución de combustibles fósiles y el impacto ecológico de su consumo, hacen a la electricidad y al hidrógeno elecciones lógicas como fuentes sustentables de energía en el siglo XXI. La electricidad puede ser producida eficientemente con celdas de combustible, a partir de hidrógeno y a su vez, el hidrógeno puede ser obtenido a partir de la electricidad por la electrólisis del agua, por la gasificación y pirólisis de biomasa, por vía biológica y otras.

Las ventajas del uso de hidrógeno como combustible sobre otros combustibles sintéticos, desde el punto de vista técnico-económico, es que constituye la alternativa más adecuada como sustituto del petróleo, ya que como constituyente del agua, es el elemento más abundante en la naturaleza. Los combustibles sintéticos tienen al respecto la desventaja de que son manufacturados a partir del carbón, en cuyas reservas existe una tendencia decreciente y tienden a hacerse caros y escasos. El hidrógeno puede ser producido por gasificación de carbono contenido en materiales de carbón, este método produce grandes cantidades de CO<sub>2</sub> como subproducto.

Actualmente aproximadamente el 95 % de todo el hidrógeno, es producido por reformación del gas natural, es el método de producción a gran escala de mayor eficiencia energética (70-90 %) (US Energy Department, 2001). El CO<sub>2</sub> es un subproducto de esta reacción y la emisión de éste a la atmósfera contribuye al efecto invernadero, por lo que se están realizando numerosos trabajos de investigación relacionados con su obtención a partir de fuentes renovables de energía.

La electrólisis del agua genera hidrógeno y oxígeno. La electricidad requerida para la electrólisis del agua puede ser generada a partir de la combustión de combustibles fósiles o a partir de fuentes renovables de energía como la hidroenergía, la energía solar o energía eólica. Además la generación de hidrógeno, puede estar basada en métodos fotobiológicos o fotoquímicos.

Bajo la perspectiva de que el desarrollo de la investigación básica, en los campos de la fotobiología y la fotoquímica, es de gran interés para el futuro, éste sigue siendo un tema central en las discusiones sobre energéticos. Dentro de este tema es de gran trascendencia la obtención de hidrógeno, mediante la fotólisis del agua.

Los métodos fotobiológicos (biofotólisis) están basados en la característica que poseen algunos microorganismos fotosintéticos, de producir hidrógeno como parte de su actividad metabólica, a partir del agua y la energía solar. Para la fotólisis del agua, se requiere un proceso en el cual intervengan varios fotones en la generación de electrones excitables, constituidos por sistemas fotosintéticos de transporte de electrones, que incluyen (pigmentos + aceptor de electrones).

Se investigan muchos aspectos en el tema de biofotólisis del agua como por ejemplo: detectar en qué tipo de microorganismos podría producirse hidrógeno, estudiar las características bajo las cuales puede producirse, facilitar el manejo de los cultivos, diseñar bioreactores capaces de aprovechar eficientemente la energía solar y mejorar las eficiencias obtenidas.

### **Antecedentes**

Durante la crisis energética de los años 70, por el inminente agotamiento de los combustibles fósiles, el hidrógeno fue popularizado como el combustible energético del futuro. En los años 90, una nueva crisis relacionada con los problemas ambientales producto de la emisión de gases con efecto invernadero ( $\text{CO}_2$ ,  $\text{NO}_x$ , etc.), producidos en la combustión de combustibles fósiles y los cambios globales lo hace más interesante para su uso como combustible (Beneman, 1996).

A principios de los años 1800, investigaciones básicas revelaron que las algas y las bacterias eran capaces de producir hidrógeno, pero no fue hasta comienzo de los años 70 que la producción biológica de hidrógeno fue seriamente considerada como una posibilidad práctica (Jackson y Elims, 1996).

Durante esta última década se han realizado significativos avances en el campo de la producción biológica de hidrógeno, tanto en la caracterización bioquímica de los microorganismos que producen hidrógeno (Rocheleau et al., 1999; Borodin et al., 2000; Melis et al., 2000) bajo condiciones adecuadas de anaerobiosis y separación temporal en la producción de oxígeno e hidrógeno, así como en el manejo fisiológico de los cultivos (Wykoff et al., 1998; Ghirardi, 2000; Melis et al., 2000; Polle et al., 2000). Además, se han propuesto diseños de fotobioreactores (reactores en que se desarrollan reacciones biológicas controladas, que son cerrados pero que permiten la interacción del material biológico con la radiación luminosa), que sean más eficientes para la obtención de biomasa con rendimientos que bordean el 10 % en términos de la energía

radiante recibida *versus* la obtenida como hidrógeno (Janssen et al., 2000; Janssen et al., 2000a; Morita et al., 2000, Morita et al., 2000a).

En el CIE-UNAM se están llevando a cabo trabajos de investigación relacionados con el desarrollo de celdas de combustibles encaminados a mejorar su eficiencia, al desarrollar nuevos materiales para sus componentes, a la producción de hidrógeno por diversas vías y el empleo de éste para la obtención de electricidad en celdas de combustible tipo PEM y una de las metas de estas investigaciones y objeto de este trabajo de tesis, es obtenerlo por fuentes renovables de energía, sin ocasionar daños al medio ambiente, como es el caso de la producción a partir de microorganismos fotosintéticos. Se seleccionó el microorganismo *Spirulina maxima*, el cual ha sido poco estudiado con el fin de obtener hidrógeno y no se ha encontrado en la literatura que se haya empleado en la producción de hidrógeno, para generación de electricidad a través de una celda de combustible tipo PEM. La biomasa obtenida de este microorganismo, es una de las más producidas mundialmente, pues tiene muchas propiedades excelentes en su composición, en cuanto a proteínas y vitaminas, sirviendo de suplemento para la nutrición de humanos, animales y en medios de cultivos para el crecimiento de otros microorganismos. Además de aprovecharse eficientemente la radiación solar para la producción de biomasa, de donde pueden obtenerse bioproductos de interés químico-farmacéuticos, puede emplearse en el tratamiento de aguas residuales y para la reutilización de la biomasa. Se conoce la tecnología para su producción desde hace muchos años, es fácil su cultivo, manejo y cosecha, siendo de los cultivos menos vulnerables en cuanto a la contaminación por otros microorganismos.

Por todas estas características, se escogió principalmente este microorganismo fotosintético para nuestros estudios. Además de investigar la disminución de la producción de oxígeno, en el proceso de producción de hidrógeno mediante el uso de una sustancia inhibidora y probar algunos métodos y técnicas que pudieran mejorar la liberación de hidrógeno, aspectos en los cuales se hace necesario profundizar en las investigaciones futuras.

## **HIPÓTESIS**

Si los microorganismos fotosintéticos escogidos, son capaces de producir hidrógeno cuando son sometidos a un proceso de anaerobiosis-oscuridad y luego iluminación, entonces este hidrógeno,

puede ser empleado para la generación de energía eléctrica, en una Celda de Combustible tipo PEM.

Para el desarrollo de la presente investigación, nos planteamos los siguientes objetivos.

### **Objetivo General**

Estudiar la producción de hidrógeno por medio de microorganismos fotosintéticos, para su empleo en una Celda de Combustible tipo PEM.

### **Objetivos Específicos**

1. Seleccionar y caracterizar los microorganismos fotosintéticos para la producción de hidrógeno.
2. Cuantificar el hidrógeno liberado por los microorganismos fotosintéticos escogidos por cromatografía.
3. Determinar el hidrógeno liberado por los microorganismos fotosintéticos, empleando una celda de combustible tipo PEM.
4. Determinar la eficiencia energética de la producción de hidrógeno con los microorganismos fotosintéticos escogidos.

El trabajo de tesis fue dividido en 3 Capítulos. En el Capítulo I se incluyen los principales fundamentos teóricos, involucrados para la realización del trabajo. En el Capítulo II se detallan las principales características de los microorganismos utilizados en el trabajo, así como los medios de cultivo empleados, las técnicas analíticas y las instalaciones básicas experimentales. En el Capítulo III se presentan los resultados para cada uno de los experimentos realizados y sus conclusiones. Primero se realizaron experimentos preliminares para ver la posibilidad de la detección de hidrógeno a diferentes condiciones y en 2 cepas de microorganismos, las cuales se lograron escalar a volúmenes suficientes. Se seleccionó la cepa de *Spirulina maxima* 2342 para continuar los experimentos y llevar a cabo estudios de cinética de crecimiento. A continuación se realizan experimentos para detectar y cuantificar el hidrógeno generado con mayor precisión. La cuantificación de hidrógeno se llevó a cabo mediante a un cromatógrafo de gases con detector de conductividad térmica. Se desarrolló una nueva metodología utilizando vacío además del proceso de anaerobiosis-oscuridad, para tratar de eliminar el oxígeno, que inhibe el proceso de producción

de hidrógeno. Finalmente se realiza la evaluación de una PEMFC, que nos permitió desarrollar una metodología con la cual se determinó a partir de los flujos usados por la celda, los flujos de entrada de hidrógeno, generados por los microorganismos fotosintéticos y se determinó la eficiencia energética de la producción de hidrógeno con *Spirulina maxima* 2342. Finalmente se presentan las conclusiones generales del trabajo, las referencias bibliográficas, las recomendaciones para el trabajo a desarrollar en el futuro y el anexo.

## ABSTRACT

In the present work the production of hydrogen by means of photosynthetic microorganisms is studied under different experimental conditions, in the aim of using it in a Proton Exchange Membrane Fuel Cell (PEMFC), intended for the generation of electricity.

The process was started up from four stocks belonging to the *Spirulina* and *Scenedesmus* generes, provided by the University of Texas in the USA, the propagation process was initiated, scaling the crops to appropriate volumes for the experiments. Samples of stocks were preserved in essay tubes and Petri dishes during the time it took to perform this work.

An assembly of three reactors of up to 20 L volume each was prepared in the Pilot Plant of the Institute of Biotechnology of UNAM, where the crops were kept under good illumination and aseptic conditions.

Two out of the four beformentioned stocks (*Spirulina maxima* 2342 y *Scenedesmus obliquus* 393) were chosen in order to perform the first experiments, allowing for sufficients amounts of volume for the reply, so as to determine the possibility of detecting the production of hydrogen associated with the increase in the biomass of the photosynthetic microorganisms.

Finally, the stocks *Spirulina maxima* 2342 was selected due to its better behaviour regarding reproducibility ease of handling, crop, lesser vulnerability to contamination with other microorganisms and better results in the generation of electrical energy in a PEMFC, as well as the possibility of doing future work aiming at demonstrate their capacity for hydrogen generation.

The hydrogen produced by *Spirulina maxima* 2342 was detected and quantified by means of gas chromatography, using a TCD detector, by means of standard gas calibration curves. A methodology involving the use of vacuum during the analysis of the samples was proposed in the aim of decreasing the air content in them after the anaerobiosis-darkness process, and not affecting either the structure or the physiology of the microorganisms cells. Besides, a bioreactor that can be coupled to the gas chromatograph was employed, together with a thermal conductivity detector.

It was possible to determine the hydrogen flux liberated by the photosynthetic microorganism *Spirulina maxima* 2342 by means of an electric current generated in a fuel cell of the PEM type, thereby proposing here a methodology for such determination, which could be applied to other types of microorganisms. The best hydrogen fluxes ( $6.62 \times 10^{-9}$  kg/h) were obtained upon the addition of 2 g of sodium ditionite as a reducing agent after the anaerobiosis-darkness process, and with the reactor exposed to an incident luminous intensity of  $150 \mu\text{E}/\text{m}^2 \cdot \text{s}$ .

The efficiency of hydrogen production by means of *Spirulina maxima* 2342 was determined; a maximum value 0.02% was obtained for an incident luminous intensity of  $150 \mu\text{E}/\text{m}^2 \cdot \text{s}$ , upon addition of 2 g of sodium ditionite, and after exposing the crop to the anaerobiosis-darkness. This efficiency can be compared with that obtained by other researchers working on cyanobacteria and heterotrophic bacteria. The lower values could be increased upon improvements of both the methodology and the experimental conditions under which the photosynthetic hydrogen is produced.

## RESUMEN

En el presente trabajo se estudia la producción de hidrógeno por microorganismos fotosintéticos bajo diferentes condiciones experimentales, para emplearlo en una Celda de Combustible de Membrana Intercambiadora de Protones (PEMFC) para la generación de electricidad.

A partir de 4 cepas de los géneros *Spirulina* y *Scenedesmus* provenientes de la colección de la Universidad de Texas en Estados Unidos, se comenzó el proceso de propagación de las mismas, escalando el cultivo a volúmenes adecuados para los experimentos. Se conservaron muestras de las cepas en tubos de ensayo y placas Petri, durante todo el tiempo que se realizó este trabajo.

Se preparó una instalación con 3 bioreactores de hasta 20 litros de capacidad cada uno, en la Planta Piloto del Instituto de Biotecnología de la UNAM, en donde se mantuvieron los cultivos en buenas condiciones asépticas y de iluminación.

Se escogieron dos de las cuatro cepas mencionadas anteriormente (*Spirulina maxima* 2342 y *Scenedesmus obliquus* 393), para realizar los primeros experimentos con volúmenes suficientes para las réplicas, a fin de determinar la posibilidad de detectar el hidrógeno producido, asociado al incremento de la biomasa de los microorganismos fotosintéticos.

Finalmente se seleccionó la cepa de *Spirulina maxima* 2342 por su mejor comportamiento en cuanto a reproducibilidad, facilidades en el manejo, cosecha, menos vulnerabilidad a la contaminación con otros microorganismos y mejores resultados en la generación de energía eléctrica en una PEMFC, así como por las posibilidades de realización de otros trabajos futuros para demostrar su capacidad de generar hidrógeno.

Se detectó el hidrógeno producido por *Spirulina maxima* y se cuantificó por cromatografía de gases usando un detector TCD, mediante el uso de curvas de calibración con gas estándar. Se propuso y utilizó una metodología que involucra el uso del vacío en el análisis de las muestras, a fin de disminuir el contenido de aire en ellas luego del proceso de anaerobiosis-oscuridad y no afectando estructural y fisiológicamente las células de los microorganismos. Se empleó además

un bioreactor que puede ser acoplado al Cromatógrafo de gases con detector de conductividad térmica.

Se logró determinar el flujo de hidrógeno liberado por el microorganismo fotosintético *Spirulina maxima* 2342, mediante la generación de una corriente eléctrica en una celda de combustible tipo PEM, proponiendo aquí una metodología para esta determinación, la cual podría ser aplicada a otros tipos de microorganismos. Se obtuvieron los mayores flujos de hidrógeno ( $6.62 \times 10^{-9}$  kg/h), cuando se añaden 2 g de ditionita de sodio como agente reductor luego del proceso de anaerobiosis-oscuridad y estando el bioreactor a una intensidad luminosa incidente de  $150 \mu\text{E}/\text{m}^2 \cdot \text{s}$ .

Se determinó la eficiencia en la producción de hidrógeno generado por *Spirulina maxima* 2342, siendo la mayor eficiencia de 0.02 % cuando la intensidad luminosa incidente es de  $150 \mu\text{E}/\text{m}^2 \cdot \text{s}$ , al añadir 2 g de ditionita de sodio luego del proceso de anaerobiosis-oscuridad al cultivo y esta eficiencia puede ser comparada con la obtenida por otros investigadores en otras cianobacterias y bacterias heterotróficas. Los valores bajos obtenidos podrían ser aumentados mejorando el método y las condiciones experimentales bajo las cuales se produce el hidrógeno fotosintético.

# CAPÍTULO I

## **1. FUNDAMENTOS TEÓRICOS**

### **1.1 Producción de hidrógeno**

El hidrógeno es el elemento más abundante en el universo, prácticamente se encuentra en combinación con todos los elementos como el agua (H<sub>2</sub>O), en combustibles fósiles, así como gas natural (CH<sub>2</sub>), metano (CH<sub>4</sub>) y en todas las moléculas orgánicas.

La combustión del gas hidrógeno ofrece grandes ventajas, entre las que destaca que su oxidación directa aporta como producto final el agua (en lugar de gases del carbono), que es transportable y que se puede producir a partir de la radiación solar y fuentes de energía renovables (Gosselink, 2002).

El hidrógeno tiene muchas aplicaciones: industriales, comerciales, en la medicina en procesos de monitoreo o requerimiento de sensores, también puede ser empleado para la producción de electricidad a partir de celdas de combustible, lo cual constituye una tecnología limpia (<http://www.eren.doe.gov/consumerinfo/refbriefs/a109.html>).

#### **1.1.2 Principales características del hidrógeno**

El gas hidrógeno será la energía transportable del futuro cercano (Jorquera et al., 2001), por sus características de:

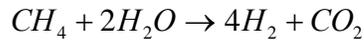
- 1) Renovabilidad
- 2) Limpieza de su combustión, ya que no produce gases de efecto invernadero, generando agua como desecho
- 3) Enorme relación energía a peso (39.4 kW-h por kg de H<sub>2</sub>)
- 4) Simplicidad de su conversión a energía eléctrica según demanda instantánea mediante celdas de combustible.

A partir de estas características se le define con diversos adjetivos, según sea el ámbito de la discusión: energía limpia o también renovable y/o sustentable.

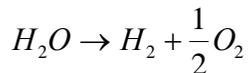
#### **1.1.3 Métodos de obtención de hidrógeno**

Algunos de los métodos más usados a nivel industrial para la obtención de hidrógeno son los siguientes:

- Reformación del gas natural: aproximadamente el 90 % de todo el hidrógeno es producido en el mundo por este método de producción a gran escala (Das y Veziroglu, 2001), es el de mayor eficiencia energética (70-90%) (Czernik et al., 2000). El dióxido de carbono es un subproducto de esta reacción (U.S Energy Department, 1995).



- Gasificación y pirólisis de biomasa: la producción de hidrógeno puede resultar de la gasificación a alta temperatura y de la pirólisis de la biomasa a baja temperatura. Este método produce también grandes cantidades de dióxido de carbono como subproducto.
- Electrólisis del agua: en un electrolizador, a partir de agua a la que se le aplica un voltaje externo se obtiene hidrógeno y oxígeno. La electricidad requerida de la electrólisis del agua puede ser generada a partir de la combustión de combustibles fósiles o a partir de fuentes renovables de energía como la hidroenergía, energía solar o energía eólica.



- Foelectrólisis: en un proceso de un paso, la luz del sol es absorbida en un semiconductor separando el agua en hidrógeno y oxígeno.
- Métodos biológicos: algunos microorganismos producen hidrógeno en su actividad metabólica y otros además utilizan el agua y la energía solar para esta producción.

## 1.2 Métodos biológicos de obtención de hidrógeno

Actualmente existe la tendencia mundial hacia la obtención de hidrógeno por vía biológica. Los primeros resultados demostraron los problemas y posibilidades de la biotecnología para el desarrollo de la industria del hidrógeno como una fuente renovable de energía, permitiendo considerarla seriamente como una posibilidad práctica (Beneman, 1996).

La producción de hidrógeno por métodos biológicos se lleva a cabo mediante 2 procesos:

1) La obtención de hidrógeno a partir de compuestos orgánicos (Das y Veziroglu, 2001):

\*Usando las bacterias fotosintéticas: algunas bacterias fotosintéticas no dependientes del azufre que realizan fotosíntesis anoxigénica, utilizan ácidos orgánicos como el succínico, láctico o

butírico, para producir hidrógeno. La reacción es catalizada por nitrogenasa. La mayor eficiencia conocida la tiene el género *Rhodobacter* (6-8 %).

\*Combinando bacterias fotosintéticas y anaerobias: las bacterias anaerobias por sí solas metabolizan azúcares desprendiendo hidrógeno y producen ácidos orgánicos, que sin embargo no son capaces de seguir descomponiendo. Las bacterias fotosintéticas sí pueden seguir descomponiendo los ácidos orgánicos producidos y mejorar la producción de hidrógeno.

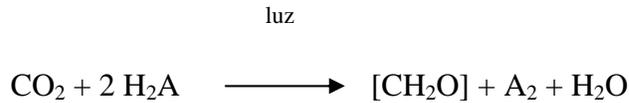
2) La biofotólisis del agua (*fotodisociación* biológica del agua): bajo ciertas condiciones algunas cianobacterias y microalgas, utilizan la energía bioquímica de la fotosíntesis, para producir hidrógeno en lugar de reducir el dióxido de carbono.

La producción biofotolítica, dista mucho aún de explotarse comercialmente, pues requiere de un significativo avance científico (cómo ocurre) y tecnológico (cómo intervenir la maquinaria bioquímica).

### **1.2.1 Fotosíntesis**

La fotosíntesis constituye un ciclo metabólico fundamental para toda la vida en este planeta, ya que la mayoría de las formas de vida, cualquiera fuese su fuente inmediata de energía, dependen en última instancia de la energía solar. La transformación de la energía solar en energía química que ocurre en los organismos procariontes fotosintéticos y en los cloroplastos de las plantas, resulta crucial para todo el mundo biológico en este planeta. La energía química acumulada en los compuestos orgánicos que sirven de alimento a los organismos quimiótrofos, es el producto de la transformación de la energía solar en energía química llevada a cabo por los organismos fotosintéticos. No solo la energía derivada de la fotosíntesis es importante, también los materiales sintetizados representan la mayor fuente para las estructuras celulares. Usando los productos de la fotosíntesis y pocos compuestos inorgánicos obtenidos del ambiente se construyen los organismos vivos y sus estructuras complicadas y multifacéticas (Vázquez, 2002).

El principal objetivo de la fotosíntesis es: reducir el CO<sub>2</sub> al nivel de oxidación en el que se encuentran los azúcares, mientras que un donador de hidrógeno es oxidado. En estos términos se puede formular la siguiente ecuación general de la fotosíntesis.

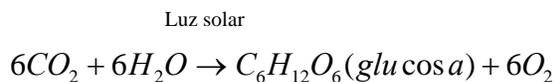


donde:

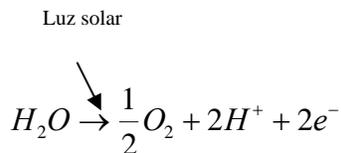
- $\text{H}_2\text{A}$  es el donador de electrones (hidrógenos).
- A es la forma oxidada de  $\text{H}_2\text{O}$ .
- $[\text{CH}_2\text{O}]$  es el material celular en el cual el carbono se encuentra en el nivel de oxidación de un carbohidrato.

De la ecuación anterior se puede deducir, que no siempre el agua es el donador de electrones. El agua es el donador de electrones en el caso de las plantas verdes y las algas eucariotas, pero no así en el caso de las bacterias fotosintéticas, las cuales no tienen la maquinaria fotoquímica y metabólica necesaria para extraer los electrones del agua.

En la literatura relacionada con la bioenergética (Beneman, 1996; Lee et al., 1999; Ghirardi et al., 2000a; Wangensteen, 2001) generalmente definen la fotosíntesis como la producción de glucosa a partir de dióxido de carbono atmosférico ( $\text{CO}_2$ ) y agua, proceso que ocurre en presencia de luz solar, según la reacción global:



Sin embargo, esto no es más que una simplificación de un proceso muy complejo, en el cuál una etapa clave es la disociación de una molécula de agua por la luz solar, liberándose oxígeno gaseoso, iones hidrógeno y electrones. Estos últimos servirán para reducir el  $\text{CO}_2$  hasta glucosa en las etapas siguientes de la fotosíntesis:



Puesto que la molécula de agua es muy estable, esta reacción requiere de una elevada cantidad de energía, que es suministrada por la luz solar y necesita de la presencia de un catalizador adecuado

para que tenga lugar. El catalizador que emplean las plantas se llama Fotosistema II, un colector solar en miniatura de estructura muy compleja y tremendamente eficaz (Wangensteen, 2001). El Fotosistema II contiene varias moléculas de proteína, que son el armazón del complejo, unas cuantas moléculas de clorofila, que son las encargadas de recolectar la energía solar y un centro de reacción, que contiene cuatro átomos de manganeso y es el encargado de romper la molécula de agua. Esta máquina molecular se localiza en el interior de las membranas internas de los cloroplastos, orgánulos presentes en las células vegetales.

Los electrones liberados por el proceso de ruptura del agua son transferidos a una cadena de moléculas transportadoras de electrones, a partir de la cuál la planta obtiene el poder reductor que necesita para fabricar glucosa. Mientras, los iones de hidrógeno se acumulan en el interior de la membrana del cloroplasto, lo que permite crear una diferencia de concentración y de potencial eléctrico. A partir de esa diferencia la planta puede producir energía en forma de la unidad básica de energía de los seres vivos: el ATP (adenosín trifosfato, consiste en una base de adenina unida a un azúcar, la ribosa y a tres fosfatos). En resumen, el Fotosistema II es una máquina que transforma la energía solar, en energía electroquímica aprovechable, de una forma mucho más eficaz que cualquier celda solar creada por ingenieros humanos (Figura 1.1).

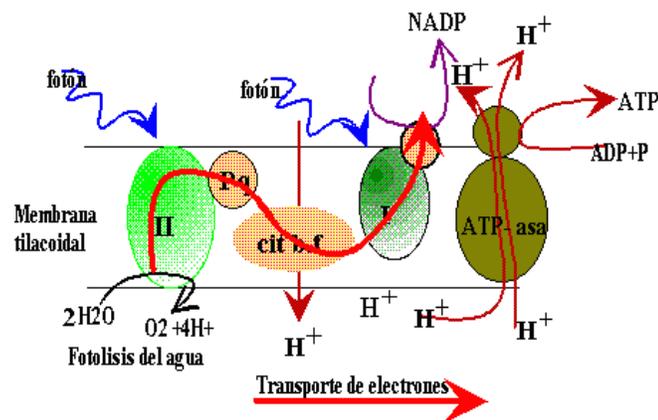


Figura 1.1 Proceso de fotosíntesis

El "esquema Z" de la fotosíntesis muestra el camino por el cual se transfieren los electrones desde el H<sub>2</sub>O hasta el NADP<sup>+</sup> (Figura 1.2). La posición en la escala vertical de energía de cada transportador de electrones representa sus potenciales de reducción relativos. Para elevar la

energía de los electrones procedentes del H<sub>2</sub>O al nivel de energía requerido para reducir el NADP<sup>+</sup> cada electrón debe ser promocionado dos veces a un nivel superior de energía por los fotones absorbidos en cada uno de los Fotosistemas (I y II). Se requiere un fotón por electrón en cada Fotosistema. Tras la excitación, los electrones de "alta energía" fluyen a través de unas cadenas de transferencia de electrones. La segunda de estas cadenas está constituida por la Ferredoxina, que recibe un electrón directamente del Fotosistema I y la Ferredoxina-NADP<sup>+</sup> reductasa, que finalmente transfiere los electrones desde la Ferredoxina al NADP<sup>+</sup>.

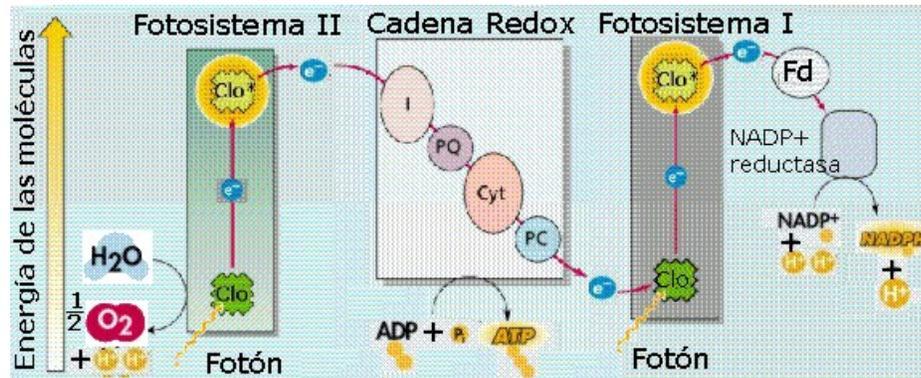


Figura 1.2 "Esquema Z" de la fotosíntesis

La aparición de la fotosíntesis oxigénica, basada en la ruptura del agua usando luz solar, marcó uno de los hitos más importantes en la historia de la vida, puesto que permitió el desarrollo de organismos mucho más activos, a la vez que produjo la mayor catástrofe ecológica de la historia de la Tierra: la acumulación del oxígeno que es el material de desecho de la fotosíntesis en la atmósfera.

### 1.2.2 Producción de hidrógeno por microorganismos fotosintéticos

La producción biológica de hidrógeno por microorganismos ha sido un campo activo de investigación básica y aplicada por más de dos décadas. Sin embargo un desarrollo más acelerado de esos procesos requiere de la realización de investigaciones a largo plazo (Lindblad et al., 2000).

Por ejemplo el proceso propuesto por Beneman, 1998, usa microalgas, algas verdes y cianobacterias para fijar el CO<sub>2</sub> en los carbohidratos, los cuales son usados por las algas para

generar gas H<sub>2</sub>, primero en la oscuridad por fermentaciones y luego en la luz a través de reacciones acopladas por fotosíntesis.

El análisis publicado por la Agencia Internacional de Energía (IEA), sugiere que la meta de alcanzar un 10% de eficiencia de conversión, aunque ambiciosa es potencialmente factible a largo plazo. El objetivo tentativo propuesto ha sido alcanzar una conversión del 3% de gas hidrógeno. (Beneman, 1998; Akkerman et al., 2002).

La producción de hidrógeno por microalgas fotoautótrofas (se producen a sí mismas a partir de luz y CO<sub>2</sub>) se basa en la utilización de la energía solar para la fotodisociación del agua, (involucrando el fenómeno de la fotosíntesis) y la consecuente transferencia de electrones en una cadena transportadora de ellos ubicada en estructuras como los tilacoides, tanto para cianobacterias como para microalgas (Figura 1.3). En la membrana de estas estructuras se encuentra la maquinaria fotosintética que consiste de una serie de proteínas y compuestos que transportan los electrones desde el agua hacia moléculas como NADH y el H<sub>2</sub>.

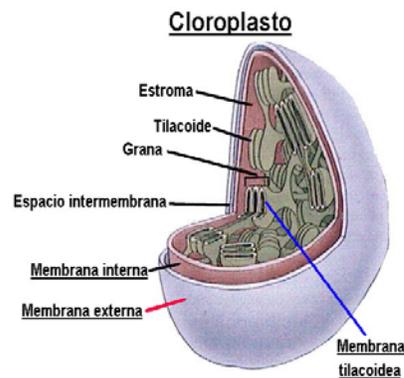


Figura 1.3 Estructura del cloroplasto

Las proteínas (enzimas) que se encuentran en el proceso fotosintético bajo condiciones aeróbicas son:

\*Fotosistema II (PSII)

\*Complejo b6f

\*Fotosistema I (PSI)

\*Ferredoxina (Fd)

\*NADH reductasa

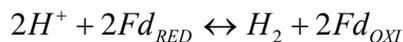
\*Transportadores asociados como: Plastoquinona (PQ), Plastocianina (PC) y Pigmentos (clorofilas a y b)

En condiciones aeróbicas (con oxígeno disuelto en el medio de cultivo), parte del flujo de electrones es utilizado para generar "poder reductor" (expresado en la molécula NADH) que es utilizado por el microorganismo para fijar CO<sub>2</sub>, con la consecuente producción de carbohidratos y biomasa. Simultáneamente, este transporte de electrones permite el flujo, a través de la membrana tilacoidal, de los protones que posteriormente son utilizados por una ATP-asa, generando ATP que será utilizado para posteriores transfosforilaciones en el ciclo reductor del carbono.

Bajo condiciones anaerobias (sin oxígeno disuelto) se expresa la hidrogenasa (enzima que produce H<sub>2</sub>) que se une a la ferredoxina, para catalizar la conversión de dos protones (2H<sup>+</sup>) a hidrógeno gaseoso (H<sub>2</sub>).

La transferencia de electrones bajo las condiciones descritas anteriormente, promueve la producción de hidrógeno mediante la enzima hidrogenasa, enzima reversible, la cual bajo ciertas condiciones anaerobias es capaz de reducir los protones a hidrógeno, oxidando ferredoxina en su estado reducido a su estado oxidado (Melis y Zhang, 1999) según:

Hidrogenasa



La producción de hidrógeno gaseoso a partir del agua, requiere manipular la secuencia de reacciones bioquímicas, interactuando con la célula completa pero sin modificarla en principio, en alguna modalidad que obligue la aparición de gas hidrógeno que, de ser dejado al sistema natural, no sería producido en absoluto hacia el medio exterior a la célula.

Se han estudiado hasta el momento más de 33 especies de algas unicelulares, siendo examinadas para observar si son productoras de hidrógeno, detectándose positivamente por ejemplo, en las

especies de los géneros *Scenedesmus*, *Chlamydomonas*, *Chorella* y *Aukistrodesmus*. Algunos microorganismos fotosintéticos productores de hidrógeno son: *Anabaena cylindrica*, *Spirulina platensis*, *Spirulina maxima*, *Scenedesmus obliquus*, *Chlamydomonas reinhardtii*, *Chlorococcum littorale*, *Chlorella fusca*, *Aukistrodesmus sp.* (Healey, 1970).

De estos microorganismos han sido estudiadas las condiciones en las que son capaces de producir hidrógeno bajo la acción de la hidrogenasa, enzima que cataliza la oxidación molecular del hidrógeno (reversible) (Wunchiers, 1999, 2001a, 2001b; Debrata y Nejat, 2001). Las microalgas poseen una maquinaria de transporte de electrones genética, enzimática y metabólica para la fotoproducción de gas hidrógeno, esta vía puede contribuir a una economía futura del hidrógeno. Las ventajas de éste como energía renovable refleja importantes implicaciones económicas, proveniente de avances científicos y tecnológicos. Esta producción tendrá un positivo impacto en el medioambiente, aliviando la contaminación atmosférica y mitigando el efecto del calentamiento global de la atmósfera (Ghirardi, 2000a).

Gaffron y Rubin (1942) reportaron que una cepa del alga verde *Scenedesmus* era capaz de producir hidrógeno molecular bajo condiciones de iluminación, después de ser guardado bajo condiciones anaerobias y oscuridad. Los estudios básicos determinaron que la energía reductora (donador de electrones) no siempre viene del agua, sino que también se puede originar a veces de compuestos orgánicos intracelulares, como el almidón. La contribución de la descomposición de compuestos orgánicos a la producción de hidrógeno, es dependiente de la especie algal referida y de las condiciones de cultivo. Es importante señalar en este caso que aunque el índice de la producción fermentativa del hidrógeno por unidad de peso seco de las células, es menor que el obtenido en la producción de hidrógeno dependiente de la luz, la evolución de hidrógeno puede ser generalmente sostenida con la ausencia de oxígeno.

Con base a experimentos realizados de la producción fermentativa del hidrógeno bajo condiciones de oscuridad, Miura et al., 1986, propusieron la producción de hidrógeno en un ciclo de iluminación/oscuridad. Según sus estudios, el CO<sub>2</sub> es reducido en almidón por fotosíntesis en el día bajo condiciones de iluminación. El almidón formado así, se descompone en gas hidrógeno y en ácidos orgánicos y/o alcoholes, bajo condiciones anaerobias durante la noche (bajo condiciones de oscuridad). Los méritos tecnológicos de este estudio, incluyen el hecho de que la inactivación de la hidrogenasa por el oxígeno se puede prevenir con el mantenimiento de los

microorganismos fotosintéticos bajo condiciones anaerobias durante la noche, que la separación temporal de la producción del hidrógeno y el oxígeno no requiere de la separación del gas y de la descomposición simultánea del agua. Además que los ácidos orgánicos y alcoholes pueden ser convertidos en gas hidrógeno por bacterias fotosintéticas bajo condiciones de iluminación.

Una planta experimental usando un sistema combinado de algas verdes y bacterias fotosintéticas funciona dentro de una central eléctrica de Kansas Co. Ltd. en Nankoh, Osaka, Japón. Miyamoto et al., 1979, propusieron la digestión química de la biomasa algal, como medio de producir sustratos para las bacterias fotosintéticas, mejorando así la producción de almidón.

Greenbaum et al., 1995 establecieron que pueden obtenerse eficiencias muy altas de conversión al hidrógeno (entre 10 y 20%) basadas en la radiación fotosintéticamente activa (PAR). También estudiaron en una mutante de *Chlamydomonas* un "circuito corto" de la fotosíntesis, en el que la producción de hidrógeno y la fijación del CO<sub>2</sub> ocurren en un solo fotosistema (en el fotosistema II solamente).

Asada y Kawamura, 1986 determinaron que las cianobacterias también producen autofermentativamente gas hidrógeno, bajo condiciones de oscuridad y anaerobias. Se demostró que las especies de *Spirulina*, tienen actividades altas entre las cianobacterias estudiadas y que la naturaleza del portador del electrón para la hidrogenasa en las cianobacterias sigue siendo confusa. Las hidrogenasas han sido purificadas y caracterizadas parcialmente en algunas cianobacterias y microalgas (Shulz, 1996). Además estos autores divulgaron la producción aerobia del hidrógeno por *Anabaena sp.* después de ser cultivada por 12 días, en este tiempo se acumuló aproximadamente el 10 % de hidrógeno y el 70 % de oxígeno dentro de un recipiente.

Benemann y Weare, 1974 demostraron que en la cianobacteria *Anabaena cylindrica* el gas hidrógeno y el oxígeno, fueron producidos simultáneamente en una atmósfera de argón por varias horas.

Miyamoto et al., 1979 realizaron experimentos al aire libre en la producción del hidrógeno por *Anabaena cylindrica*. Un cultivo deficiente de nitrógeno fue alimentado continuamente por gas argón, mientras que el contenido del hidrógeno del gas efluente fue medido. La eficiencia media de la conversión durante un mes (energía de la combustión del gas hidrógeno producida por energía solar de la cianobacteria/área del fotobioreactor) era de aproximadamente 0.2 %.

Mitsui et al., 1986 propusieron extensivamente la capacidad de las cianobacterias para la producción de hidrógeno y demostraron que la cianobacteria *Oscillatoria sp.* Miami BG7, era una de las más eficientes para la producción de hidrógeno en cultivos al aire libre, en donde también lograron aislar *Synechococcus sp.* Miami BG043511, obteniendo una eficiencia de conversión de 3.5 % basadas en la radiación fotosintéticamente activa, por sus siglas en inglés se conoce como PAR (Photosynthetic Active Radiation), usando una fuente de luz artificial (Kumazawa y Mitsui, 1994).

A continuación se presenta la producción de hidrógeno obtenida en los algunos microorganismos fotosintéticos por diferentes investigadores:

- Anabaena cylindrica*- 3.8  $\mu\text{l/h. mg. peso seco}$  (Miyamoto, K. y colaboradores, 1979)
- Oscillatoria sp.* Miami BG7-5.8  $\mu\text{l/h. mg. peso seco}$  (Kumazawa S. y Mitsui, A.,1981)
- Anabaena variabilis*-9.2  $\mu\text{l/h. mg. peso seco}$  (Markov. S. y colaboradores,1996)
- Chlamydomonas reinhardtii*-14.2  $\mu\text{l/h. mg. peso seco}$  (Ghirardi, M. y colaboradores. 2000)
- Gloeocapsa alpicola* CALU 743 -25  $\mu\text{l/h. mg. peso seco}$  (Troshina, O. y colaboradores, 2002)
- Rhodobacter capsulatus*- 5.14  $\text{mmol H}_2/\text{g de glucosa}$  (Teplyakov, V. y colaboradores, 2002)
- *Rhodobacter sphaeroides RV*- 0.131  $\text{mlH}_2/\text{ml cultivo.h}$  (El-Shishtawy, y colaboradores, 1998)
- *Rhodobacter sphaeroides RV*- 0.054  $\text{mlH}_2/\text{ml cultivo.h}$  (Miyake, M. y colaboradores,1998)
- *Rhodobacter sphaeroides S*- 0.019  $\text{mlH}_2/\text{ml cultivo.h}$  (Sasaki, K. 1998)
- Rhodobacter sphaeroides OU.00* - 0.006  $\text{mlH}_2/\text{ml cultivo.h}$  (Turkarlan.S y colaboradores,1998)
- *Rhodospirillum rubrum*- 0.065  $\text{mlH}_2/\text{ml cultivo.h}$  (Zurrer, H. y colaboradores, 1981)
- *Rhodobacter capsulatus ST410*- 2.5  $\text{mlH}_2/\text{ml cultivo.h}$  (Ooshima, H. y colaboradores,1998)
- Chlamydomonas reinhardtii*-22  $\text{mmol H}_2/\text{mol Chl.s}$  (Melis, A. y Zhang, L.,1999)

-*Scenedesmus obliquus* - 6.7  $\mu\text{mol H}_2/\text{h}$  (Wunschiers, R. y Lindblad, P., 2002)

-*Spirulina* -1  $\mu\text{mol H}_2/12\text{h}/\text{mg}$  de peso seco (Rocheleau, R. y colaboradores,1999)

### **1.2.3 Producción de hidrógeno en dos etapas**

Se han popularizado dos alternativas tecnológicas, a un nivel solamente de laboratorio y de algunos ensayos piloto.

En la primera, la producción de oxígeno fotosintético con la consecuente acumulación de carbohidratos está separada de la producción de gas hidrógeno, tanto temporal como espacialmente. Este es un proceso de dos estados: el  $\text{CO}_2$  es primero fijado a sustratos ricos en  $\text{H}_2$ -endógeno durante fotosíntesis oxigénica normal (estado 1), seguido por generación de hidrógeno molecular cuando las microalgas son incubadas en condiciones anaeróbicas (estado 2). Este enfoque requiere por ende de un sistema de cultivo y de otro sistema aparte para la generación de hidrógeno.

La segunda alternativa está relacionada con la producción de oxígeno fotosintético y gas hidrógeno simultáneamente. En este caso los electrones son liberados de la oxidación del agua y son conducidos a la hidrogenasa sin estar mediado la fijación de  $\text{CO}_2$  ni el almacenamiento de energía como metabolitos celulares. Este mecanismo en el proceso de generación de  $\text{H}_2$  ha resultado superior al proceso de dos estados, ya que se han obtenido eficiencias de conversión de energía luminosa a gas hidrógeno de un 5 a un 10% (del orden de magnitud de la eficiencia de celdas fotovoltaicas. Sin embargo, este proceso "de un estado" tiene limitaciones principalmente por la inhibición de la hidrogenasa por el oxígeno que es producido por la disociación del agua por el Fotosistema II.

### **1.2.4 Hidrogenasas**

Las hidrogenasas son enzimas que catalizan de modo reversible la oxidación de hidrógeno (Freemantle, 2002). Como son catalizadores eficientes de esta sencilla reacción química, hay un gran interés en las relaciones entre su estructura y función y en sus aplicaciones en el campo de la bioenergética. Se pueden distinguir dos tipos de hidrogenasas presentes en cianobacterias y microalgas, en función de su contenido en metales: el primer grupo incluye a aquellas que contienen Fe en su estructura, el segundo grupo incluye a las que además tienen un átomo de Ni.



Se han resuelto las estructuras cristalográficas obtenidas por difracción de rayos X de varias hidrogenasas de Ni-Fe y de Fe. El análisis cristalográfico de las hidrogenasas de Ni-Fe indicó que el centro activo de la enzima, el cual es el lugar donde tiene lugar la ruptura heterolítica del hidrógeno molecular, está formado por un complejo bimetalico de Ni-Fe con dos cisteínas de la estructura proteica que hacen de ligandos puente. Otras dos cisteínas están coordinadas al Ni y al átomo de Fe se coordinan tres ligandos diatómicos (dos CN<sup>-</sup> y un CO). El centro activo de las hidrogenasas de Fe tiene bastante similitud con las de Ni-Fe. También está constituido por un complejo bimetalico, pero en este caso se trata de dos átomos de Fe, con átomos de S actuando de ligandos puente y con varios grupos CO y CN<sup>-</sup> coordinados a los átomos de Fe (Figura 1.4). Estos ligandos diatómicos pueden ser detectados por espectroscopía infrarroja.

Se han estudiado los cambios observados en los espectros de infrarrojo, al cambiar el potencial redox de la muestra en una celdilla electroquímica, identificándose los diferentes estados redox del centro activo y los equilibrios que les correlacionan. También se han estudiado por espectroscopía infrarroja, la unión de inhibidores al centro activo. El análisis cinético de la actividad catalítica de la hidrogenasa se lleva a cabo mediante diferentes técnicas. La oxidación/producción de H<sub>2</sub> se puede medir por espectrofotometría utilizando compuestos redox con propiedades ópticas como aceptores/donadores de electrones. Otro método es el acoplamiento de la actividad catalítica de la enzima a un electrodo (De Lacey et al., 1997; De Lacey et al., 2000a ; De Lacey et al., 2000b ; De Lacey et al., 2001; Nicolet et al., 2001; Stadler et al., 2002).

Las hidrogenasas también catalizan el intercambio isotópico del H<sub>2</sub>. Otra propiedad catalítica de las hidrogenasas es la conversión de para-H<sub>2</sub> en orto-H<sub>2</sub>, que puede medirse por cromatografía de gases, acoplada a un detector térmico. Además, se han realizado cálculos mecanocuánticos, para obtener modelos de la estructura del centro activo, en sus diferentes estados redox del ciclo catalítico y de los procesos de activación/inactivación de las hidrogenasas.

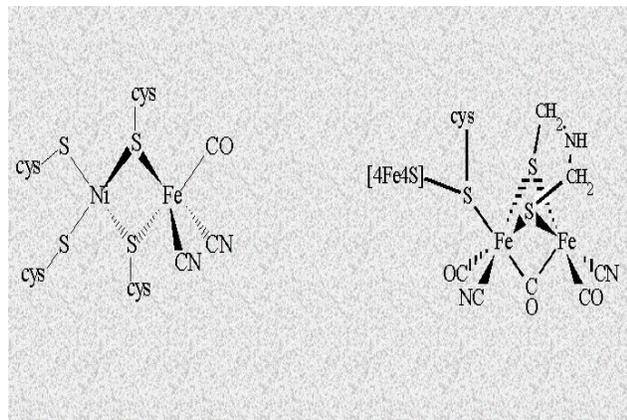


Figura 1.4 Centros activos de las hidrogenasas de Ni-Fe y de Fe

### 1.3 Cromatografía

La cromatografía es un método por el cual las sustancias se separan mediante un proceso de migración diferencial, en un sistema que consta de dos fases. Una fase móvil y otra que permanece fija (fase estacionaria) (Skoog et al., 2001).

<http://infoleg.mecon.gov.ar/txtnorma/dto202-2003-17.htm>

La fase estacionaria puede ser un sólido o un líquido dispuesto sobre un sólido que actúa como soporte, de gran área superficial. La fase móvil es un fluido (puede ser gas, líquido o fluido supercrítico) que se usa como portador de la mezcla y fluye continuamente en una dirección dada.

En estos sistemas los componentes de una mezcla pueden presentar diferentes moviidades debido a diferencias en la capacidad de adsorción, partición, solubilidad, presión de vapor, tamaño molecular o carga. Los mecanismos de separación son: adsorción, disolución y partición; filtración y permeación o bien tamices moleculares e intercambio iónico.

En la cromatografía ocurren dos fenómenos muy importantes y que son prácticamente los rectores del proceso de separación: la *adsorción* y la *absorción*.

La *adsorción* es la retención (física o química) de una especie química en los sitios activos de la superficie de un sólido, quedando delimitado el fenómeno a la superficie que separa las fases o

superficie interfacial. La adsorción depende de la naturaleza de la sustancia adsorbida, de la temperatura, de la naturaleza y estado de subdivisión del adsorbente y de la concentración.

La *absorción* es la retención de una especie química por parte de una masa y depende de la tendencia que tiene ésta a formar mezcla o reaccionar químicamente con la misma.

### 1.3.1 Cromatografía de gases

La cromatografía de gases se emplea para la separación de sustancias o mezcla de sustancias volátiles. Es un procedimiento de análisis para separar, identificar y cuantificar, los diferentes componentes de una mezcla. Las mezclas a analizar pueden estar inicialmente en estado gaseoso, líquido o sólido, pero en el momento del análisis la mezcla debe estar vaporizada. (Skoog et al., 2001; <http://infoleg.mecon.gov.ar/txtnorma/dto202-2003-17.htm>)

Pueden emplearse los siguientes sistemas:

Cromatografía gas-líquido: la fase estacionaria puede estar contenida en columnas empacadas o capilares. En las columnas empacadas, la fase líquida se deposita sobre un soporte sólido finamente dividido e inerte en una columna de 1 a 3 m de longitud x 2 a 4 mm de diámetro interno. Los soportes más comúnmente empleados son tierra de diatomeas, polímeros porosos, carbono grafito, tamiz molecular. En las columnas capilares, que no contienen soporte, la fase líquida se deposita en la superficie interna de la columna o puede unirse químicamente a ella.

Cromatografía gas-sólido: se emplea como fase estacionaria alúmina, sílice, carbono o resinas porosas poliaromáticas.

El equipo cromatográfico (cromatógrafo de gases) consta de las siguientes partes (Figura 1.5).

- Un sistema para alimentar un gas de transporte (gas acarreador) que recorre en forma permanente el circuito del cromatógrafo.
- Un sistema de inyección. El inyector es el lugar por donde se introduce una pequeña cantidad de muestra (del orden de  $1 \text{ cm}^3$  de gas o 1 micro-litro de líquido) en medio de la corriente de gas acarreador.
- Un sistema de separación formado por una o varias columnas que llevan a cabo la tarea de fraccionamiento de los diferentes componentes.

- Un sistema de detección para generar una señal cuando un componente de la mezcla completa el recorrido del sistema de separación.
- Un sistema de integración para cuantificar la señal generada por cada componente en el detector.

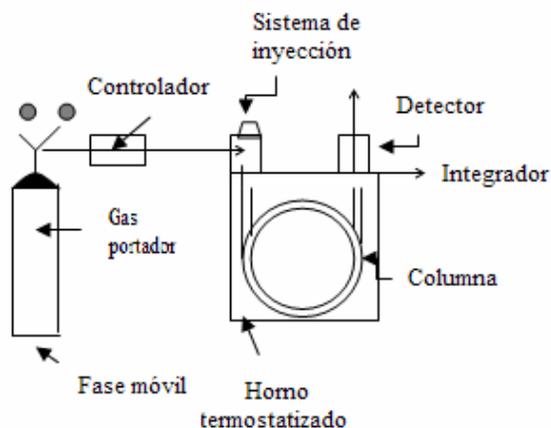


Figura 1.5 Equipo cromatográfico

### 1.3.2 Detectores en cromatografía de gases

#### Clasificación de los detectores

(Skoog et al., 2001)

(<http://latina.chem.cinvestav.mx/RLQ/tutoriales/cromatografia/Gas.htm>)

Estos pueden ser clasificados:

- Detectores según su grado de selectividad :
  - Universales: responden a la mayoría de los solutos que pasan por él.
  - Específicos ó Selectivos: exhiben una gran respuesta a un grupo particular de substancias con un mínimo de respuesta a otras.
- Detectores destructivos y no destructivos: esta clasificación, obviamente, es en referencia a si la muestra es destruida o no.
- Detectores según su modo de respuesta:

- Dependientes del flujo másico: producen una señal que es proporcional a la cantidad de soluto que pasa a través de él en la unidad de tiempo pero es independiente del volumen de gas portador requerido para la elución.
- Dependiente de la concentración: dan una señal proporcional a la cantidad de soluto, por unidad de volumen de gas portador que pasa a través de él.
- Detectores según el proceso de detección: ionización, óptico-espectroscópico, electroquímico, etc.

### Características de los detectores

(Skoog et al., 2001)

(<http://latina.chem.cinvestav.mx/RLQ/tutoriales/cromatografia/Gas.htm>)

- Sensibilidad: medida de la efectividad de un detector para convertir la muestra en una señal eléctrica medible.
- Linealidad: rango de masa ó concentración de muestra sobre el cual el detector mantiene una sensibilidad constante sin una desviación arbitraria. El significado práctico de la linealidad del detector es el que le indica al analista la concentración para la cual el detector es confiable. Hay dos límites en la curva de linealidad:
  - El límite de concentración inferior, que es dado por el límite de detección
  - El límite superior, definido por un porcentaje de desviación arbitrario de la curva de linealidad, normalmente se toma un 5 % de desviación.
- Rango dinámico lineal: rango sobre el cual la sensibilidad del detector es constante.
- Ruido: es cuantificado por el promedio de la amplitud pico-pico de la señal. El significado de conocer el nivel de ruido de un detector es un factor determinante en la determinación de la cantidad mínima detectable y el límite inferior del rango lineal.
- Límite de detección: está definido como la mínima cantidad de sustancia que puede producir una señal que sea el doble del nivel de ruido.
- Corriente de fondo: señal constante de salida generada por el proceso, en el que un detector está operativo, sin que alguna sustancia pasa a través de él. Esta señal es muy importante, ya que permite diagnosticar el buen o mal funcionamiento del detector.

### Detectores más usados en cromatografía de gases

(Skoog et al., 2001; Amirav, 2001)

<http://latina.chem.cinvestav.mx/RLQ/tutoriales/cromatografia/Gas.htm>

- Detector de conductividad térmica: mide la conductividad térmica del gas portador, ocasionada por la presencia de sustancias eluidas.
- Detector de ionización de flama: basado en la medida de las variaciones de la corriente de ionización, en una flama oxígeno-hidrógeno, debido a la presencia de sustancias eluidas.
- Detector de captura de electrones: basado en la electronegatividad de las sustancias eluidas y su habilidad para formar iones negativos, por captura de electrones.
- Detector de fotometría de flama: basado en la medida de la intensidad de emisión molecular y de fluorescencia de heteroátomos, en moléculas orgánicas.
- Detector de ionización de flama alcalino: a veces llamado NP o detector de nitrógeno-fósforo, contiene una fuente termoiónica, constituida por una sal de un metal alcalino o un elemento de vidrio, que contiene rubidio u otro metal, que produce la ionización de compuestos con nitrógeno y fósforo orgánicos. Es un detector selectivo que muestra poca respuesta a los hidrocarburos.
- Detector de espectrometría de masas: permite determinar la masa molecular de la sustancia de interés, así como proporcionar una valiosa información estructural de la misma. Para determinar la masa molecular es necesario ionizar la molécula mediante diferentes técnicas como Impacto electrónico (EI), Ionización química (CI), etc. Las combinaciones cromatográficas como la GC/MS, permite además determinaciones cuantitativas de compuestos volátiles, en muestras complejas previas separación cromatográfica. Los iones formados son acelerados y enfocados hacia el analizador que los separa en función de su relación masa a carga ( $m/z$ ) y son recogidos en un colector o detector que registra la señal producida. Estas señales son digitalizadas y enviadas a un sistema informático que permite estudiar las señales recibidas, manipularlas y compararlas con librerías comerciales de espectros ya registrados. El espectro de masas se representa en un sistema de coordenadas indicándose en el eje de abscisas la relación  $m/z$  y en el eje de ordenadas la abundancia iónica relativa de cada uno de los iones detectados. Es una técnica destructiva para la muestra, al ser ésta ionizada y fragmentada. El problema más importante de esta técnica, por los requerimientos de alto vacío para mantener las condiciones adecuadas de funcionamiento del sistema, es la limitación en la cantidad de

muestra que se puede introducir al sistema y el flujo máximo del gas portador en la cromatografía de gases acoplada a masas (CG/MS).

Para todos los casos el detector debe mantenerse a una temperatura superior a la de la columna para impedir la condensación de las sustancias eluidas. Para los análisis cuantitativos los detectores deben brindar una respuesta que debe ser directamente proporcional a la cantidad de la sustancia presente en el detector para un intervalo amplio de concentraciones. Los detectores más comúnmente empleados son el de ionización de flama, el de conductividad térmica, captura electrónica, nitrógeno-fósforo y espectrometría de masas. El empleo de los diferentes detectores, se discute en los desarrollos de aplicación específicos.

Deben ser ajustadas las variables principales del sistema cromatográfico que se mencionan a continuación para la determinación específica en una muestra determinada:

1. Tipo de columna
2. Carrier
3. Velocidad del carrier
4. Temperatura del horno (constante o de variación programada)
5. Detector
6. Metodología de integración de la señal.

Al inyectar en el cromatógrafo una mezcla de varios componentes, se obtiene una respuesta bajo la forma de una señal que varía en el tiempo, mostrando "picos" en tiempos característicos para cada componente. La altura (o área) de cada uno de estos picos es proporcional a la abundancia del componente involucrado. El registro de la señal del detector, en función del tiempo se denomina cromatograma de la muestra.

#### **1.4 Hidrógeno y celdas de combustible**

El hidrógeno es actualmente uno de los mejores combustibles para las celdas combustibles de electrolito polimérico, posee una excelente reactividad electroquímica y cero características de emisión, pero su uso conlleva varios problemas tanto de almacenamiento como en su transporte, aspectos que se encuentran en estudio en la actualidad. Los hidrocarburos, similares a la gasolina y los alcoholes han sido visualizados como combustibles convenientes para vehículos

eléctricos. Sin embargo, los hidrocarburos son poco reactivos electroquímicamente y dentro de los alcoholes, solamente el metanol puede ser económico y producido en grandes cantidades. Las tecnologías de las celdas de combustible de sistemas PEM (Membrana intercambiadora de protones), parecen prometedoras en aplicaciones inmediatas y portátiles (Sebastian et al.,1999).

Existen varios tipos de celdas de combustible, las cuales están en diferentes etapas de desarrollo. Típicamente las celdas de combustible son clasificadas por su electrolito (y abreviadas por sus siglas en inglés): Ácido fosfórico (PAFC), Alcalinas (AFC), Carbonatos Fundidos (MCFC), Óxidos Sólidos (SOFC) y Membrana Intercambiadora de Protones (PEMFC). Nuevos miembros de la familia de las Celdas de Combustible, tales como las de Metanol (DMFC), han surgido como resultado del trabajo de investigaciones (Moreira, 2003). Las principales ventajas de las celdas de combustible son:

- Alta eficiencia de conversión de energía
- Diseño modular
- Contaminación química y acústica muy baja
- Capacidad de cogeneración
- Respuesta rápida de carga

Los sistemas de celdas de combustible representan una nueva aproximación tecnológica, la cual reúne todos los requerimientos para una tecnología de conversión sustentable futura. Además, ninguno de los materiales usados en las celdas de combustible causa impacto ambiental perjudicial y por lo tanto, pueden ser producidos sin ocasionar problemas (Kordesh y Simader, 1995).

Las celdas de combustible permiten promover una diversidad de combustibles y una transición hacia fuentes de energía renovables. Así, una variedad de combustibles que pueden ser usados en éstas, tales como hidrógeno, metanol, etanol, gas natural y gas licuado de petróleo (Moreira, 2003).

#### **1.4.1 Funcionamiento de las celdas de combustible**

Una celda de combustible es un dispositivo electroquímico el cual puede convertir continuamente la energía química de un agente reductor y un oxidante a energía eléctrica por un proceso que

involucra esencialmente sistemas electrodo-electrolito, en donde los electrodos son comúnmente denominados cátodo y ánodo. Un combustible rico en hidrógeno fluye hacia el ánodo, donde el hidrógeno libera electrones y deja iones de carga positiva. Los electrones circulan por un circuito externo mientras que los iones se difunden a través del electrolito. En el cátodo se combinan los electrones con los iones de hidrógeno y con el oxígeno para formar agua como subproducto. La reacción puede acelerarse con un catalizador, de los que el prototipo es el platino (Figura 1.6). En estas celdas el hidrógeno es la sustancia más fácil de oxidar, por lo cual el ánodo no representa ningún problema. Pero en el caso del cátodo, la reducción de oxígeno es la parte que limita la reacción, es decir, es la que impone las condiciones de trabajo a la celda. En la actualidad los electrodos en las celdas de combustible son totalmente de platino o de aleaciones de platino. El elevado precio de este material ha retrasado el desarrollo comercial de estos dispositivos, además de que dicho catalizador es muy susceptible a diferentes tipos de envenenamiento en su estructura, que inhibe su buen comportamiento como catalizador en las celdas de combustible (Appleby,1999).

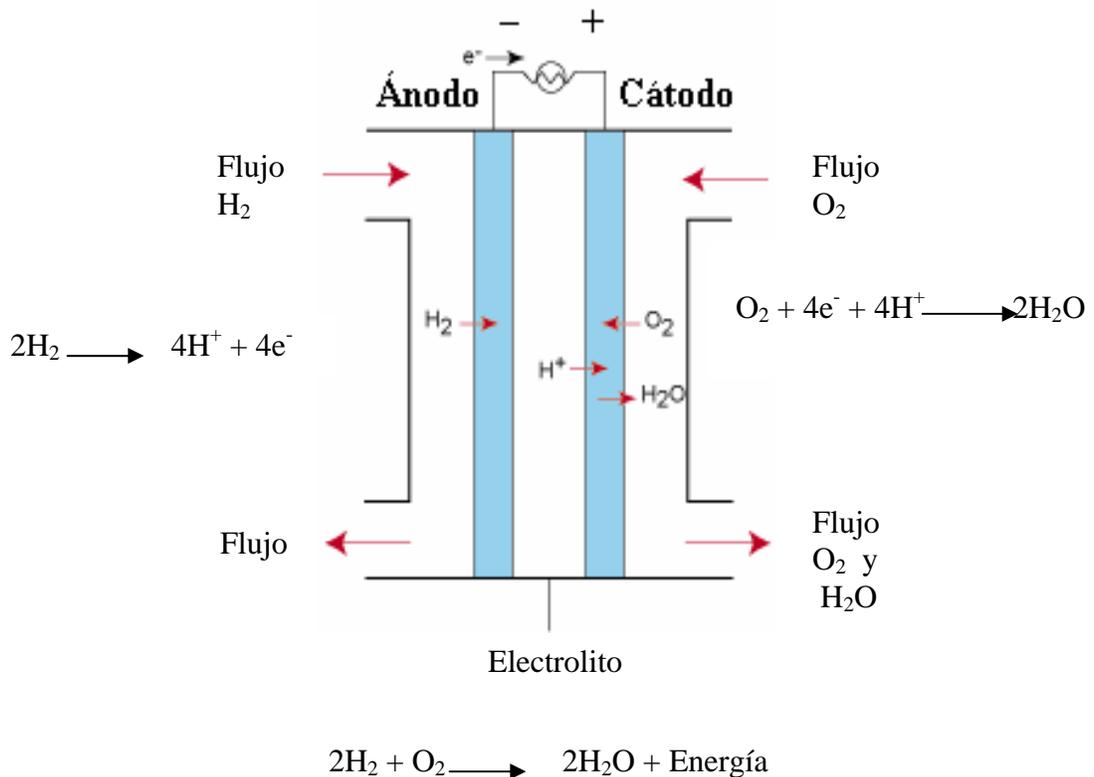


Figura 1.6 Esquema general del funcionamiento de una celda de combustible

### 1.4.2 Eficiencia de las celdas de combustible

La eficiencia energética de una celda de combustible según Ulleberg, (1998), se define como:

$$E = \frac{U_{rev}}{U_{tn}} \quad (1.1)$$

donde:

$U_{rev}$ : voltaje reversible, (V)

$U_{tn}$ : voltaje termoneutral, (V)

$$U_{tn} = \frac{-\Delta H}{nF} \quad (1.2)$$

donde:

$n$ : número de electrones generados por 1 mol de hidrógeno, 2

$F$ : constante de Faraday, 96487 A.s/mol

$\Delta H$ : entalpía, (J/mol) (W.s/mol) (A.V.s/mol)

### 1.4.3 Curva característica de las celdas de combustible tipo PEM

La curva característica corriente-voltaje (I-U) para una PEMFC se puede describir mediante una ecuación empírica que considera los sobrepotenciales, de acuerdo con la ecuación de Tafel, la resistencia en la membrana de intercambio de protones y las limitaciones del transporte de masas. Chamberlin et al., 1995, propusieron la siguiente ecuación (gama completa de la densidad de corriente):

$$U = U_0 - b \log i - Ri - c \exp(di) \quad (1.3)$$

donde:

$U$ : potencial de la celda, mV

$U_0$ : voltaje de circuito abierto de la celda, mV

$i$ : densidad corriente ( $i = I/A$ , donde  $I$  = corriente y  $A$  = área del electrodo), mA/cm<sup>2</sup>

$b$ : pendiente de Tafel, mV/dec

$R$ : resistencia, mV·cm<sup>2</sup>/mA

$c$ : parámetro de sobrepotencial debido a la limitación del transporte de masa mV

$d$ : parámetro de sobrepotencial debido a la limitación del transporte de masa, cm<sup>2</sup>/mA

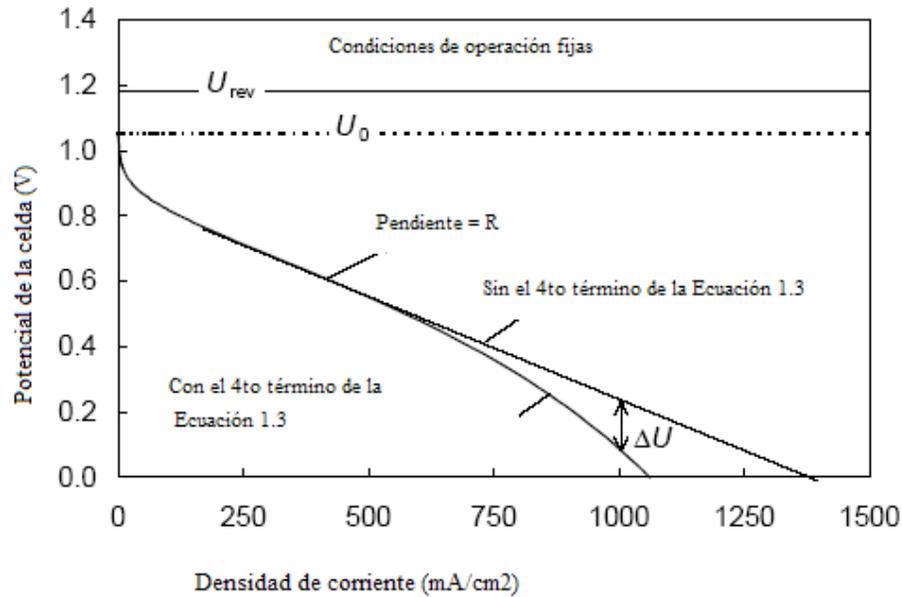


Figura.1.7 Curva característica potencial-densidad de corriente de una PEMFC

La Figura 1.7 ilustra las características del potencial de una celda-densidad de corriente, para una celda de combustible típica tipo PEM ( $H_2/O_2$ ) que funciona a temperatura, presión y condiciones de operación fijas. El primer término en el lado derecho de la ecuación 1.3, es el voltaje de circuito abierto, el cual puede ser medido o calculado a través de la siguiente ecuación:

$$U_0 \cong U_{rev} + b \log i_0 \quad (1.4)$$

donde:

$U_{rev}$  : es el voltaje reversible

$b$  e  $i_0$ : son los parámetros de Tafel.

El segundo término es la ecuación de Tafel para las densidades de corrientes mayores que cero.

El tercer término  $Ri$  de la ecuación 1.3, es predominante debido a la resistencia óhmica de la membrana de intercambio de protones (sobrepotencial por resistencia óhmica), mientras que las otras contribuciones debidas a  $R$  son las transferencias de cargas de las reacciones del hidrógeno y el oxígeno, la resistencia electrónica de los accesorios de una celda simple y la resistencia debido al transporte de masas que constituyen la región intermedia de la densidad de corriente.

El cuarto término se incluye para explicar la salida experimental, observada como alinealidades en las altas densidades de corrientes, debido a la limitación del transporte de masa (sobrepotencial por concentración). Este término, que incluye los parámetros  $c$  y  $d$ , es indicado por  $\Delta U$  en la Figura 1.6. Una evaluación teórica de estos parámetros revela que  $c$  afecta al tramo de la región lineal de la curva de potencial-densidad de corriente y a la densidad de corriente en la cual hay alinealidades, mientras que  $d$ , afecta dicha curva después de la región lineal. Estas alinealidades en las altas densidades de corrientes, fueron demostradas experimentalmente por Chamberlin et al., 1995.

#### 1.4.4 Eficiencia de Faraday

Los flujos estequiométricos del hidrógeno y del oxígeno suministrados a una celda de combustible (Ulleberg, 1998), se pueden calcular como:

$$F_{H_2} = 2F_{O_2} = \frac{n_c I}{nF} \quad (1.5)$$

donde:

$F_{H_2}, F_{O_2}$ : relación de flujo de hidrógeno y oxígeno, mol/s

$n_c$  : número de Celdas en serie

$n$  : número de moles de electrones por moles de agua,  $n = 2$

$F$  : constante Faraday ,  $F = 96\ 485$  A.s/ mol

$I$  : corriente, A

La relación de flujo del hidrógeno, en el lado del combustible y el oxígeno en el lado del oxidante, afecta el funcionamiento de las celdas de combustible tipo PEM. Por ejemplo, si el flujo de  $H_2$  se mantiene constante y el flujo de  $O_2$  aumenta, el funcionamiento total de la celda de combustible también aumenta. En las celdas de combustible de  $H_2$ -Aire, que tienen concentraciones más bajas de  $O_2$  en el lado del cátodo, que las celdas de combustible  $H_2/O_2$ , los flujos de aire se suministran típicamente sobre dos veces el estequiométrico. En una celda de combustible tipo PEM, los flujos de hidrógeno son ligeramente mayores que el estequiométrico. En tales casos, el exceso del hidrógeno no consumido en la reacción es expulsado hacia el exterior. Estas pérdidas de hidrógeno reducen la eficiencia, llamada eficiencia de Faraday de las celdas de combustible, la cual puede ser calculada mediante la siguiente ecuación:

$$Eficiencia\ de\ Faraday = \frac{Flujo_{H_2\ estequiometrico.}}{Flujo_{H_2\ actual}} \quad (1.6)$$

donde:

$Flujo\ H_2\ estequiometrico.$ : relación de flujo estequiométrico del hidrógeno, mol/ s

$Flujo\ H_2\ actual$  : relación de flujo actual del hidrógeno, mol/s

### 1.5 Eficiencia fotosintética

En el concepto de eficiencia no interesa sólo la cantidad total de energía asimilada por el ecosistema en energía química, sino, qué proporción es del total de energía luminosa que le llega al ecosistema. Llamamos eficiencia de la producción primaria al cociente entre la energía fijada por la producción primaria y la energía de la luz solar que llega a ese ecosistema.

El proceso de fotosíntesis podría llegar a tener una eficiencia teórica de hasta un 9 % de la radiación que llega a la superficie sobre las plantas. Es decir un 2 % de la energía que llega a la parte alta de la atmósfera. Pero nunca se han medido en la realidad valores tan altos. El valor máximo observado, en un caso muy especial de una planta tropical con valores de iluminación muy altos, ha sido de un 4.5 % de la radiación total que llega a la planta. ([www.esi.unav.es](http://www.esi.unav.es)). En la Tabla 1.1 aparecen eficiencias de distintas comunidades vegetales.

Tabla 1.1. Eficiencia de distintas comunidades vegetales

Eficiencias normales, en plena estación de crecimiento, con buenas condiciones de humedad, temperatura, etc. son:	Eficiencia de la producción primaria bruta	% dedicado a respiración
Comunidades de fitoplancton	< 0.5%	10 - 40%
Plantas acuáticas enraizadas y algas de poca profundidad	> 0.5%	
Bosques	2 – 3.5%	50 - 75%
Praderas y comunidades herbáceas	1 - 2%	40 - 50%
Cosechas	< 1.5%	40 - 50%

Se puede decir en resumen, que en plena estación de crecimiento y con las condiciones que hemos indicado, eficiencias muy normales son del 1% de la energía que llega a las plantas o lo que es lo mismo del 0.2 % de la energía total que llega a la parte alta de la atmósfera.

Las plantas están bien adaptadas al uso de luz difusa y de relativamente baja intensidad y son ineficientes cuando usan luz de alta intensidad como la del mediodía, por ejemplo. La explicación más probable de por qué no usan mejor la luz que reciben, es que su actividad se encuentra limitada por la escasez de elementos químicos y no por la luz. Por tanto, en la evolución no ha sido necesario desarrollar mecanismos de fotosíntesis más eficientes.

El carbono, el nitrógeno y el fósforo, entre otros, son los elementos esenciales que las plantas necesitan. La producción depende siempre del más escaso contenido de esos elementos: el llamado factor limitante. Normalmente suele ser el fósforo, aunque a veces lo es el nitrógeno.

Las eficiencias se basan en la radiación fotosintéticamente activa (PAR), lo cual significa que basada en el espectro solar total, serían 0.43 veces el valor medido, variando de esta forma entre el 3 y el 10 %. Estas eficiencias han sido calculadas para un período de iluminación después de un período oscuro. El oxígeno producido debe ser reemplazado, inmediatamente por un gas inerte del bioreactor, pues de lo contrario no son alcanzables estas eficiencias y no se hace factible el escalado. Se estudian maneras de superar la inhibición del oxígeno, para hacer diseños más prácticos de bioreactores y optimizar los procesos.

La eficiencia fotosintética se define como la energía almacenada como biomasa producida por unidad de energía luminosa absorbida. La energía luminosa absorbida se puede basar en los rangos normales de la PAR, (400-700 nm para las algas verdes y 400-950 nm para las bacterias púrpuras) o en la irradiancia solar total (todas las longitudes de onda). La producción de la biomasa (como proteína o peso seco) y la energía luminosa se pueden utilizar como medida cuantitativa para la determinación de la eficiencia. Como el producto previsto es energía (en forma de hidrógeno) y el factor limitante es la luz, la eficiencia se expresa básicamente en la energía producida por unidad de energía luminosa absorbida. Según Akkerman et al., 2002 la eficiencia se define como:

Eficiencia (%) = producción de hidrógeno x contenido de energía del hidrógeno/energía luminosa absorbida

La eficiencia de la producción de hidrógeno en sistemas fotoautotróficos, se ve afectada por la inhibición del proceso por el oxígeno. Las eficiencias reportadas de la conversión de energía luminosa en energía de hidrógeno son bajas, alrededor del 1 a 2 %, basadas en el espectro solar básico, por la limitación mencionada anteriormente, pero pueden ser incrementadas de 3 a 10 %, si se logra remover inmediatamente todo el oxígeno producido. En el caso de procesos fotoheterotróficos, la eficiencia que ha sido estimada teóricamente alcanza valores de hasta el 10 %.

Por ejemplo ha sido reportada la eficiencia para la cianobacteria *Synechococcus sp.* Miami BG043511 basada en el PAR en 3.5 % y alrededor de 1.5 % basada en la energía total (Greebaum, 1988). En contraste la eficiencia para *A. Cylindrica*, en cultivos a cielo abierto fue de 0.2 % (Miyamoto et al., 1979). En el caso de algas verdes se han obtenido eficiencias entre 6 y 20 % y para las bacterias fotoheterotróficas desde 0.1 hasta 10 % basadas en el PAR (Greenbaum, 1988).

# CAPÍTULO II

## 2. MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.1 Material biológico empleado en los experimentos

Se escogieron 4 cepas de microorganismos fotosintéticos para ser propagadas y luego emplearlas en la realización de los experimentos para la obtención de hidrógeno. Estas cepas se recibieron en tubos de ensayo, procedentes de la colección de cepas de la Universidad de Texas, E.U. (UTEX-2342, 393, 2015 y 2016). Posteriormente, se procedió a su resiembra en medio líquido y sólido, en tubos de ensayo y en medio sólido en placas (para esto se añade un inóculo de 1.5 g/100 mL de medio). Se toma una alícuota del sembrado en medio líquido en tubo (1/10 mL) y se añade en 100 mL de medio en un matraz erlenmeyer, se preparan varias réplicas y se mantienen en un agitador orbital en el cuarto de cultivo a una temperatura controlada (21-22 °C) e iluminación (Ver Figura.2.1). Se observa la evolución y crecimiento de los microorganismos, determinando regularmente la densidad óptica a una  $\lambda$  750 nm y observando en el microscopio óptico, si hay presencia de contaminación. Se va escalando en volumen progresivamente, de acuerdo al crecimiento celular que se va observando, a 500 mL, 1000 mL y luego se inocula en 3 litros de medio de cultivo, en los bioreactores de hasta 20 litros de capacidad total, que se encuentran en la planta piloto en condiciones de iluminación (4 lámparas de 39 W y burbujeo de aire). Según van pasando los días, se va agregando medio de cultivo sucesivamente de acuerdo a la concentración de biomasa que se quiera alcanzar, siguiéndola por densidad óptica medida a  $\lambda$  750 nm, de acuerdo a la finalidad de la biomasa. Además durante todo el proceso se recolectan también muestras regularmente, que son observadas al microscopio óptico, para revisar las condiciones asépticas y que el cultivo se mantenga unialgal. Se mantiene el crecimiento de los cultivos hasta densidades ópticas medidas a  $\lambda$  de 750 nm de alrededor de 1 a 2, en los aproximadamente 10 a 15 litros de volumen útil de cultivo en cada bioreactor, reinoculando en otro bioreactor al llegar a esos valores para mantenerlos en la etapa de crecimiento celular, pero a bajas concentraciones para evitar floculación o sedimentación del mismo. Se resiembra en tubos y placas cada 2 meses de forma regular y en ocasiones cuando existe algún síntoma de contaminación. Este proceso de resiembra, se mantuvo constantemente a lo largo de estos 3 años, manteniendo las cepas en buen estado de conservación.

Con una de las cepas, la de *Scenedesmus obliquus* 2016 cuyo medio de cultivo contenía el mismo que para las restantes *Scenedesmus obliquus* (393 y la 2015), pero con adición de glucosa (0.5 %) y extracto de levadura (0.25 %), fue muy difícil lograr el escalado a volúmenes hasta de 1 L, ya

que se contaminaba muy rápidamente y se tuvieron que realizar trabajos de aislamiento y purificación, empleando antibióticos reiteradamente, por lo que se decidió, después de un número determinado de reinoculaciones, no insistir más en el escalado, pues no resultaría factible el mantenimiento del cultivo para el trabajo futuro.

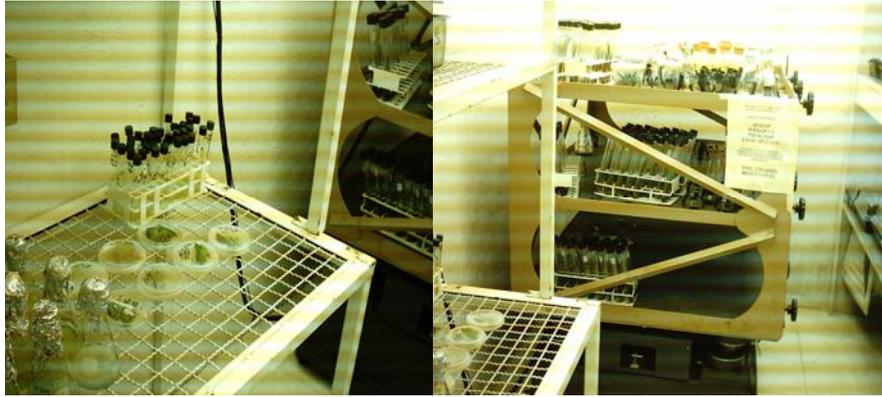


Figura 2.1 Cepas en el Cuarto de Cultivo

Finalmente escogimos 2 de las cepas, para el escalado hasta 14 a 20 litros de cultivo, que tuvieron mejor adaptación y durabilidad en las condiciones de mantenimiento: *Scenedesmus obliquus* 393 y *Spirulina maxima* 2342. La primera cepa, tiene un crecimiento celular muy lento, por lo que el incremento de la concentración en el tiempo es muy lento, hay que mantenerla en constante agitación, tanto con agitación magnética como con burbujeo de aire ya que tiende a sedimentarse y por tanto tiene menor durabilidad. Con la segunda cepa se obtuvieron mayores éxitos en el escalado, no es una cepa de fácil contaminación y su reproducción e incremento de la concentración en el tiempo es más rápido. A continuación describiremos algunas de las características principales de ambas cepas de microorganismos fotosintéticos.

### **2.1.1 Características de *Scenedesmus***

*Scenedesmus* es un alga verde, que se encuentra como una población dominante en el plancton de aguas frescas. Los hábitats usuales son en aguas de estanques limpios, lagos y ríos, su pared celular contiene principalmente celulosa, pectina y carotenoides, que le dan una gran resistencia. La reserva alimenticia es en forma de almidón, dentro del cloroplasto. Poseen dos flagelos en forma de pluma, raramente ninguno o más de dos.

Como Chlorophyta, *Scenedesmus* tiene clorofila a y b como pigmentos fotosintéticos. Las Chlorophyta difieren así del resto de las algas eucariotas, formando el producto del almacenamiento en el cloroplasto en lugar de en el citoplasma. Los procesos fotosintéticos en éstos, se parecen a los de plantas superiores.

Es un organismo que habita en aguas dulces, a temperaturas de 31-32 °C, a pH óptimo de 6.3, pero también puede ser tolerante a aguas residuales fuertemente contaminadas y medios más básicos. Es capaz de crecer tanto en condiciones autotróficas como heterotróficas. Sus células son normalmente encontradas como arreglos de 2, 4, 8 y menos frecuente 16, llamado con frecuencia cenobios, de forma elipsoidea y dimensiones de 12-14 µm de ancho x 10-20 µm de longitud (Fedler y Parker, 1993).

En *Scenedesmus obliquus* las células están en las colonias como los múltiplos de dos, con cuatro u ocho células de manera muy común. La morfología de la colonia puede variarse considerablemente alterando el medio en que las células están creciendo. En un medio con bajas concentraciones de fósforo o sal, el *Scenedesmus* es inducido para crecer unicelularmente, formando las células elípticas largas de alrededor de 10 µm.

Las células mononucleadas tienen un solo cloroplasto laminado, que constituye la mayoría del volumen celular. El modo más común de reproducción de *Scenedesmus obliquus* es asexual. Una fase mótil en la historia de la vida *Scenedesmus obliquus* (zoosporas), es un fenómeno muy raro en la naturaleza y sólo puede observarse bajo condiciones de tensión, como la suspensión de nitrógeno.

Debido a que puede cultivarse fácilmente *Scenedesmus obliquus*, ha sido un objeto de la investigación para los botánicos. A principios del 1950 Gaffron descubrió el metabolismo de hidrógeno de algas eucariotas, primero en *Scenedesmus obliquus* (Wunschiers y Lindblad, 2002).

En la Figura 2.2 se puede observar una fotografía con algunas células de una muestra de cultivo de *Scenedesmus obliquus* (cepa UTEX-393), del empleado para los experimentos, tomada con un microscopio óptico NIKON con cámara digital acoplada HITACHI KP-D50 a color.

Phylum: Chlorophyta  
Clase: Chlorophyceae  
Orden: Chlorococcales  
Familia: Scenedesmaceae  
Células : 10  $\mu\text{m}$  (células elípticas)

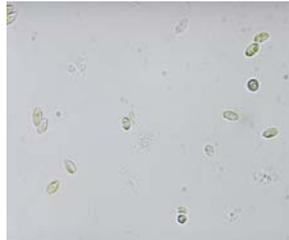


Figura 2.2 *Scenedesmus obliquus* 393

### 2.1.2 Características de *Spirulina*

La *Spirulina*, es descendiente de las primeras formas fotosintéticas, surgidas hace unos 3 500 millones de años. Se trata de un organismo fotosintético que utilizando el anhídrido carbónico de la atmósfera, es capaz de producir oxígeno y obtener su alimento.

Ha sido considerada por algunos autores como una microalga verde-azulada (cianofícea) de tamaño microscópico y forma filamentososa (Durand-Chastel, 1980), pero actualmente está definida como Cianobacteria, no tiene organelos celulares y su maquinaria fotosintética se encuentra ubicada en estructuras como los tilacoides (Ver Figura 1.2). Las cianofitas formaron la actual atmósfera con oxígeno, en la que pudieron evolucionar otras formas de vida. De esta forma, contribuyeron a regular la atmósfera del planeta.

*Spirulina* crece en lagos naturales alcalinos, tiene su hábitat en determinadas zonas de África y América del Sur. En estos lugares, la *Spirulina* era utilizada por los aborígenes como alimento cotidiano, quienes ya conocían sus múltiples propiedades. Su cultivo forma parte de la nueva era de la agricultura ecológica. Está constituida por células de 2 a 8  $\mu\text{m}$  de longitud que van formando una espiral y a ello debe su nombre. Crece de forma natural en zonas de temperaturas altas, su rango óptimo de temperatura se encuentra entre 35 y 37 °C, en aguas de lagos salados en latitudes de 35° N a 35° S y su pH óptimo se encuentra entre 8 y 11 (Richmond, 1986).

Es el alimento con mayor número de elementos nutritivos distintos por unidad de peso y bastan 20 gramos diarios de *Spirulina* para cubrir todas las necesidades nutritivas del organismo humano. Desgraciadamente la alimentación actual es habitualmente deficiente en diferentes nutrientes, lo cual ocasiona numerosos problemas de salud. Para neutralizar estas carencias, miles de personas en todo el mundo ingieren *Spirulina* como complemento a su alimentación y de esta forma evitar fácilmente las complicaciones de salud que se pueden derivar de malas costumbres nutricionales. Los datos reflejados en la Tabla 2.1, son valores medios de diferentes especies: *Spirulina platensis* originaria del Chad, *Spirulina geitleri* o *maxima* procedente del lago Texcoco en México, *Spirulina jeejibai* de la India y *Spirulina Orovilca* de Perú.

(<http://www.geocities.com/labalmar/spirulina.html#2>)

Tabla 2.1 Datos nutricionales de la *Spirulina*. Contenido por 10 g de microalga.

<b>Proteínas</b>	60-70 %	<b>Ficocianina</b>	1400 mg.	<b>Arginina</b>	430 mg.
<b>Carbohidratos</b>	15-25 %	<b><math>\gamma</math>-Linolénico</b>	100 mg.	<b>Ac. Aspártico</b>	610 mg.
<b>Minerales</b>	7-13 %	<b>Cis-Linoleico</b>	80 mg.	<b>Cistina</b>	60 mg.
<b>Lípidos</b>	6-8 %	<b>Vitamina A</b>	23000 I.U.	<b>Ac. Glutámico</b>	910 mg.
<b>Fibra</b>	8-10 %	<b>Beta-caroteno</b>	14 mg.	<b>Glicina</b>	320 mg.
<b>Calcio</b>	70 mg.	<b>Vitamina E</b>	1 mg.	<b>Histidina</b>	100 mg.
<b>Fósforo</b>	80 mg.	<b>Vitamina B1</b>	0.35 mg.	<b>Isoleucina</b>	350 mg.
<b>Magnesio</b>	40 mg.	<b>Vitamina B2</b>	0.40 mg.	<b>Leucina</b>	540 mg.
<b>Hierro</b>	10 mg.	<b>Vitamina B3</b>	1.40 mg.	<b>Lisina</b>	290 mg.
<b>Zinc</b>	300 mcg.	<b>Vitamina B6</b>	80 mcg.	<b>Metionina</b>	140 mg.
<b>Cobre</b>	120 mcg.	<b>Vitamina B12</b>	25 mcg.	<b>Fenilalanina</b>	280 mg.
<b>Manganeso</b>	500 mcg.	<b>Ácido Fólico</b>	1 mcg.	<b>Prolina</b>	270 mg.
<b>Cromo</b>	25 mcg.	<b>Biotina</b>	0.5 mcg.	<b>Serina</b>	320 mg.
<b>Sodio</b>	90 mg.	<b>Ac.Pantoténico B5</b>	10 mcg.	<b>Treonina</b>	320 mg.
<b>Potasio</b>	140 mg.	<b>Vitamina C</b>	0.5 mg.	<b>Triptófano</b>	90 mg.
<b>Selenio</b>	10 mcg.	<b>Vitamina K1</b>	200 mcg.	<b>Tirosina</b>	300 mg.
<b>Germanio</b>	60 mcg.	<b>Inositol</b>	6.4 mg.	<b>Valina</b>	400 mg.
<b>Clorofila</b>	100 mg.	<b>S.O.D.</b>	15.000 I.U.	<b>Sulfolípidos</b>	100 mg.
<b>Carotenoides</b>	37 mg.	<b>Alanina</b>	470 mg.		

El género *Spirulina* es uno de los más importantes reportados para la nutrición humana y animal, así como para la acuicultura (Gross, 2004). Además es uno de los microorganismos fotosintéticos que puede ser capaz de producir hidrógeno, luego de ser sometida a condiciones de anaerobiosis-oscuridad, ha sido de los microorganismos menos estudiados para la producción de hidrógeno, se ha alcanzando actividad de 1 $\mu$ mol de hidrógeno/12 h/mg de peso seco, bajo condiciones de anaerobiosis en *Arthrospira Isolate C (Spirulina)* (Rocheleau et al., 1999), presentando una

similar actividad en la producción de hidrógeno, a la reportada por Aoyama et al., 1997 con *Spirulina platensis*.

En la Figura 2.3 se puede observar una fotografía con una muestra de cultivo de *Spirulina maxima* (UTEX-2342) del empleado para los experimentos, tomada con un microscopio óptico NIKON con cámara digital acoplada HITACHI KP-D50 a color.

Cepa: *Spirulina maxima* (UTEX-2342)

Phylum: Myxophycophyta

Clase: Cyanophyceae

Orden: Nostocales

Familia: Oscillatoriaceae



Figura 2.3 *Spirulina maxima* 2342

## 2.2 Medios de cultivo

### 2.2.1 Medio de cultivo para *Scenedesmus obliquus*

El medio de cultivo que se emplea para el crecimiento y mantenimiento de las cepas de *Scenedesmus obliquus* (393, 2015 y 2016) fue propuesto por Wunschiers y Lindblad, 2002. A continuación se describen los materiales empleados y el procedimiento para llevar a cabo su preparación.

#### *Materiales*

Reactivos de calidad analítica que se detallan en el procedimiento, comercializados por Sigma-Aldrich Química S.A de C.V., Fluka S.A de C.V. y J. T. Baker. S.A de C.V.

### Equipos

- Balanza Analítica OHAUS Precision advanced
- Balanza Analítica OHAUS Analytical Plus
- Autoclave Hirayama. 15 000 L.
- Potenciómetro de pH (pH-meter 430 Corning)

### Procedimiento para la preparación del medio de cultivo

El medio de cultivo completo se prepara por partes (G1, G2 y G3), se pesan los reactivos en la balanza analítica y se esteriliza el medio por grupos separados: (G1, G2 y G3) a 120 °C durante 20 minutos. El pH del medio de cultivo debe quedar aproximadamente en 7. A continuación se detallan en la Tabla 2.2, los componentes de cada uno de los grupos de medios que se preparan.

Tabla 2.2 Medio de cultivo para *Scenedesmus obliquus* (393, 2015 y 2016)

Componentes (g/l)	Solución G1	Solución G2	Solución G3
KNO <sub>3</sub>	0.81		
NaCl	0.46		
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.142		
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.414		
Na-citrato	0.162		
MgSO <sub>4</sub>	0.029		
CaCl <sub>2</sub>		0.147	
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>			0.003
FeSO <sub>4</sub>			0.0021
ZnSO <sub>4</sub>			0.0002
CuSO <sub>4</sub>			0.00005
MoO <sub>3</sub>			0.00012
MnCl <sub>2</sub>			0.000015

Para el caso de la preparación de medio de cultivo para *Scenedesmus obliquus* 2016, se añaden además a la solución G3 0.5% de glucosa y 0.25% de extracto de levadura antes de esterilizar.

### 2.2.2 Medio de cultivo para *Spirulina maxima*

El medio de cultivo que se emplea para el crecimiento y mantenimiento de la cepa de *Spirulina maxima* 2342 es el medio completo SOT, propuesto por Ogawa y Terui,1970. A continuación se describen los materiales y el procedimiento para llevar a cabo su preparación.

#### *Materiales*

Reactivos de calidad analítica que se detallan en el procedimiento, comercializados por Sigma-Aldrich Química S.A de C.V., Fluka S.A de C.V. y J. T. Baker. S.A de C.V.

#### *Equipos*

- Balanza Analítica OHAUS Precision advanced
- Balanza Analítica OHAUS Analytical Plus
- Autoclave Hirayama. Fe 15000L.
- Potenciómetro de pH (pH-meter 430 Corning)

#### *Procedimiento para la preparación del medio de cultivo*

En la Tabla 2.3 aparecen las cantidades (mL) de las diferentes soluciones que conforman el medio de cultivo completo SOT, éste se prepara por partes separadas (SOT1, SOT2, SOT3, A5, B6), se pesan los reactivos en la balanza analítica y se esteriliza el medio por grupos separados: (SOT1 + B6, SOT2, SOT3 + A5) a 120 °C durante 20 minutos. El pH del medio de cultivo debe quedar aproximadamente en 9.

Tabla 2.3 Preparación de 1 litro de Medio SOT

Solución	Cantidad (mL)
SOT1	798
SOT2	100
SOT3	100
A5	1.0
B6	1.0

Se utilizan 798 mL de agua destilada, el resto del volumen lo proporcionan las soluciones SOT 1,

SOT 2, A5, B6. A continuación se detallan en las siguientes Tablas (de 2.4 a 2.8), los diferentes componentes de cada uno de los grupos de soluciones, que conforman el medio de cultivo.

Tabla 2.4 Solución SOT1

Componente	(g/L)
NaHCO <sub>3</sub>	16.8

Tabla 2.5 Solución SOT2

Componente	(g/L)
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	5.0
NaNO <sub>3</sub>	25.0
K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	10.0
NaCl	10.0

Tabla 2.6 Solución SOT3

Componente	(g/L)
MgSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	2.0
CaCl <sub>2</sub> 2H <sub>2</sub> O	0.4
FeSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	0.1
Na <sub>2</sub> EDTA	0.8

Tabla 2.7 Solución A5

Componente	(g/L)
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	2.82
MnCl <sub>2</sub> 4H <sub>2</sub> O	1.81
ZnSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	0.22
CuSO <sub>4</sub> 5H <sub>2</sub> O	0.08
(NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub> · H <sub>2</sub> O	0.51

Tabla 2.8 Solución B6

Componente	(g/L)
NH <sub>4</sub> VO <sub>3</sub>	0.023
CrK(SO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> · 12H <sub>2</sub> O	0.192
NiSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	0.048
Na <sub>2</sub> WO <sub>4</sub> 2H <sub>2</sub> O	0.018
Ti <sub>2</sub> (SO <sub>4</sub> ) <sub>3</sub>	0.040
Co(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O	0.044

Luego de estar esterilizados cada grupo de solución del medio de cultivo, se procede a su mezclado, se distribuye el volumen según sea el caso y luego se inoculan los microorganismos.

## **2.3 Técnicas analíticas**

### **2.3.1 Determinación de la concentración de biomasa**

Para determinar la concentración de biomasa es necesario añadir a un vaso de precipitado de 1 L, volumen suficiente de cultivo del microorganismo para tres réplicas de experimentos y se emplean además aproximadamente 150 mL para determinar concentración (peso seco), pigmentos y pH. A continuación se describe el procedimiento empleado y los cálculos que se realizan para su determinación.

#### *Materiales*

- Vaso de precipitado con 50 mL de cultivo (volumen suficiente para tres réplicas del análisis)
- Probeta de 10 mL
- Matraz erlenmeyer de 250 mL para el filtrado
- Papel de filtro Whatman No.47 mm Ø circles. Cat. No. 1822047
- Papel de aluminio para secar las muestras filtradas en el Horno

#### *Equipos*

- Bomba de vacío Siemens. ARH 56.
- Horno de secado. RIOS. ROCHA. SA. Modelo HS-48
- Balanza analítica OHAUS Analytical Plus

#### *Procedimiento*

1. Se taran 3 círculos de papel de filtro
2. Se toman 10 mL de cultivo para cada muestra
3. Se filtra al vacío
4. Se ponen a secar las muestras a 75 °C en el Horno por 24 h
5. Se pesan las muestras en la balanza analítica

### *Cálculos*

Peso seco de biomasa -Tara = g de biomasa

En 10 mL de muestra: g/L de biomasa = g de biomasa  $\times$  1000 mL/l  $\div$  10 mL

g de biomasa = g/L de biomasa  $\times$  volumen empleado en los experimentos (L)

### **2.3.2 Determinación de pH**

El pH del cultivo es un parámetro necesario determinar, para comprobar si el mismo se encuentra dentro de los parámetros normales para el crecimiento y desarrollo de los microorganismos. A continuación se describe el procedimiento empleado para su determinación.

#### *Materiales*

Vaso de precipitado con 50 mL de cultivo (volumen suficiente para tres réplicas del análisis)

#### *Reactivos*

- Solución buffer de referencia pH 7
- Solución buffer de referencia pH 10

#### *Equipo*

Potenciómetro de pH (pH-meter 430 Corning)

#### *Procedimiento*

1. Se calibra el equipo introduciendo el electrodo en solución buffer 7
2. Se lava el electrodo con agua destilada
3. Se calibra el equipo introduciendo el electrodo en solución buffer 10
4. Se lava el electrodo con agua destilada
5. Se introduce el electrodo en un vaso de precipitado con 50 mL de cultivo y se anota el resultado de la medición
6. Se lava el electrodo con agua destilada

### 2.3.3 Determinación de pigmentos

Se determinan los pigmentos (Clorofila Total y Clorofila a), según la técnica descrita por Arnon, 1949. A continuación se describen los materiales, el procedimiento y los cálculos que se realizan para su determinación.

#### *Materiales*

- Vaso de precipitado con 50 mL de cultivo (volumen suficiente para 3 réplicas del análisis)
- Probeta de 10 mL
- 3 embudos de vidrio para filtrado
- 3 Matraces erlenmeyer de 250 mL para el filtrado
- Fibra de vidrio
- 4 Tubos de plástico de 50 mL con tapa
- 4 Tubos Eppendorf
- Metanol (calidad Grado HPLC)
- Diclorometano (calidad Grado HPLC)

#### *Equipos*

- Centrífuga Eppendorf 5415 C
- Espectrofotómetro DU 650 BECKMAN

#### *Procedimiento*

1. Se coloca un embudo en cada matraz erlenmeyer (3)
2. Se introduce en el embudo una pequeña cantidad de fibra de vidrio
3. Se añaden a cada embudo 10 mL de cultivo para el filtrado
4. Una vez terminada la filtración, se saca cada fibra de vidrio de su embudo con la biomasa impregnada y se introduce en cada tubo de 50 mL
5. Se añade a cada tubo 10 mL de metanol y 5 mL de diclorometano
6. Se agita durante 3 minutos cada muestra
7. Se esperan entre 20-40 minutos para la extracción
8. Se pone 1mL del extracto de cada muestra, en tubos Eppendorf de 1.5 mL (4 tubos)
9. Se centrifugan las muestras a 15 000 r.p.m durante 20 min

10. Se anotan las lecturas de cada muestra, detectadas en el espectrofotómetro a  $\lambda$  645 nm y  $\lambda$  663 nm, empleando como blanco solvente metanol

### *Cálculos*

a) Para el caso de *Scenedesmus obliquus* 393, se determina como pigmento la Clorofila Total (Clorofila a + Clorofila b) (mg/L )

$$\text{Clorofila Total (mg/L)} = 20.2 (\text{DO } \lambda \text{ 645 nm}) + 8.02 (\text{DO } \lambda \text{ 663 nm})$$

-En 15 mL de solvente: mg de Cl T = mg/L de Cl T  $\times$  0.015 L

-Para 10 mL de muestra: mg/L de Cl T = mg de Cl T  $\div$  0.010 L

-mg de Clorofila Total = mg/L de Cl T  $\times$  volumen empleado en los experimentos (L)

b) Para el caso de *Spirulina maxima* 2342, se determina como pigmento la Clorofila a (mg/L)

$$\text{Clorofila a (mg/L)} = 12.7 (\text{DO } \lambda \text{ 663 nm}) - 2.69 (\text{DO } \lambda \text{ 645 nm})$$

-En 15 mL de solvente: mg de Cl a = mg/L de Cl a  $\times$  0.015 L

-Para 10 mL de muestra: mg/L de Cl a = mg de Cl a  $\div$  0.010 L

-mg de Clorofila a = mg/L de Cl a  $\times$  volumen empleado en los experimentos (L)

## **2.4 Instalaciones experimentales básicas**

### **2.4.1 Bioreactores en Planta Piloto**

Se desarrolló una instalación en la Planta Piloto del IBT-UNAM para el mantenimiento de los volúmenes de cultivo, necesarios durante el desarrollo de los experimentos. Esta instalación cuenta con 3 bioreactores de hasta 20 L de capacidad total, iluminados con 4 lámparas de 39 W, a la parte central de los mismos en posición frontal les llega una iluminación de  $100 \mu\text{E}/\text{m}^2 \cdot \text{s}$  y se les suministra aire procedente de un compresor, que se colecta en un frasco y luego se distribuye uniformemente, pasando a través de los filtros bacteriológicos que se encuentran conectados a las mangueras (Masterflex 96400-16 mm), a la entrada de cada bioreactor. En las Figuras 2.4 y 2.5 puede observarse la instalación descrita anteriormente.



Figura 2.4 Bioreactores con cultivo de microorganismos en planta piloto (cultivos de *Spirulina maxima* 2342)



Figura 2.5 Bioreactores con cultivo de microorganismos (a la derecha *Scenedesmus obliquus* 393, a la izquierda *Spirulina maxima* 2342)

#### **2.4.2 Cromatógrafo de gases con Detector de Conductividad Térmica**

Se emplea un Cromatógrafo de gases con Detector de Conductividad Térmica (GC-TCD), VARIAN 3700 e Integrador DIONEX 4270 mostrado en la Figura 2.6, para realizar la detección de hidrógeno, en las muestras de cultivo de los microorganismos fotosintéticos cuyas características de operación son las siguientes:

- Temperatura del detector: 110 °C
- Temperatura del filamento: 140 °C

- Temperatura de la columna: 60 °C
- Gas portador: Argón grado cromatográfico: 99.998 % de pureza. INFRA
- Flujo de gas portador: 30 mL/min

Características de la columna: Molsieve 5 Å (16 ft x 1/8 in)



Figura 2.6 Cromatógrafo de gases con TCD

Se emplean como bioreactores botellas tipo Giggenbach como la que se muestra en la Figura 2.7 con válvula de teflón, sugerida por Santoyo et al., 1991, que son empleadas para recolectar los gases que emanan de los pozos geotérmicos y para prevenir la contaminación con aire. Estos se acoplan al Cromatógrafo de gases con TCD para realizar la detección.



Figura 2.7 Bioreactor acoplado al Cromatógrafo de gases con TCD

### 2.4.3 Módulo electrolizador-PEMFC

Se emplea una instalación experimental, formada por el módulo electrolizador-PEMFC, el electrolizador consta con una superficie de electrodo de  $40 \text{ cm}^2$  y potencia  $10 \text{ W}$  y la PEMFC tiene una superficie de electrodo de  $16 \text{ cm}^2$  y potencia  $1.2 \text{ W}$ . El electrolizador se alimenta de corriente eléctrica generada por un módulo de celdas fotovoltaicas (3 celdas), el cual es iluminado por una lámpara de  $75 \text{ W}$  (intensidad luminosa total incidente  $550 \mu\text{E}/\text{m}^2.\text{s}$ ), éste permite producir el oxígeno necesario para ser suministrado al cátodo de la PEMFC para su funcionamiento. El bioreactor se acopla a la PEMFC y es iluminado con una lámpara de  $100 \text{ W}$ . Se fija la intensidad luminosa de acuerdo al experimento a realizar y se mantiene el cultivo en agitación. En la Figura 2.8, se observa la instalación que nos permite alimentar la celda de combustible con hidrógeno liberado por los microorganismos y generar electricidad.

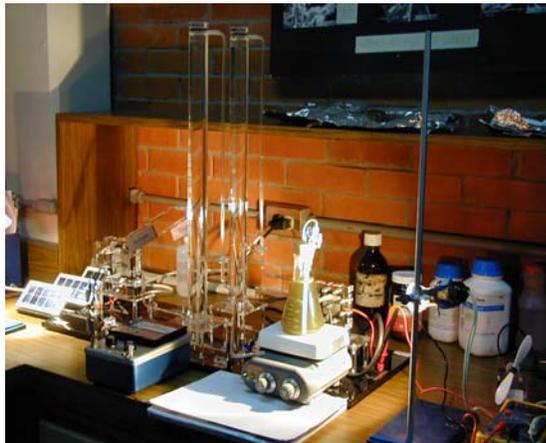


Figura 2.8. Módulo electrolizador-PEMFC

# CAPÍTULO III

### **3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

#### **3.1 Selección de los microorganismos fotosintéticos para la producción de hidrógeno**

Luego de realizar el estudio bibliográfico correspondiente (Ver Capítulo I) y de acuerdo con los resultados obtenidos en el escalado a mayores volúmenes de las cepas cultivadas y teniendo en cuenta las posibilidades de éxito, en cuanto al escalado del cultivo de los microorganismos hasta volúmenes de 10 a 20 L, escogimos a las cepas de *Scenedesmus obliquus* 393 y *Spirulina maxima* 2342, para realizar algunos estudios de obtención de hidrógeno e introducción de éste en una Celda de combustible tipo PEM (PEMFC) para ver si era posible la generación de corriente eléctrica en la misma.

##### **3.1.1 Determinación del hidrógeno usado por una PEMFC (*Scenedesmus obliquus* 393)**

Para determinar el hidrógeno usado por una PEMFC, a la que se le suministra gas generado por el microorganismo fotosintético *Scenedesmus obliquus* 393, se somete biomasa del mismo cultivado en condiciones autotróficas, a un proceso de anaerobiosis-oscuridad y luego se acopla el bioreactor a la celda suministrando el gas producido, para monitorear la corriente eléctrica generada  $I$  (mA) en el tiempo. Con la  $I$  (mA) se determina el hidrógeno usado por la PEMFC y además se introducen muestras en un cromatógrafo de gases con Detector de Conductividad Térmica (TCD) para la detección del hidrógeno generado.

#### **Materiales y Métodos**

##### *Cultivo de microorganismos*

A partir del microorganismo fotosintético *Scenedesmus obliquus* 393 se obtienen 15 L de biomasa algal autotróficamente en un bioreactor, con iluminación (4 lámparas de 39 W) y burbujeo de aire. Se tomaron las muestras de cultivo para los experimentos en una determinada etapa de crecimiento celular y se ajusta la concentración por densidad óptica (DO) a  $\lambda$  de 750 nm, para garantizar que las características de la biomasa para cada experimento resultara lo más similar posible. Se emplean 260 mL de biomasa algal y se añade D-Glucosa (1 %) y se somete el cultivo a agitación-oscuridad durante 40 horas.

A la biomasa algal se le determinó DO a  $\lambda$  750 nm, peso seco (g/L), pH y clorofila Total (mg), por el método espectrofotométrico y las ecuaciones de Arnon, aspectos descritos en el epígrafe 2.3.3.

#### *Proceso de anaerobiosis-oscuridad y reacción de fotosíntesis*

El cultivo se somete a un proceso de anaerobiosis y oscuridad, haciéndole pasar un pequeño flujo de nitrógeno para eliminar el oxígeno disuelto durante 1 hora.

Luego se acopla el bioreactor a la PEMFC que se encuentra acoplada a un multímetro y éste a una PC, para monitorear la corriente en (mA).

#### *Instalación experimental*

La instalación experimental empleada, consta del módulo electrolizador-PEMFC, descrito en el epígrafe 2.4.3. Además se emplearon los siguientes instrumentos:

1. Luxímetro LI-COR. MODEL LI-185. (Análogo, con exactitud 3% y resolución de 0.3 mm)
2. Multímetro Profesional con interface para PC. MUL-500. STEREN. (Digital; Rango 4 mA, Resolución 1 $\mu$ A, Precisión  $\pm$ 1.2% de rdg  $\pm$ 3d)

Para el experimento se fija la intensidad luminosa en 150  $\mu$ E/m<sup>2</sup> y se mantiene el cultivo en agitación. Se realizaron 4 réplicas del experimento, monitoreando la corriente eléctrica generada (I) en mA por la PEMFC, durante 200 minutos con iluminación y agitación, mediante un multímetro, éste a su vez se encuentra acoplado a una PC, que permite el almacenamiento, registro y procesamiento de datos. Se empleó el software Masview 1.1. Se calculó por medio de la Ecuación (3.1) (Larminie y Dicks, 2000), el hidrógeno usado por la celda para su funcionamiento, para la I (mA) promedio obtenida para los experimentos.

$$\text{H}_2 \text{ usado} = 1.05 \times 10^{-8} \cdot I \text{ (kg /s )} \quad (3.1)$$

Donde I es la corriente eléctrica generada en (A).

Los resultados pueden ser transformados a unidades de volumen usando la densidad del hidrógeno, la cual es 0.084 kg/m<sup>3</sup> a TPN.

$$H_2 \text{ usado (m}^3\text{/s)} = H_2 \text{ usado (kg /s ) / 0.084 (kg/ m}^3\text{)} \quad (3.2)$$

Se toman muestras de gas del flujo que entra a la PEMFC y se introducen en un cromatógrafo de gases con Detector de Conductividad Térmica (TCD), con las características que se mencionan a continuación para detectar el gas generado por el microorganismo *Scenedesmus obliquus*.

Características del TCD empleado:

- Tipo de columna: capilar Molsieve-SAPLOT de 30m x 0.53mm Di.
- Gas "carrier": Argón grado cromatográfico: 99.998 % de pureza. INFRA
- Temperatura del Horno: 33 °C.
- Temperatura base: 100 °C.

## Resultados y Discusión

Estudiamos la producción de hidrógeno en un cultivo de *Scenedesmus obliquus*, al cual se le añade D-glucosa (1%) y se somete a un proceso fermentativo antes del de anaerobiosis-oscuridad, previo a la fotoproducción de gas hidrógeno. Se ha estudiado el efecto de la adición de glucosa antes de la adaptación anaeróbica por otros autores, reportándose que cantidades suficientes de glucosa, añadidas desde el exterior a las células del alga, les suministra energía por vía fermentativa en la oscuridad y podría regularse la fotosíntesis e incrementar la producción de hidrógeno (Wunschiers y Lindblad, 2002 ; Oh et al., 2003).

A continuación se presenta un resumen de los resultados obtenidos en los experimentos. En la Tabla 3.1 se muestra la caracterización de la biomasa de *Scenedesmus obliquus* 393, empleada en los experimentos.

Tabla 3.1 Características de la biomasa de *Scenedesmus obliquus* 393

Características de la biomasa	<i>Scenedesmus obliquus</i>
Biomasa seca (g)	1.0 ± 0.1
Clorofila Total (mg)	4.1 ± 0.3
pH	8.5 ± 0.3
Clorofila Total (mg)/biomasa (g)	4.1 ± 0.5

La relación de mg de Clorofila/g de biomasa se encuentra dentro de los parámetros reportados para microorganismos fotosintéticos (entre 3 y 10) (Oswald, 1977), lo cual constituye un índice de calidad de la biomasa de estos microorganismos.

Se monitoreó la I (mA) con iluminación y agitación al bioreactor durante 200 minutos. Se graficó la corriente eléctrica promedio I (mA) vs Tiempo (min). Para todos los experimentos fue prácticamente el mismo comportamiento.

En la Figura 3.2, se presenta el promedio de la corriente eléctrica (I) en mA, generada para los experimentos durante el tiempo de monitoreo. La I máxima que fue alcanzada (mA), en los experimentos realizados fue de 0.035 mA y la promedio fue de 0.025 mA.

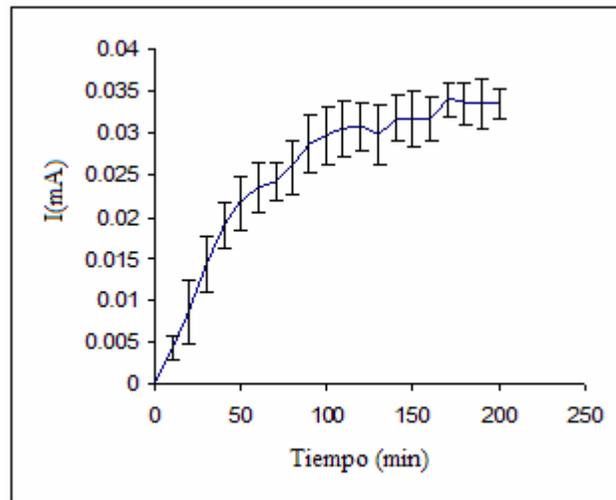


Figura 3.2 Curva de I promedio (mA) vs tiempo de monitoreo (min) para *Scenedesmus obliquus*

393

En la Figura 3.3 se muestra el ajuste experimental de la curva de las I promedio durante el tiempo de monitoreo.

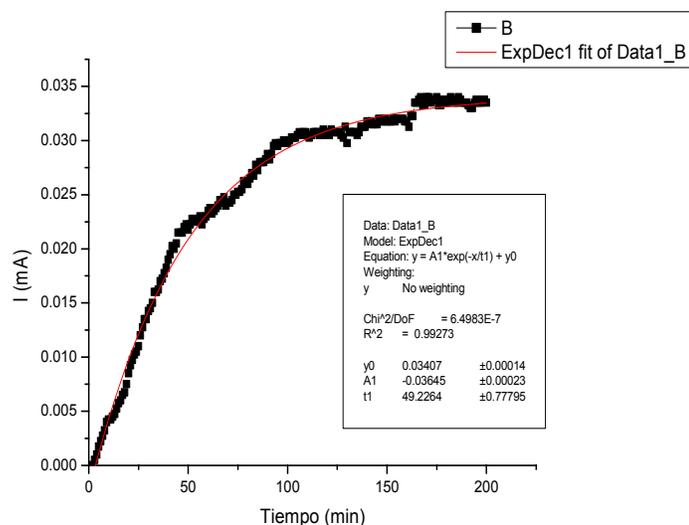


Figura 3.3 Ajuste experimental de la curva de I (mA) vs tiempo de monitoreo (min) para *Scenedesmus obliquus* 393

En las gráficas anteriores se observa, el incremento de la corriente eléctrica generada, I (mA), a medida que aumenta el tiempo de monitoreo y que a partir de los 170 minutos ya se mantiene constante la corriente eléctrica generada.

En la Tabla 3.2, se muestran algunos resultados finales obtenidos a partir de la corriente promedio alcanzada durante los 200 minutos de experimentación: los valores máximos de corriente eléctrica, el flujo de hidrógeno usado por la celda combustible, así como la relación entre corriente eléctrica y la biomasa seca final de *Scenedesmus obliquus* 393.

Tabla 3.2 Resultados finales del monitoreo de la I (mA) vs T (min)

	<i>Scenedesmus obliquus</i>
I Promedio (mA)	0.025 ± 0.001
H <sub>2</sub> usado por la PEM FC x 10 <sup>-14</sup> (kg/s)	26
H <sub>2</sub> usado por la PEM FC x 10 <sup>-14</sup> (m <sup>3</sup> /s)	310
mA/mg de biomasa seca final x 10 <sup>-6</sup>	25

Con los resultados obtenidos puede observarse la posibilidad de generación de corriente eléctrica suministrándole a la PEMFC, hidrógeno generado a partir de un proceso en dos etapas (Ver epígrafe 1.2.3)

En el transcurso del proceso de monitoreo de I (mA) durante el tiempo de experimentación, fueron inyectadas muestras del gas generado por *Scenedesmus obliquus*, a un cromatógrafo de gases con detector de conductividad térmica, pudiendo detectar cualitativamente el hidrógeno, que eluye en un tiempo de 1.62 min, previamente se realizaron inyecciones de hidrógeno puro, detectándose en tiempos de de 1.61 y 1.62 min, además se inyectó aire para la detección de oxígeno y nitrógeno. Se muestra a modo de ejemplo en la Figura 3.4 un cromatograma de una de las inyecciones, realizadas al cromatógrafo, del gas producido por este microorganismo fotosintético, en el que aparecen las respuestas (tiempo de retención) en forma de picos. Los valores de los tiempos de retención se encuentran: para el hidrógeno (1.61-1.63), oxígeno (2.78-2.80) y nitrógeno (5.46-5.56) presentes en la muestra.

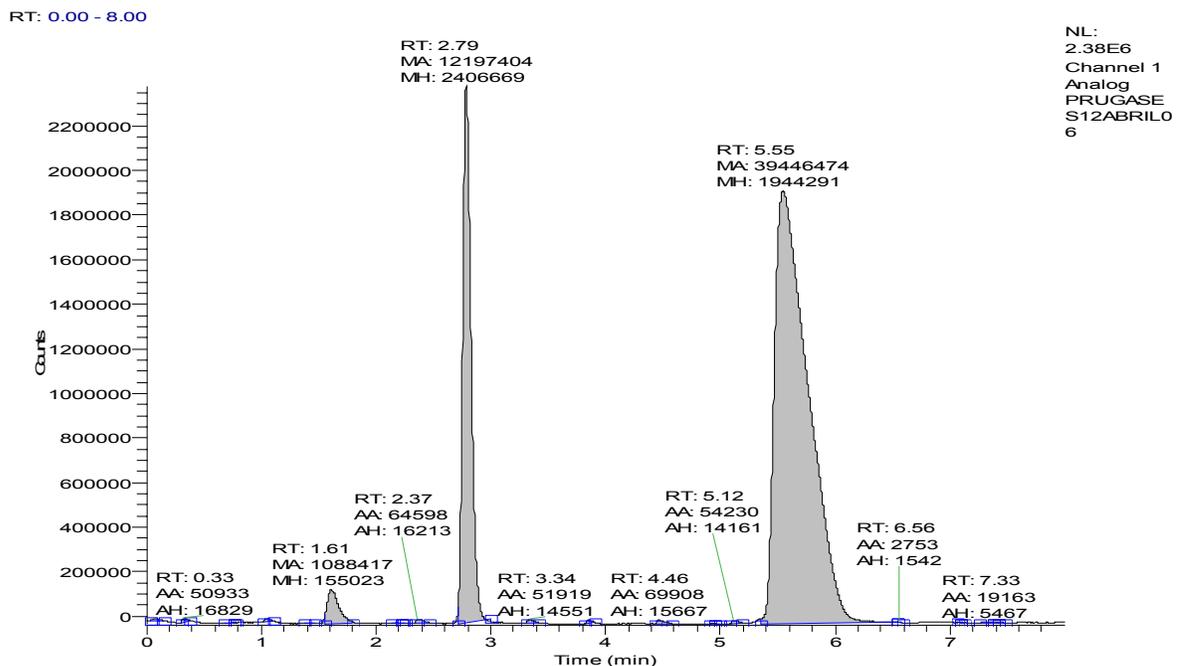


Figura 3.4 Cromatograma de ejemplo de uno de los experimentos de producción de hidrógeno con *Scenedesmus obliquus*.

### 3.1.1.1 Conclusiones

1. *Scenedesmus obliquus* 393 es capaz de producir hidrógeno, bajo las condiciones experimentales establecidas, añadiendo D-glucosa antes del proceso de anaerobiosis-oscuridad.
2. El hidrógeno producido puede ser introducido en una celda de combustible tipo PEM, siendo usado por la misma  $26 \times 10^{-14}$  (kg/s).
3. La mayor I máx obtenida fue de 0.035 mA y la I promedio fue de 0.025 mA, en 200 minutos de monitoreo.
4. La relación I promedio (mA)/mg de biomasa fue de  $25 \times 10^{-6}$ .
5. El gas hidrógeno fue detectado en un Cromatógrafo de Gases con TCD, eluyendo en un tiempo de 1.62, para las condiciones experimentales establecidas, lo cual fue corroborado con la inyección de gas hidrógeno puro.

### 3.1.2 Determinación del hidrógeno usado por una PEMFC (*Spirulina maxima* 2342)

Para determinar el hidrógeno usado por una PEMFC, a la que se le suministra gas generado a partir de un cultivo de *Spirulina maxima* 2342, crecido en condiciones autotróficas, se monitorea la corriente eléctrica generada (mA) por la celda en el tiempo, luego de aplicarle al cultivo un proceso de anaerobiosis-oscuridad. Con la I (mA) se determina el hidrógeno usado por la PEMFC.

## Materiales y Métodos

### *Cultivo de microorganismos*

Fue cultivada hasta 10 L de *Spirulina maxima* 2342 autotróficamente en un bioreactor, con iluminación (4 lámparas de 39 W) y burbujeo de aire. El medio de cultivo empleado fue Medio Completo SOT (Ogawa y Terui, 1970), descrito en el epígrafe 2.2.2.

El cultivo se mantuvo en etapa de crecimiento de hasta 32 días y fueron empleados 250 mL de biomasa. A la biomasa algal se le determinó densidad óptica a  $\lambda$  de 750 nm, peso seco (g/L), pH y clorofila a (mg) por el método espectrofotométrico y las ecuaciones de Arnon, 1949, descritas en el epígrafe 2.3.

### *Proceso de anaerobiosis-oscuridad y reacción de fotosíntesis*

Los 250 mL de cultivo se someten a un proceso de anaerobiosis y oscuridad, haciéndole pasar un pequeño flujo de nitrógeno para eliminar el oxígeno disuelto en el cultivo, lo cual fue monitoreado con un electrodo de oxígeno. El tiempo fue de 50 minutos. A continuación se mantiene el cultivo en agitación y en presencia de luz durante 4 horas, (intensidad luminosa de  $150 \mu\text{E}/\text{m}^2$ ), se induce la reacción de fotosíntesis y la activación de la enzima hidrogenasa. Se acopló el bioreactor a una celda de combustible tipo PEM y se permite el paso del flujo de gas hidrógeno producido, para el monitoreo de la corriente eléctrica generada, además se monitoreó el oxígeno producido simultáneamente.

### *Instalación experimental*

La instalación experimental empleada consta del módulo electrolizador-PEMFC, descrito en el epígrafe 2.4.3. Además se emplearon los siguientes instrumentos:

1. Electrodo de oxígeno OM-4. MICROELECTRODES, Inc.
2. Luxímetro LI-COR. MODEL LI-185.
3. Multímetro Profesional con interfase para PC. MUL-500. STEREN.

Se realizaron 3 réplicas de experimento y la corriente eléctrica producida para los diferentes casos, es monitoreada por un multímetro acoplado a una PC, que permite el almacenamiento, registro y procesamiento de datos. Se empleó el software Masview 1.1. Luego se calculó por medio de la Ecuación (3.1) (Larminie y Dicks, 2000), el hidrógeno usado por la celda para su funcionamiento.

## **Resultados y Discusión**

A continuación presentamos un resumen de los resultados obtenidos en los experimentos. En la Tabla 3.2 se presentan los resultados promedios finales de la caracterización de la biomasa de *Spirulina maxima* 2342 empleada en los experimentos.

Tabla 3.2 Características de la biomasa *Spirulina maxima* 2342

Características de la biomasa	<i>Spirulina maxima</i>
Biomasa seca (g)	0.24 ± 0.01
pH	10.36 ± 0.04
Clorofila a (mg)	2.2 ± 0.1
Clorofila a (mg)/g de biomasa	9.2 ± 0.6

La relación de mg de Clorofila/g de biomasa se encuentra dentro de los parámetros reportados para microorganismos fotosintéticos (entre 3 y 10) (Oswald, 1977), lo cual constituye un índice de calidad de la biomasa de estos microorganismos.

En todos los experimentos se graficó la corriente eléctrica (mA) y la producción de oxígeno (%), en función del tiempo. Todas las mediciones realizadas presentan un comportamiento similar. En la Figura 3.6 se muestra el promedio de las I (mA) y % de oxígeno en el tiempo de experimentación (min).

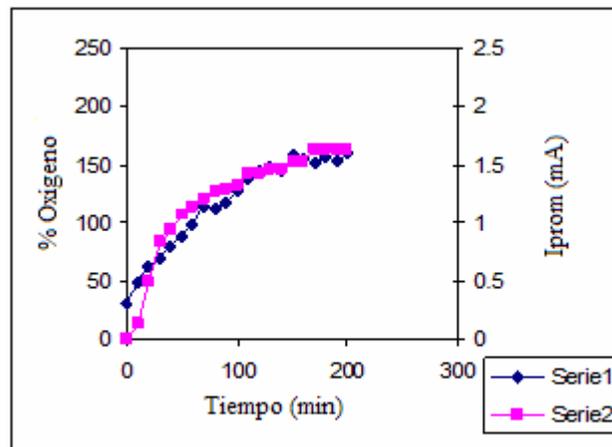


Figura 3.6 Promedio de % de oxígeno e I(mA) vs tiempo (min)

Se observa que bajo condiciones de iluminación (intensidad luminosa de 150  $\mu\text{E}/\text{m}^2$ ), se produce oxígeno simultáneamente a la generación de corriente eléctrica en el tiempo, luego del proceso de anaerobiosis-oscuridad, observando que ambos aumentan en el tiempo. Se conoce que el oxígeno inhibe la acción de la enzima hidrogenasa en el tiempo. (Wünschiers y Lindblad, 2002). Esta enzima es la responsable de la producción de hidrógeno, pero durante el tiempo de monitoreo no se llega a inhibir el proceso, pues al generarse corriente eléctrica en la PEMFC, quiere decir que

se está generando hidrógeno a partir del microorganismo *Spirulina maxima* 2342. En la Tabla 3.3 se presentan los resultados finales promedios obtenidos.

Tabla 3.3 Resultados finales del monitoreo de I (mA) vs tiempo (min)

	<i>Spirulina maxima</i>
I Promedio (mA)	1.2 ± 0.5
% Oxígeno	117 ± 40
H <sub>2</sub> usado por la PEM FC x 10 <sup>-12</sup> (kg/s)	126
H <sub>2</sub> usado por la PEM FC x 10 <sup>-12</sup> (m <sup>3</sup> /s)	1500
mA/mg de biomasa seca final x 10 <sup>-3</sup>	5

### 3.1.2.1 Conclusiones

1. *Spirulina maxima* 2342 es capaz de producir hidrógeno bajo las condiciones experimentales establecidas.
2. El hidrógeno producido puede ser introducido en una celda de combustible tipo PEM para producir corriente eléctrica, siendo usado por la misma 126 x 10<sup>-12</sup> (kg/s).
3. La relación I promedio (mA)/mg de biomasa fue de 5 x 10<sup>-3</sup>.
4. El oxígeno generado durante la fotosíntesis (iluminación y agitación luego de anaerobiosis-oscuridad), no inhibe el comportamiento del cultivo para la producción de hidrógeno, durante las horas de monitoreo del experimento.

### 3.1.3 Conclusiones de los epígrafes 3.1.1 y 3.1.2

En la Tabla 3.4, se presentan algunos parámetros que nos permiten comparar los resultados principales obtenidos, del hidrógeno usado por la PEMFC, para el caso de gas generado por *Scenedesmus obliquus* 393 y para *Spirulina maxima* 2342.

Tabla 3.4 Principales parámetros de los resultados finales

	<i>Scenedesmus obliquus</i>	<i>Spirulina maxima</i>
Biomasa seca (g)	1.0 ± 0.1	0.24 ± 0.01
I Promedio (mA)	0.025 ± 0.001	1.2 ± 0.5
H <sub>2</sub> usado por la PEM FC (m <sup>3</sup> /s)	26 x 10 <sup>-14</sup>	126 x 10 <sup>-12</sup>
mA/mg de biomasa seca final	25 x 10 <sup>-6</sup>	5 x 10 <sup>-3</sup>

Como podemos observar en la Tabla 3.4, los mejores resultados se obtienen para el caso del microorganismo *Spirulina maxima*. Se obtiene una mayor relación de mA/mg de biomasa seca, lo que infiere que se obtendrían mejores resultados futuros. La PEMFC alimentada con hidrógeno producido a partir de *Spirulina*, puede generar una mayor cantidad de energía eléctrica por unidad de masa, lo cual necesitaría menor volumen de cultivo en el caso de *Spirulina* para el funcionamiento de la misma.

También se pueden alcanzar mayores concentraciones de biomasa de *Spirulina* en menor tiempo en comparación con *Scenedesmus*, es decir *Spirulina* se reproduce en menor tiempo, además ésta es menos vulnerable a la sepsis por sus altos valores de pH en el medio de cultivo.

De acuerdo a las condiciones reales de equipamiento e instrumentación disponible en esos momentos, se decidió seleccionar finalmente la cepa de *Spirulina maxima* 2342 para el escalado (sin descuidar las demás cepas y realizando las correspondientes resiembras en el tiempo necesario). Se consideró además, que era una de las cepas menos estudiadas hasta el momento, fácil de cultivar y resistente a la contaminación con otros microorganismos, con ella se podría experimentar con el objetivo de obtener resultados interesantes y posibilidades futuras de aislar la enzima, lo cual aun no ha sido reportada en la literatura internacional.

*Spirulina* constituye una cepa importante, de la que puede obtenerse biomasa para alimentación tanto animal como humana, extractos de bioproductos importantes en la rama químico-farmacéutica, se emplea también en el tratamiento y descontaminación de aguas residuales, aspectos que podían ser considerados y nos permitirían proponer en un futuro, sistemas integrales donde pueda obtenerse energía (hidrógeno) y además emplear la biomasa en alguno de los usos anteriormente mencionados, lo cual sería una posibilidad práctica futura con ventajas económicas y ambientales. Se escaló con éxito dicha cepa hasta volúmenes suficientes y se mantuvo en condición unialgal para realizar las réplicas de los experimentos.

### **3.2 Cinética de crecimiento para *Spirulina maxima* 2342**

Se realizó un estudio de cinética de crecimiento para *Spirulina maxima* 2342, durante 1 mes, repitiendo el experimento 3 veces para seguir el comportamiento de la biomasa (g/L) y el pH del

medio de cultivo hasta llegar a la fase de crecimiento celular, en donde ya la biomasa tenía concentraciones suficientes para realizar los experimentos y luego reinocular en medio de cultivo nuevo, para volver a incrementar la concentración y mantener la cepa constantemente regenerándose sin llegar a la etapa de muerte celular.

## **Materiales y métodos**

### *Cultivo de microorganismos*

El cultivo inoculado en cada experimento es equivalente a 1 litro de cultivo de *Spirulina maxima* 2342 en 10 litros de medio de cultivo SOT, tiene una composición que se describe en el epígrafe 2.2.2 y la instalación experimental empleada se describe en el epígrafe 2.4.1. Se tomaron muestras del cultivo y se determinó DO a  $\lambda$  750 nm, peso seco de la biomasa (g/L) y pH (técnicas analíticas descritas en el epígrafe 2.3).

## **Resultados y Discusión**

Se muestran los resultados finales promedios de 3 experimentos realizados en diferentes momentos, pues cada uno requería aproximadamente 1 mes para el seguimiento. En la Figura 3.7 se presentan los resultados promedios del aumento de la concentración progresiva de la biomasa en el tiempo, observado desde su inoculación en medio de cultivo nuevo hasta que al cabo de 31 días según el promedio calculado que empieza a disminuir su concentración, es decir que empieza a haber déficit de nutrientes en el medio que impiden su desarrollo normal.

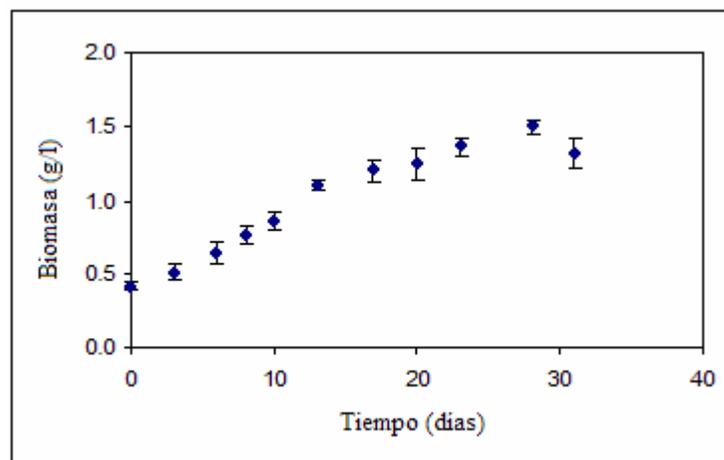


Figura 3.7 Crecimiento de la biomasa de *Spirulina maxima* 2342 en el tiempo (días)

En la Figura 3.8 se grafica el comportamiento del pH desde la inoculación, observándose que el mismo se mantiene dentro de los parámetros óptimos, para el caso del género *Spirulina*, entre 8 y 11 (Richmond, 1986).

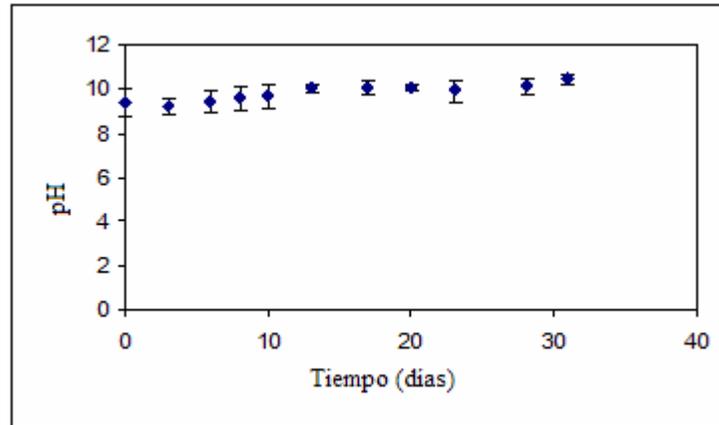


Figura 3.8 Variación del pH en el cultivo desde su inoculación

En la Figura 3.9 se grafica la variación promedio de los 3 experimentos de la concentración de biomasa (g/L) y la densidad óptica DO a  $\lambda$  750 nm, encontrando una relación lineal entre ambas variables, que puede servir en un momento determinado, en que no se cuente con el equipamiento necesario o por razones de tiempo o en estudios de campo, para la obtención del dato o los datos de concentración celular del cultivo en biomasa seca (g/L).

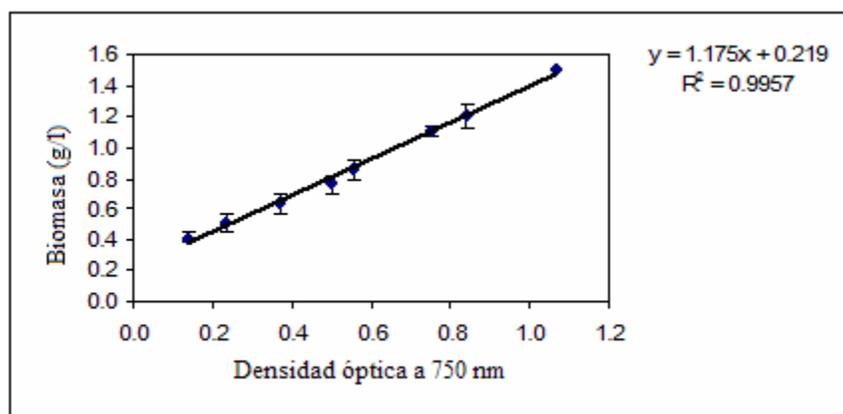


Figura 3.9 Variación de la concentración de la biomasa en densidad óptica medida a  $\lambda$  750 nm vs biomasa seca (g/L) para *Spirulina maxima* 2342 con datos promedio de 1 mes de seguimiento para cada experimento

### **3.2.1 Conclusiones**

Se obtuvo una ecuación de regresión lineal, que permite en un momento determinado, con los datos de densidad óptica DO a  $\lambda$  750 nm, medidos al tomar una muestra del cultivo de *Spirulina maxima*, calcular rápidamente la concentración de biomasa en g/L y tomar decisiones de su uso o posibilidades del experimento a realizar.

### **3.3 Detección del hidrógeno generado (*Spirulina maxima* 2342)**

Se realizan algunos experimentos preliminares introduciendo las muestras de gas generado por *Spirulina maxima* 2342 a un espectrómetro de masas acoplado a una PC y se detecta cualitativamente el hidrógeno, así como algunas impurezas (O<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O, N<sub>2</sub>). No fue posible la detección cuantitativa del hidrógeno por algunos problemas técnicos con el equipo y falta de gases estándares para realizar curvas de calibración. Luego se realizan otros experimentos para introducir las muestras de gas a un cromatógrafo de gases con detector de conductividad térmica pudiendo detectar cuantitativamente el hidrógeno generado por los microorganismos fotosintéticos.

#### **3.3.1 Empleando espectrometría de masas**

Para diferentes casos experimentales se realizaron experimentos con el objetivo de ver la posibilidad de detectar de forma cualitativa el hidrógeno generado por *Spirulina maxima* 2342, luego de un proceso de anaerobiosis-oscuridad. El bioreactor es acoplado a un espectrómetro de masas DYCOR, que trabaja a presiones menores de  $10^{-4}$  (Torr), éste a su vez se encuentra conectado a una PC y mediante el Programa Dycor 2000, se pueden adquirir datos de presión total del sistema y presiones parciales de los gases que son introducidos al equipo (Blancas, 2001).

#### **Materiales y Métodos**

Las condiciones de cultivo, el volumen y los análisis realizados a la biomasa inicial fueron las mismas que para el experimento descrito en el epígrafe 3.1.2.1. La concentración de biomasa para los experimentos se ajustó por densidad óptica a  $\lambda$  750 nm, para que las características de la biomasa para cada experimento resultara lo más similar posible.

Se estudiaron 3 casos para las mismas características de la biomasa:

Caso 1. Sin adición de ditionita de sodio 0 (g)

Caso 2. Con adición de ditionita de sodio 1 (g).

Caso 3. Con adición de ditionita de sodio 2 (g).

La ditionita de sodio: ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ ) es un agente reductor que se usa para inhibir el oxígeno generado en el proceso.

#### *Proceso de anaerobiosis-oscuridad y reacción de fotosíntesis*

El tiempo de anaerobiosis-oscuridad se fijó para todos los experimentos en 50 minutos. Luego se añade según el caso ditionita de sodio [0, 1 y 2 (g)] y se acopla el bioreactor al espectrómetro de masas. Tomamos una primera muestra sin iluminación y luego cada 20 minutos se toma una muestra del gas. El tiempo de fotosíntesis-agitación se fijó en 2 horas para cada experimento. El volumen de muestra de gas fue de 20 mL, a temperaturas de  $30 \pm 1^\circ\text{C}$  y presión atmosférica.

#### *Instalación experimental*

En la Figura 3.10 se observa el bioreactor iluminado con una lámpara de 100 W, acoplado al espectrómetro de masas DYCOR, que se encuentra conectado a la PC. La intensidad luminosa para todos los experimentos fue fijada en  $150 \mu\text{E}/\text{m}^2 \text{ s}$ .

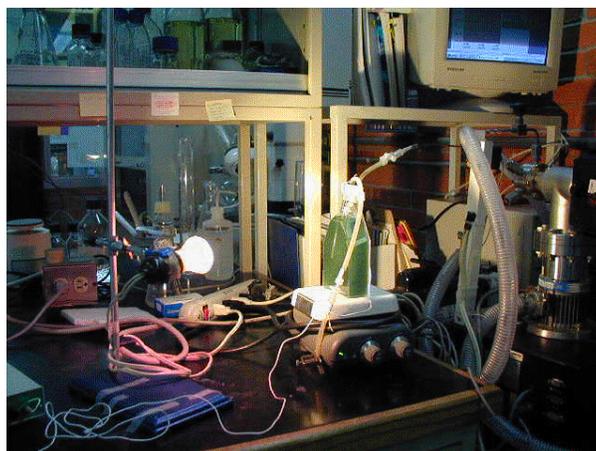


Figura 3.10 Instalación experimental

## Resultados y Discusión

Las características de la biomasa fueron las mismas que para el experimento descrito en el epígrafe 3.1.2.1. (Ver Tabla 3.2). Con los datos de presión total y presiones parciales de los gases generados monitoreados (Torr) se calculan las fracciones de los gases en la mezcla y luego el volumen de los mismos ( $\mu\text{L}$ ). Se presentan a continuación en las Figuras 3.11 y 3.12 los resultados promedios del volumen de hidrógeno y oxígeno producidos en el tiempo.

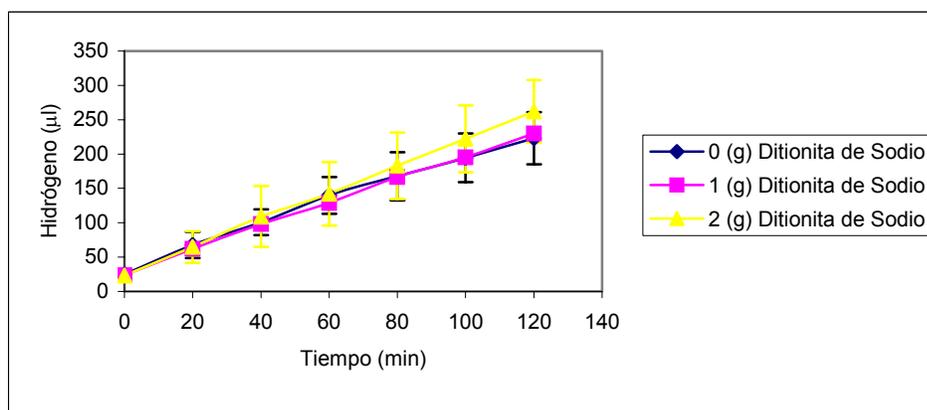


Figura 3.11 Producción de hidrógeno ( $\mu\text{L}$ ) vs Tiempo (min). T ( $30 \pm 1^\circ\text{C}$ ). P (ATM)

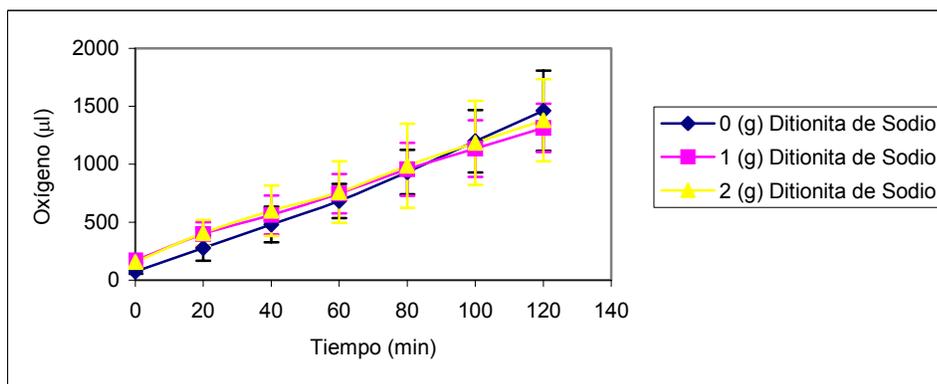


Figura 3.12 Producción de oxígeno ( $\mu\text{L}$ ) vs Tiempo (min). T ( $30 \pm 1^\circ\text{C}$ ). P (ATM)

Se puede observar que para el caso de la producción de hidrógeno, ésta se ve favorecida con la inclusión de ditionita de sodio (2g), ya que tiende a aumentar el volumen de gas producido en el tiempo, en relación a los demás casos.

En el caso de la producción de oxígeno, se observa que éste se produce simultáneamente con el hidrógeno, tiene un comportamiento muy similar, aumentando también en el tiempo y disminuye el volumen al incluirse ditionita de sodio. En este caso la producción de oxígeno, no inhibe a la producción de hidrógeno en el tiempo en el que se realizan los experimentos, aunque se conoce que su generación llega a perjudicar en el tiempo la producción de hidrógeno, ya que inhibe el comportamiento de la enzima hidrogenasa. (Wünschiers y Lindblad, 2002)

### **3.3.1.1 Conclusiones**

1. Los gases producidos por *Spirulina maxima* luego de la anaerobiosis-oscuridad, del cultivo, pueden ser monitoreados en un espectrómetro de masas acoplado al bioreactor, tomando muestras puntuales, durante el tiempo de experimentación.
2. La inclusión de ditionita de sodio en el cultivo, aumenta los volúmenes de hidrógeno y disminuye el de oxígeno en el tiempo.
3. Se obtiene como máximo volumen de hidrógeno en los 120 minutos, de experimentos 262 microlitros cuando se añaden 2 g de ditionita de sodio.

### **3.3.2 Empleando cromatografía de gases con TCD**

Se realiza la detección y cuantificación del hidrógeno, producido por *Spirulina maxima* 2342, empleando un cromatógrafo de gases con detector de conductividad térmica (CG-TCD), con dos casos experimentales: inyectando gas de calibración estándar en el CG-TCD a presiones de inyección entre 0 y 40 mm Hg y a presiones entre 0 y 10 mm Hg.

#### **3.3.2.1 Inyectando gas de calibración estándar (entre 0 y 40 mm Hg)**

Se detectó el hidrógeno generado por *Spirulina maxima* 2342 para la misma característica de la biomasa (concentración) e intensidad luminosa de  $150 \mu\text{E}/\text{m}^2.\text{s}$ , mediante un procedimiento que disminuye la presencia de oxígeno en el proceso (el oxígeno inhibe a la enzima hidrogenasa) y que no ocasiona daños irreparables a las células de microorganismos. Se realizaron curvas de calibración con mezcla de gas estándar que contiene hidrógeno y el hidrógeno en las muestras de cultivo fue detectado en un tiempo de retención de  $1.45 \pm 0.01$  minutos. El tiempo de reacción de fotoproducción fue de  $19.3 \pm 1.2$  h.

## **Materiales y Métodos**

### *Cultivo de microorganismos*

Los experimentos fueron realizados con *Spirulina maxima* (cepa UTEX-2342), cultivada en un volumen de 20 litros autotróficamente con iluminación de 4 lámparas de 39 W c/u y burbujeo de aire. El medio de cultivo empleado fue Medio Completo SOT (Ogawa y Terui, 1970). Se tomaron las muestras de cultivo en una determinada etapa de crecimiento celular y se ajustó la concentración (previamente fijada para los experimentos) por densidad óptica (DO) a 750 nm. Para cada réplica a la que se realizan las mediciones fueron empleados 250 mL de biomasa.

### *Instalación experimental*

Se añaden 250 mL de cultivo a cada bioreactor, luego se someten a un proceso de anaerobiosis y oscuridad haciéndole pasar un flujo de argón [Ar (g), de calidad industrial] de  $3 \pm 0.1$  mL/s, para eliminar el oxígeno disuelto durante 1 h, a continuación se añaden 2 g de ditionita de sodio y se continúa la agitación-anaerobiosis por 5 minutos. Luego se hace vacío al bioreactor durante 5 minutos de tiempo total a intervalos de 1 minuto de vacío y 3 segundos de agitación, para eliminar oxígeno en el cultivo, que inhibe a la enzima hidrogenasa y a continuación se induce el proceso de fotoproducción de gas hidrógeno, sometiendo el cultivo a un proceso de agitación-iluminación, con una lámpara de 100 W, fijando la intensidad luminosa en  $150 \mu\text{E}/\text{m}^2 \cdot \text{s}$ . El tiempo de reacción fue de  $19.3 \pm 1.2$  h. En la Figura 3.13 aparece la instalación utilizada para realizar la etapa de generación de hidrógeno con iluminación luego de la anaerobiosis. Se realizaron 3 experimentos con 2 réplicas cada uno.



Figura 3.13 Instalación experimental

Luego se procede a conectar el bioreactor al cromatógrafo de gases con TDC, para detectar el hidrógeno producido, cuyas características se describen en el epígrafe 2.4.2 y las Figuras 2.6 y 2.7.

## Resultados y Discusión

A continuación presentamos un resumen de los resultados obtenidos en los experimentos. En la Tabla 3.5 se muestran los resultados finales de la caracterización de la biomasa de *Spirulina maxima* 2342 empleada en los experimentos.

Tabla 3.5 Características de la biomasa de *Spirulina maxima* 2342

Características de la biomasa	<i>Spirulina maxima</i>
Biomasa seca (g )	0.34 ± 0.02
pH	10.19 ± 0.05
Clorofila a (mg)	2.5 ± 0.3
Clorofila a (mg)/biomasa (g)	7 ± 1

La relación de mg de Clorofila/g de biomasa se encuentra dentro de los parámetros reportados para microorganismos fotosintéticos (entre 3 y 10) (Oswald, 1977), lo cual constituye un índice de calidad de la biomasa de estos microorganismos.

Se realizaron curvas de calibración con mezcla de gas estándar PRAXAIR (% en mol/mol) con un 5 % de He, 10 % de H<sub>2</sub>, 10 % de Ar, 45 % de N<sub>2</sub> y 30 % de CH<sub>4</sub>, a diferentes presiones de inyección total: 2, 5, 10, 20 y 40 mm de Hg, antes de realizar la inyección de las muestras con el cultivo de microorganismos. En las Figuras 3.14, 3.15 y 3.16, aparecen las curvas de calibración para cada experimento, a las presiones parciales de hidrógeno. La respuesta se refiere al Área bajo la curva.

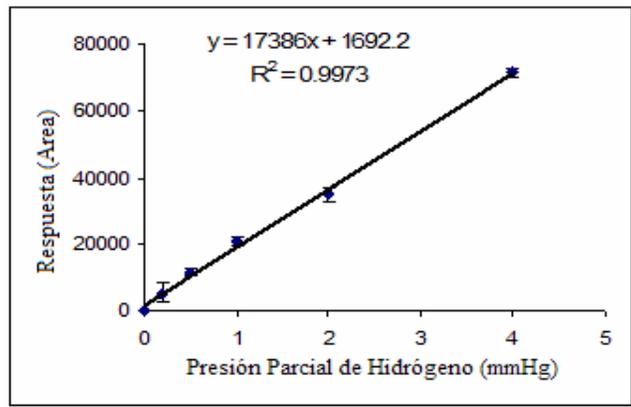


Figura 3.14 Curva de calibración para el experimento 1

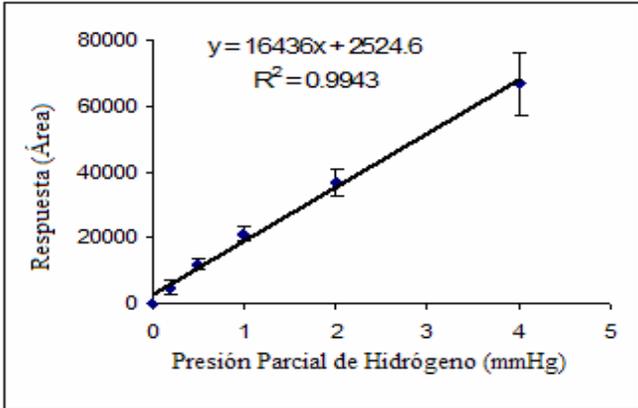


Figura 3.15 Curva de calibración para el experimento 2

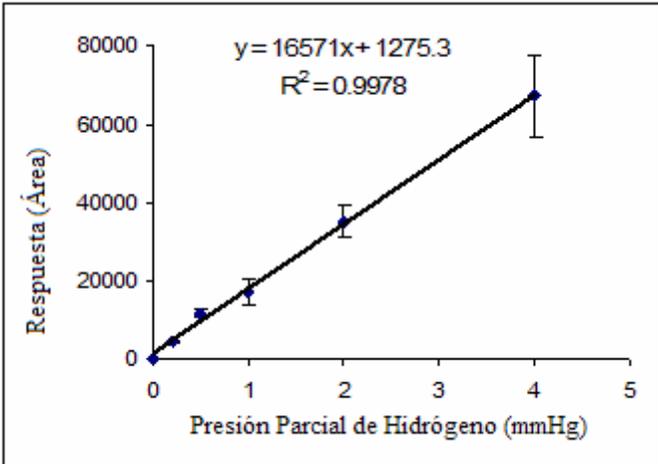


Figura 3.16 Curva de calibración para el experimento 3

Estas curvas de calibración son empleadas para cuando se introducen la muestras con gas generado por los cultivos de *Spirulina maxima*, determinar el flujo de hidrógeno generado biológicamente y se describirá más adelante la metodología empleada. Para el caso del hidrógeno presentamos en la Tabla 3.6 los resultados promedios finales obtenidos.

Tabla 3.6 Resumen de las detecciones de hidrógeno para diferentes presiones de inyección total (mm de Hg) en el gas estándar

Presión de inyección total (mm Hg)	Presión de inyección parcial (mm Hg)	Tiempo de retención (min)	Área bajo la curva
2	0.2	1.46 ± 0.01	4827 ± 469
5	0.5	1.45 ± 0.01	11766 ± 236
10	1	1.45 ± 0.01	17079 ± 2177
20	2	1.45 ± 0.00	35657 ± 1133
40	4	1.45 ± 0.01	68533 ± 2597

A continuación presentamos algunos cromatogramas (Figuras 3.17 a 3.21) correspondientes a las diferentes inyecciones parciales de hidrógeno en el gas estándar para el Experimento 3.

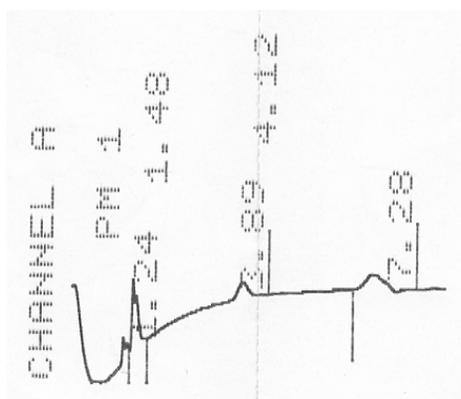


Figura 3.17 Cromatograma correspondiente a la inyección de hidrógeno en el gas estándar a presión de inyección de 2 mm Hg. (Experimento 3)

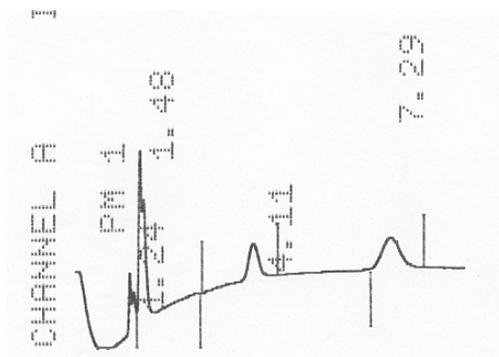


Figura 3.18 Cromatograma correspondiente a la inyección de hidrógeno en el gas estándar a presión de inyección de 5 mm Hg. (Experimento 3)

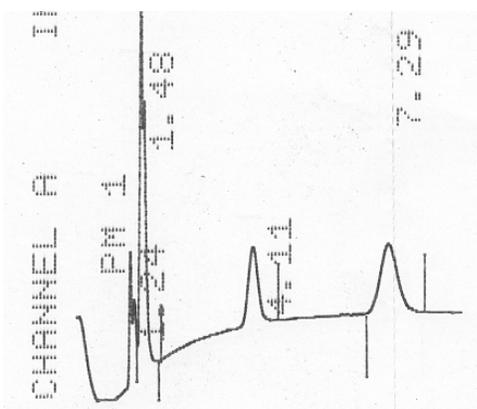


Figura 3.19 Cromatograma correspondiente a la inyección de hidrógeno en el gas estándar a presión de inyección de 10 mm Hg. (Experimento 3)

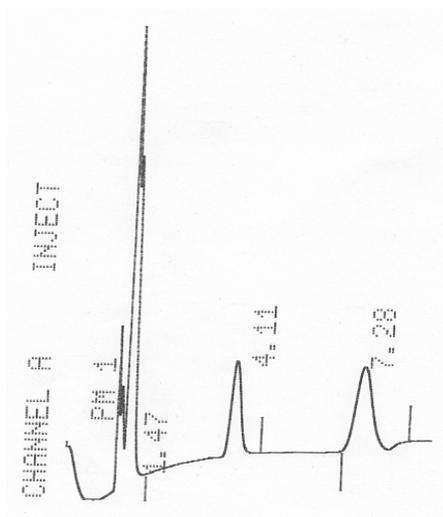


Figura 3.20 Cromatograma correspondiente a la inyección de hidrógeno en el gas estándar a presión de inyección de 20 mm Hg. (Experimento 3)

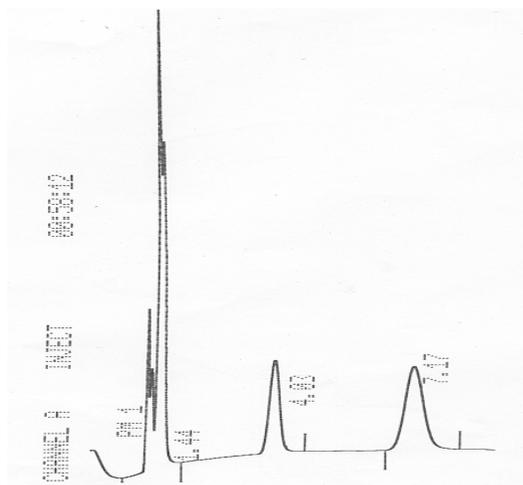


Figura 3.21 Cromatograma correspondiente a la inyección hidrógeno en gas estándar a presión de inyección de 40 mm Hg. (Experimento 3)

En todos los cromatogramas (Figuras 3.17 a 3.21) se observan los picos correspondientes a hidrógeno (1.44, 1.47, 1.48) presente en el gas estándar y los mismos van aumentando en tamaño en la medida que aumenta la presión de inyección.

Las detecciones de hidrógeno en las muestras de cultivo de *Spirulina maxima* 2342, fueron para presiones de inyección total con mínimo de 91 mm de Hg y máximo de 367 mm de Hg y los resultados promedios fueron los siguientes:

Tabla 3.7 Resumen de la detección de hidrógeno en las muestras de cultivo

	Tiempo de elución del hidrógeno (minutos)	Área bajo la curva
Promedio de experimentos	$1.45 \pm 0.01$	$2237.5 \pm 65.4$

En las Figuras 3.22 y 3.23 se muestran a modo de ejemplo, cromatogramas de las muestras gaseosas de cultivo de *Spirulina maxima* 2342.

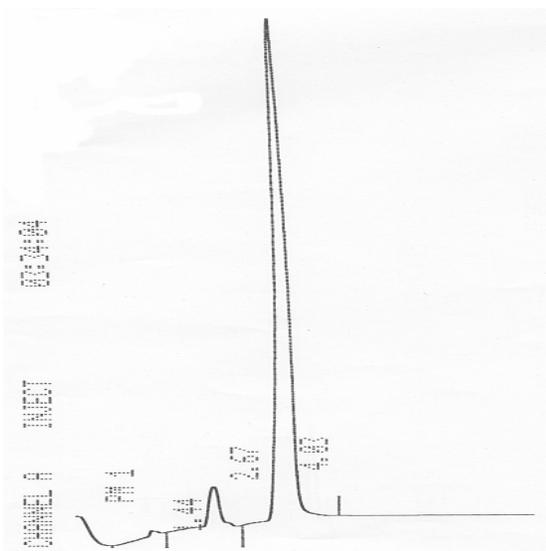


Figura 3.22 Cromatograma correspondiente a la detección de hidrógeno en muestras gaseosas del cultivo a una presión de inyección de 160 mm Hg

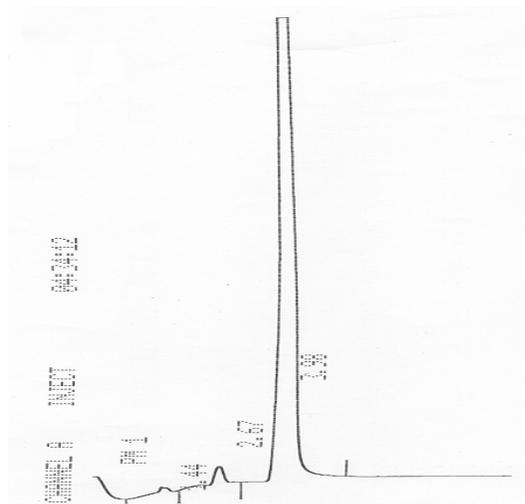


Figura 3.23 Cromatograma correspondiente a la detección de hidrógeno en muestras gaseosas del cultivo a una presión de inyección de 258 mm Hg

En estos cromatogramas (Figuras 3.22 y 3.23) se observa la detección de hidrógeno (1.44) en las muestras de gas generado por *Spirulina maxima*.

### 3.3.2.1.1 Metodología para la cuantificación del hidrógeno generado

A continuación presentamos una metodología que nos permite cuantificar el hidrógeno generado por los microorganismos fotosintéticos, determinando el número de moles/h de hidrógeno producido con el método experimental empleado.

Con los valores de respuesta obtenidos al introducir las muestras (en área bajo la curva), se va a la curva de calibración correspondiente a cada experimento y se determina la presión de parcial de hidrógeno, éstas son convertidas a fracciones molares y a unidades de concentración, empleando las ecuaciones de la ley de los gases ideales, usando la metodología descrita a continuación y resumida en la Figura 3.24. Esta metodología es válida porque se trabaja a muy bajas presiones y podemos considerar que se trata de un gas ideal (Juantorena et al., 2007).

Con el promedio de las áreas de retención para cada experimento, se va a la ecuación de regresión obtenida del ajuste de cada curva de calibración y se determina la presión de inyección parcial de hidrógeno en mm Hg y luego la convertimos a  $N/m^2$ .

Como conocemos la presión total de inyección promedio de la mezcla de gases ( $15097.43 N/m^2$ ), y la presión de inyección parcial de hidrógeno, podemos determinar (Ecuación 3.13), la fracción molar de hidrógeno y con ésta y el volumen total que ocupa el gas en el bioreactor ( $4.4 \times 10^{-5} m^3$ ), determinamos el volumen parcial de hidrógeno (Ecuación 3.14).

$$P_{total} = X_i \cdot P_{H_2} \quad (3.12)$$

$$X_i = \frac{P_{H_2}}{P_{total}} \quad (3.13)$$

$$V_{H_2} = X_i \cdot V_{total} \quad (3.14)$$

Como estamos trabajando con muy bajas presiones parciales, vamos a considerar la mezcla de gases generada por los microorganismos, como un gas ideal y utilizaremos la ecuación de los gases ideales para determinar el número de moles de hidrógeno generado por los microorganismos (Ecuación 3.15). Con esta información y conociendo la constante R y la temperatura, podemos determinar el número de moles de hidrógeno (Ecuación 3.16).

$$P_{H_2} \cdot V_{H_2} = n_{H_2} \cdot R \cdot T \quad (3.15)$$

$$n_{H_2} = \frac{P_{H_2} \cdot V_{H_2}}{R \cdot T} \quad (3.16)$$

donde:

$n_{H_2}$ : número de moles de hidrógeno

$P_{H_2}$ : presión parcial de hidrógeno (22.7 N/m<sup>2</sup>)

$V_{H_2}$ : volumen parcial de hidrógeno (6.6 x 10<sup>-8</sup> m<sup>3</sup>)

T: temperatura (295 K)

R: constante de los gases (8.31447 N. m/ mol. K)

$X_i$ : fracción molar (0.0015)

$P_{total}$ : presión total de la mezcla (87017.91 N/m<sup>2</sup>)

$V_{total}$ : volumen total de la mezcla (4.4 x 10<sup>-5</sup> m<sup>3</sup>)

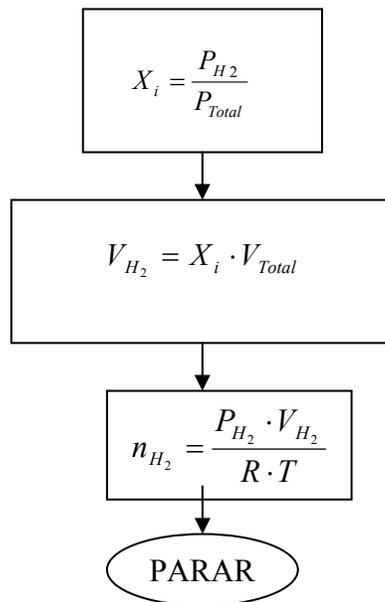


Figura 3.24 Metodología para la cuantificación del hidrógeno generado por *Spirulina maxima*

A continuación presentamos en la Tabla 3.8 un resumen de los experimentos realizados a presiones de inyección de hidrógeno en el gas estándar entre 0 y 40 mm de Hg.

Tabla 3.8 Resumen de los resultados finales de los experimentos

$P_{total}$ (N/m <sup>2</sup> )	$V_{total}$ (m <sup>3</sup> )	$P_{H_2}$ (N/m <sup>2</sup> )	$V_{H_2}$ (m <sup>3</sup> )	$X_i$	$n_{H_2}$ (mol)	$n_{H_2}$ (mol/h)
87017.91	$4.4 \times 10^{-5}$	22.7	$6.6 \times 10^{-8}$	0.0015	$6.1 \times 10^{-10}$	$21 \times 10^{-10}$

Los resultados obtenidos de la detección nos demostraron la necesidad de realizar curvas de calibración, con presiones de inyección de hidrógeno en el gas estándar entre 0 y 10 mm de Hg, para las condiciones establecidas.

Se toman muestras de los cultivos antes de someterlos al proceso de aplicación de vacío (56 cm Hg) (Figura 3.25) y luego de realizar la detección de hidrógeno (Figura 3.26) para observar el estado de las células en un microscopio óptico con cámara digital acoplada (HITACHI KP-D50 Color).

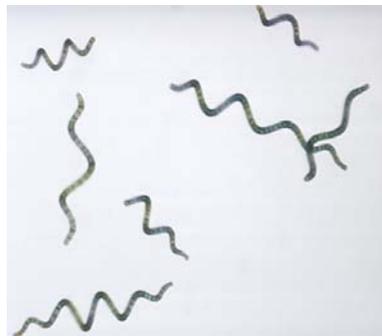


Figura 3.25 Células de *Spirulina maxima* 2342 antes de aplicar vacío

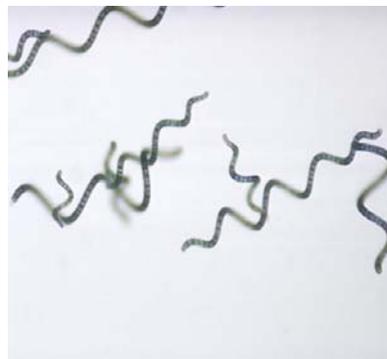


Figura 3.26 Células de *Spirulina maxima* 2342 después de aplicar vacío

### 3.3.2.1.2 Conclusiones

1. Fue posible la detección de gas hidrógeno, bajo las condiciones establecidas, en un cromatógrafo de gases con TCD, eluyendo en un tiempo de  $1.45 \pm 0.01$  minutos.
2. Será necesario realizar curvas de calibración entre 0 y 10 mm de Hg de presiones de inyección total para las condiciones definidas.
3. Las condiciones de vacío en las que se desarrollaron los experimentos, permitieron la generación de hidrógeno por las células, no ocasionando daños estructurales irreparables, que afectaran su funcionamiento, para el proceso de generación de hidrógeno.

### 3.3.2.2 Inyectando gas de calibración estándar (entre 0 y 10 mm Hg)

#### Materiales y Métodos

##### *Cultivo de microorganismos*

Los experimentos fueron realizados con *Spirulina maxima* 2342 cultivada autotróficamente en un reactor de 20 L con una iluminación total de 156 W proporcionados por 4 lámparas de 39 W, con burbujeo de aire continuo. El medio de cultivo SOT, descrito en el epígrafe 2.2.2. Las muestras son colectadas en una determinada etapa de crecimiento celular y se ajusta la concentración del cultivo para los experimentos por DO a  $\lambda$  750 nm. Se emplean como bioreactores las botellas Giggenbach, descritas en el epígrafe 2.4.2, Figura 2.7. Se transfieren 250 mL de cultivo a los bioreactores y se hace pasar un flujo de argón de  $3 \pm 0.1$  mL/s, para eliminar el oxígeno disuelto durante 1 hora, luego se añaden 2 g de ditionita de sodio y se mantiene en agitación durante 5 minutos para el mezclado homogéneo de la muestra. Luego se somete el bioreactor al vacío (56 cm Hg) durante 5 minutos de tiempo total a intervalos de 1 minuto de vacío y 3 segundos de agitación y finalmente se induce el proceso de fotoproducción de hidrógeno bajo condiciones de agitación-iluminación. La iluminación del bioreactor fue provista por una lámpara de 100 W, fijando la intensidad luminosa incidente en  $150 \mu\text{E}/\text{m}^2 \cdot \text{s}$ . En la Figura 3.27 se observa la instalación empleada para la generación de hidrógeno con iluminación. El tiempo de reacción fue de 29 h. Se realizaron 3 experimentos con 2 réplicas cada uno.

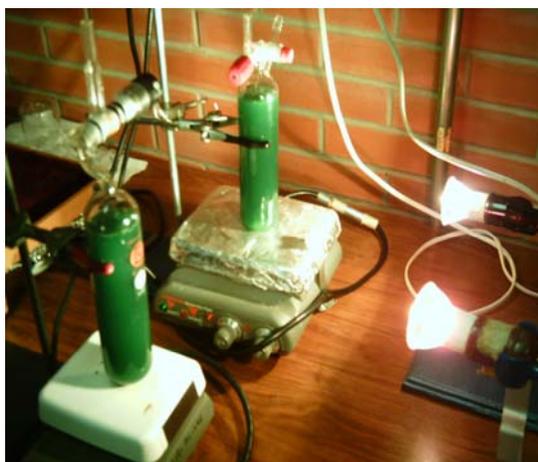


Figura 3.27 Instalación experimental

Las muestras son introducidas en un cromatógrafo de gases con TDC, para detectar el hidrógeno producido, cuyas características se describen en el epígrafe 2.4.2. Figuras 2.6 y 2.7.

### Resultados y Discusión

A continuación presentamos un resumen de los resultados obtenidos en los experimentos. En la Tabla 3.9 se muestran los resultados finales de la caracterización de la biomasa de *Spirulina maxima* 2342, empleada en los experimentos.

Tabla 3.9 Características de la biomasa de *Spirulina maxima* 2342.

Características de la biomasa	<i>Spirulina maxima</i>
Biomasa seca (g )	0.32 ± 0.05
pH	10.2 ± 0.1
Clorofila a (mg)	2.7 ± 0.9
Clorofila a (mg)/biomasa (g)	8 ± 3

La relación de mg de Clorofila/g de biomasa se encuentra dentro de los parámetros reportados para microorganismos fotosintéticos (entre 3 y 10) (Oswald, 1977), lo cual constituye un índice de calidad de la biomasa de estos microorganismos.

Se realizaron curvas de calibración con mezcla de gas estándar PRAXAIR, (% en mol/mol) con un 5 % de He, 10 % de H<sub>2</sub>, 10 % de Ar, 45 % de N<sub>2</sub> y 30 % de CH<sub>4</sub>, a diferentes presiones de

inyección total: 2, 4, 6, 8 y 10 mm de Hg, antes de realizar la inyección de las muestras con el cultivo de microorganismos.

A continuación presentamos algunos cromatogramas de ejemplo (Figuras 3.28 a 3.32) para presiones de inyección total de gas estándar de 2, 4, 6, 8 y 10 mm de Hg.

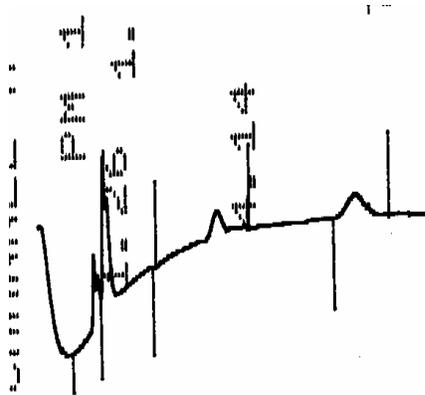


Figura 3.28 Cromatograma correspondiente a la inyección de hidrógeno en el gas estándar, a presión de inyección de 2 mm Hg. (Experimento 3)

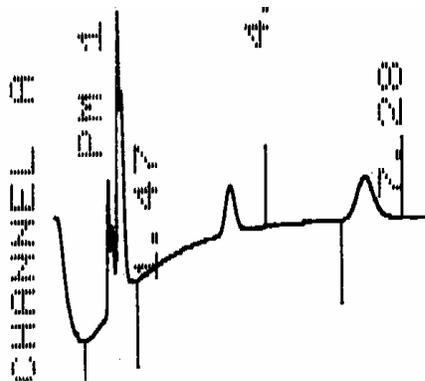


Figura 3.29 Cromatograma correspondiente a la inyección de hidrógeno en el gas estándar, a presión de inyección de 4 mm Hg. (Experimento 3)

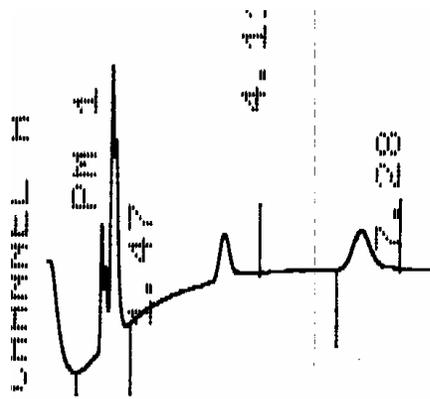


Figura 3.30 Cromatograma correspondiente a la inyección de hidrógeno en el gas estándar, a presión de inyección de 6 mm Hg. (Experimento 3).

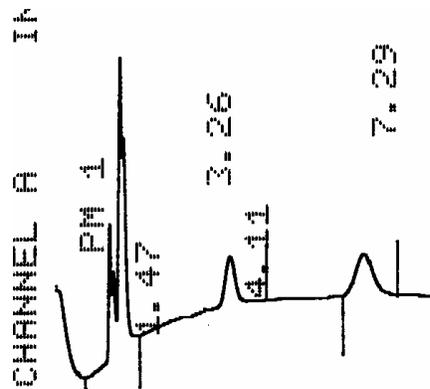


Figura 3.31 Cromatograma correspondiente a la inyección de hidrógeno, en el gas estándar, a presión de inyección de 8 mm Hg. (Experimento 3)

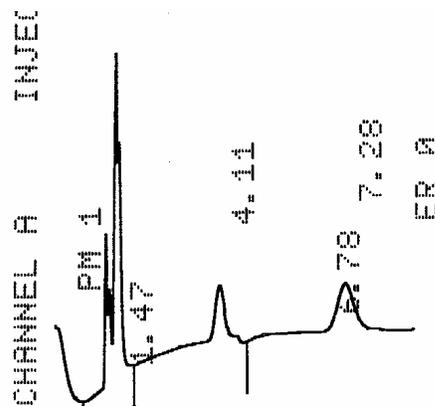


Figura 3.32 Cromatograma correspondiente a la inyección de hidrógeno en el gas estándar, a presión de inyección de 10 mm Hg. (Experimento 3)

En estos cromatogramas típicos que se muestran a modo de ejemplo, se demuestra la separación y la detección del hidrógeno en muestras de gas estándar. Se observa en éste, que el hidrógeno eluye en un tiempo de 1.47 minutos de la mezcla de gas estándar. Ese tiempo fue empleado para la identificación correcta de los picos del hidrógeno, en todas las muestras de gas generado por la biomasa. Para la cuantificación de las muestras del mismo, se construyeron curvas de calibración (con 6 puntos), con los datos obtenidos de la respuesta (área bajo la curva) y la presión parcial (medida en el equipo en mm de Hg).

A continuación presentamos las curvas de calibración correspondientes a los experimentos realizados (Figuras 3.33 a 3.35).

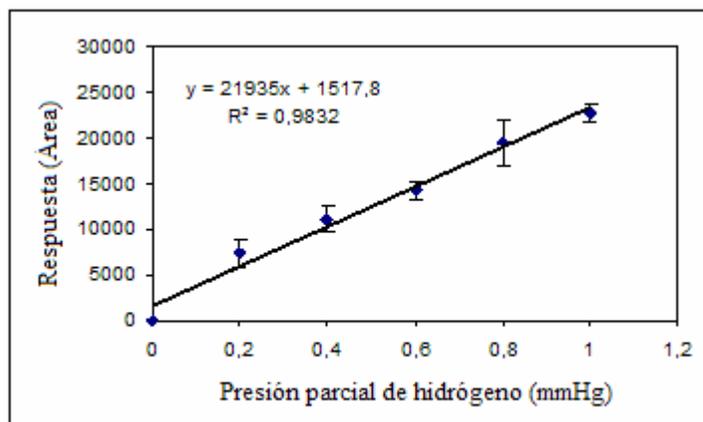


Figura 3.33 Curva de calibración con gas estándar para el Experimento 1

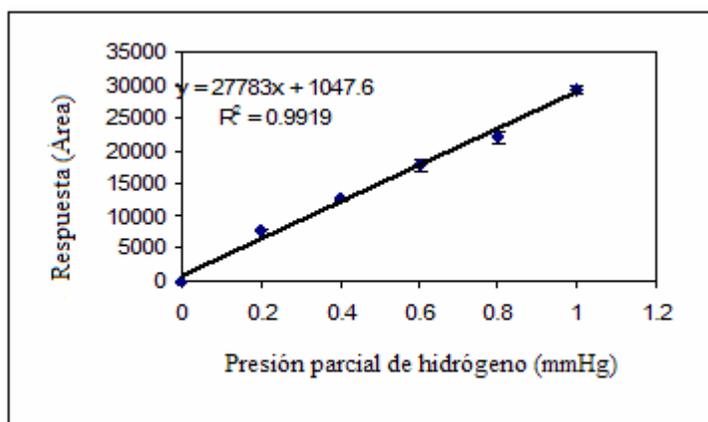


Figura 3.34 Curva de calibración con gas estándar para el Experimento 2

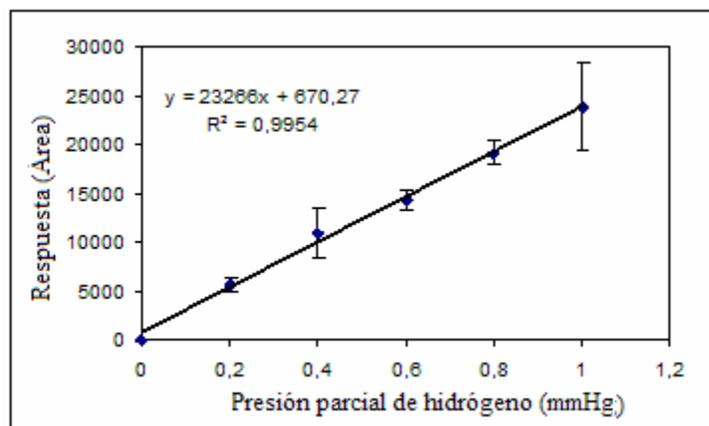


Figura 3.35 Curva de calibración con gas estándar para el Experimento 3

Una respuesta lineal entre ambas variables fue observada claramente en todos los experimentos (Figuras 3.33, 3.34 y 3.35). Se realizó un análisis de la regresión usando un procedimiento propuesto por Santoyo y Verma (2003), cuyos resultados se resumen en la Tabla 3.10.

Tabla 3.10 Resultados de los análisis de regresión lineal

	OLS**		% Regresión	WLS***	
	Intercepto ± S.E.	Pendiente ± S.E.		Intercepto ± S.E.	Pendiente ± S.E.
Set-1	1517.8 868	21935 1433	0.9832	$0.81 \times 10^{-10}$ $0.24 \times 10^{-3}$	23568 800
Set-2	1047.6 761	27783 1257	0.9919	$0.24 \times 10^{-8}$ $0.31 \times 10^{-3}$	3149 424
Set-3	670.3 477	23266 788	0.9954	$0.63 \times 10^{-10}$ $0.24 \times 10^{-3}$	2433 1882

\*\* OLS = Modelo de regresión lineal cuadrada ordinaria

\*\*\*WLS = Modelo de regresión lineal cuadrada con carga

A continuación presentamos algunos ejemplos de cromatogramas obtenidos de las muestras de gas generado por el cultivo de *Spirulina maxima* 2342 (Figuras 3.36 y 3.37).

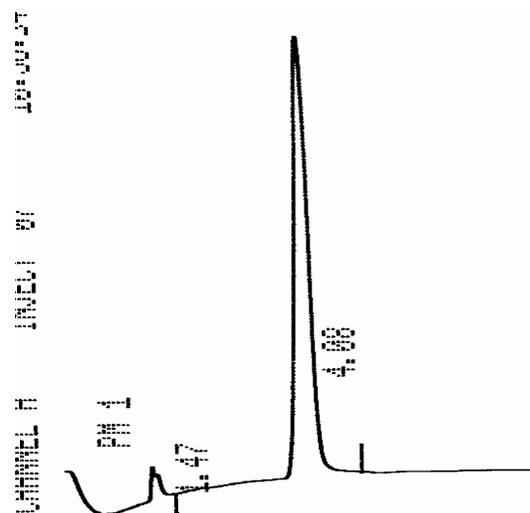


Figura 3.36 Cromatograma correspondiente a la detección de hidrógeno en muestras gaseosas del cultivo, a una presión de inyección de 103 mm Hg

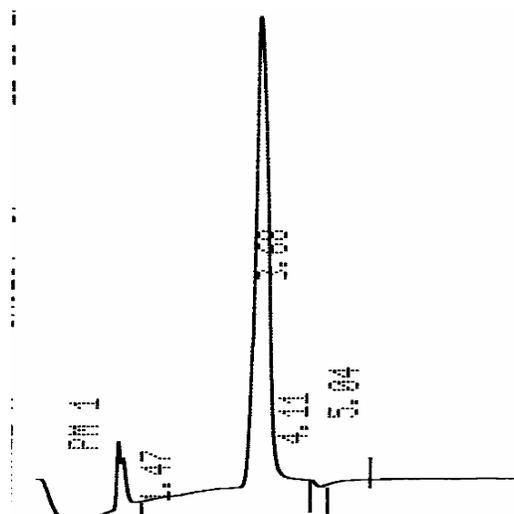


Fig. 3.37 Cromatograma correspondiente a la detección de hidrógeno en muestras gaseosas del cultivo, a una presión de inyección de 93 mm Hg

El pico correspondiente a hidrógeno fue detectado con éxito en todas las muestras analizadas, a modo de ejemplo puede observarse dicho pico en las Figuras 3.36 y 3.37, en un tiempo de elusión de 1.47 minutos. Sin embargo, es importante precisar que algunas impurezas, debido a la contaminación del aire, también fueron detectadas en las muestras apareciendo los picos

correspondientes a oxígeno y nitrógeno, los cuales aparecen en todos los cromatogramas. Estos problemas fueron atribuidos obviamente al método de muestreo y a la producción de oxígeno fotosintético durante el proceso. Aunque la presencia de aire fue detectada, ésta no afectó la detección del hidrógeno, la presencia de oxígeno es perjudicial para la evolución de hidrógeno ya que en tiempo tiende a inhibir a la enzima hidrogenasa, que es la que permite la generación del hidrógeno. Este es un aspecto en el cual hay que seguir trabajando para mejorar dicha producción y eficiencia.

A continuación en la Tabla 3.11, se muestra un resumen de los resultados obtenidos de la detección de hidrógeno a partir de la biomasa de *Spirulina maxima*, bajo las condiciones experimentales establecidas y empleando la metodología descrita en el epígrafe 3.3.2.1.1, Figura 3.24. A partir de los datos obtenidos de las áreas bajo la curva, luego de hacer la inyección de las muestras de gas, con una determinada presión total de inyección para cada experimento, se determina la presión parcial de hidrógeno y luego se calculan los moles/ h de hidrógeno generados. Se realiza un análisis de propagación de errores, para determinar los valores finales promedios y las desviaciones estándar, la presión parcial y el flujo molar en moles/h de hidrógeno generados. Los resultados obtenidos se muestran a continuación en la Tabla 3.11.

Tabla 3.11 Resumen de los resultados finales de los experimentos

Experimento	Reactor No.	Área bajo la curva (análisis en GC-TCD)	P <sub>H2</sub> (mm Hg)	n <sub>H2</sub> (mol/h)
1	1	4616 3988 2476 Promedio-3693±1100	0.10 ± 0.06	7.31x10 <sup>-12</sup> ± 9.49 x10 <sup>-13</sup>
	2	7868 13304 13226 Promedio -1466±3116	0.45 ± 0.14	1.73 x10 <sup>-10</sup> ± 1.12 x10 <sup>-11</sup>
2	3	2089 2172 2296 Promedio -2186±104	0.04 ± 0.02	9.69 x10 <sup>-13</sup> ± 9.85 x10 <sup>-14</sup>
	4	1858 2462 2166 Promedio -2162±302	0.04 ± 0.01	6.62 x10 <sup>-13</sup> ± 4.09 x10 <sup>-14</sup>

3	5	2882 2896 1862 Promedio -2547±593	0.060 ± 0.003	2.42 x10 <sup>-12</sup> ± 1.93 x10 <sup>-13</sup>
	6	2546 1492 2338 Promedio -2125±558	0.043 ± 0.003	2.55 x10 <sup>-12</sup> ± 1.66 x10 <sup>-13</sup>

En las Figuras 3.38 y 3.39 aparecen las fotografías tomadas con el microscopio óptico (OLYMPUS GX-71, que cuenta de analizador de imágenes MSQ-6.5.1 del CICAP-UAEM), para observar las células de microorganismos, antes y después del proceso de aplicación de vacío y de la detección de gas hidrógeno.

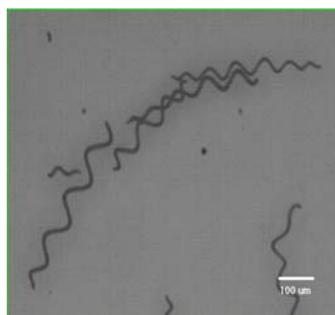


Figura 3.38 Células de *Spirulina maxima* 2342 antes de aplicar vacío

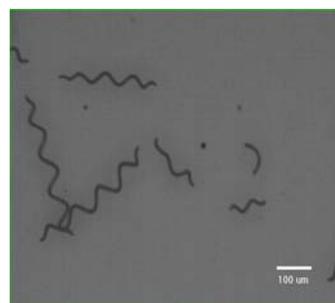


Figura 3.39 Células de *Spirulina maxima* 2342 después de aplicar vacío

En la Figura 3.39 se observa que las células se mantienen prácticamente sin sufrir daños, permitiendo que se lleve a cabo el proceso de generación de hidrógeno.

### 3.3.2.2.1 Conclusiones

1. La detección de hidrógeno fue alcanzada con éxito con la producción fotobiológica de *Spirulina maxima*, bajo las condiciones establecidas.
2. El análisis de hidrógeno con un cromatógrafo de gases con TCD, fue realizado con las condiciones descritas en la metodología. El tiempo en el que eluye el gas hidrógeno fue de  $1.48 \pm 0.03$  minutos.
3. Las condiciones de vacío empleadas para el sistema de recolección no afectaron la estructura de las células, así que el método propuesto, se puede emplear confiablemente para trabajos en el futuro.
4. El sistema de recolección se debe mejorar, para reducir al mínimo la contaminación del aire en las muestras y mejorar la eficiencia en la producción de hidrógeno.

### 3.4 Generación de energía eléctrica en una PEMFC

En este acápite se presentan dos resultados: primero, alimentando a una PEMFC con gas generado por los microorganismos fotosintéticos escogidos, *Spirulina maxima* 2342, bajo dos condiciones experimentales, células intactas y células permeabilizadas, en este caso se determina el hidrógeno usado por la misma para la generación de corriente eléctrica; segundo, se realiza el monitoreo de corriente eléctrica y potencial, empleando una resistencia variable en una PEMFC, alimentada con oxígeno e hidrógeno comprimidos y a partir de los datos obtenidos se propone una metodología, que permite determinar el flujo de hidrógeno generado por los microorganismos fotosintéticos, que alimenta al ánodo de la PEMFC.

#### 3.4.1 Determinación del hidrógeno usado por una PEMFC (*Spirulina maxima* 2342, células intactas y células permeabilizadas)

Se produjo biomasa a partir del microorganismo fotosintético *Spirulina maxima*, para inducir la fotoproducción de gas hidrógeno, luego de un proceso de anaerobiosis- oscuridad. Fueron estudiados 2 casos: células intactas y células permeabilizadas, para analizar si es posible la generación de hidrógeno, en otras condiciones que permitirían en un futuro hacer estudios de inmovilización celular. Se acopló el bioreactor a una celda de combustible tipo PEM y se cuantificó la corriente eléctrica producida durante un tiempo de 100 min de iluminación a la que

se le suministra el gas producido para ambos casos, lo que permitió determinar el hidrógeno usado por la PEMFC.

## **Materiales y Métodos**

### *Cultivo de microorganismos*

Fue cultivada *Spirulina maxima* (cepa UTEX-2342) en 15 litros. El medio de cultivo empleado fue Medio Completo SOT (Ogawa y Terui, 1970). Se tomaron las muestras de cultivo para los experimentos, en una determinada etapa de crecimiento celular y se ajusta la concentración por densidad óptica (DO) a  $\lambda$  750 nm, para garantizar que las características de la biomasa para cada experimento resultara lo más similar posible. Para cada medición por día fueron tomados 222.5 mL de biomasa. A la biomasa algal se le determinó DO a  $\lambda$  750 nm, peso seco (g/L), pH y clorofila Total (mg), por el método espectrofotométrico y las ecuaciones de Arnon, aspectos descritos en el epígrafe 2.3. A continuación se detallan los volúmenes de muestras usados en los experimentos.

#### Cultivo de células intactas

-Volumen de muestra: 222.5 mL

-Volumen de medio: 27.5 mL

-Volumen total: 250 mL

#### Cultivo de células a permeabilizar

-Volumen de muestra: 222.5 mL

-Volumen de etanol: 25 mL

-Volumen de tolueno: 2.5 mL

-Volumen total: 250 mL

### *Proceso de anaerobiosis-oscuridad y reacción de fotosíntesis*

Ambos casos: cultivo de células intactas y cultivo de células a permeabilizar se someten a un proceso de anaerobiosis y oscuridad, haciéndole pasar un pequeño flujo de nitrógeno para eliminar el oxígeno disuelto durante 50 minutos. Para el caso de las células que van a ser permeabilizadas se añade etanol y tolueno al final del proceso de anaerobiosis-oscuridad, antes de acoplar el bioreactor a la PEMFC.

### *Instalación experimental*

La instalación experimental, está formada por el módulo electrolizador-PEMFC descrito en el epígrafe 2.4.3. Además se emplearon los siguientes instrumentos:

1. Luxímetro LI-COR. MODEL LI-185.
2. Multímetro Profesional con interface para PC. MUL-500. STEREN.

La corriente eléctrica generada [(I) en mA] por la PEMFC, se monitorea durante 100 minutos con iluminación ( $150 \mu\text{E}/\text{m}^2.\text{s}.$ ) y 20 minutos sin iluminación, mediante el multímetro, éste a su vez se encuentra acoplado a una PC, que permite el almacenamiento, registro y procesamiento de datos. Se empleó el software Masview 1.1. Se calculó por medio de la Ecuación (3.1) (Larminie y Dicks, 2000), el hidrógeno usado por la celda para su funcionamiento, para la I máx obtenida para ambos casos experimentales.

### **Resultados y Discusión**

A continuación presentamos un resumen, de los resultados obtenidos en los experimentos. En la Tabla 3.12 se muestran las características promedio de la biomasa, que fue empleada para cada grupo de experimentos.

Tabla 3.12 Características de la biomasa de *Spirulina maxima* 2342.

Características de la biomasa	Células intactas	Células permeabilizadas
Biomasa seca (g)	$0.22 \pm 0.01$	$0.18 \pm 0.04$
Clorofila a (mg)	$1.89 \pm 1.02$	$1.69 \pm 0.03$
pH	$9.7 \pm 0.1$	$9.8 \pm 0.1$
Clorofila a(mg)/biomasa(g)	$8.6 \pm 4.6$	$9 \pm 2$

Se observa una mayor relación de mg de pigmentos/g de biomasa para el caso de las células permeabilizadas, por lo que hubo una mayor extracción de clorofila debido a la presencia de etanol, en el mismo tiempo de extracción. Los valores de pH se encuentran dentro de los parámetros normales de este cultivo ya mencionados anteriormente.

Se graficaron para todos los experimentos la corriente eléctrica I (mA) vs Tiempo (min). Para todos los casos fue prácticamente igual el comportamiento en todas las réplicas. Se monitoreó la I

(mA) con iluminación durante 100 minutos y luego sin iluminación durante 20 minutos, disminuyendo aceleradamente la corriente eléctrica (I) y dejándose de producir oxígeno e hidrógeno fotosintéticamente.

En la Figura 3.40 se presentan los resultados promedios, obtenidos del monitoreo de la corriente eléctrica generada, para el caso del cultivo con células intactas y en la Figura 3.41 para el caso de las células permeabilizadas, observándose que presentan un comportamiento muy similar, infiriéndose que la permeabilización de las células no afectó el proceso de generación de hidrógeno durante el tiempo de monitoreo. Cuando se elimina la iluminación al bioreactor, disminuye aceleradamente la corriente eléctrica generada para ambos casos.

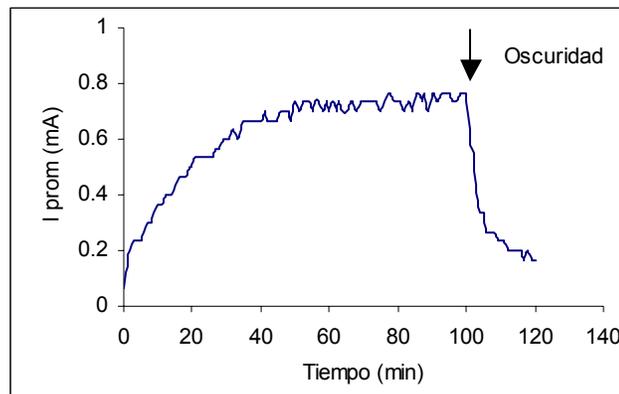


Figura 3.40 Corriente eléctrica promedio generada I (mA) vs tiempo (min) para el caso del cultivo de células intactas

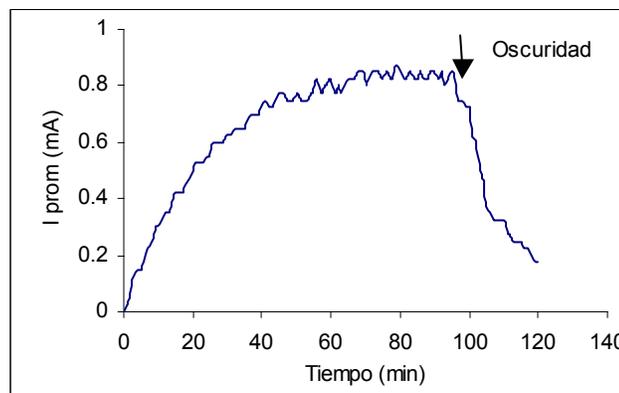


Figura 3.41 Corriente eléctrica promedio generada I (mA) vs tiempo (min) para el caso del cultivo de células permeabilizadas

En la Tabla 3.13 se muestran algunos resultados finales obtenidos, mediante la instalación experimental: los valores máximos de corriente eléctrica, el flujo de hidrógeno usado por la celda combustible, así como la relación entre corriente eléctrica y la biomasa seca final de *Spirulina maxima* para cada caso estudiado.

Tabla 3.13 Resultados finales del monitoreo de la I (mA) vs T (min).

	Células intactas	Células permeabilizadas
I Promedio (mA)	0.8 ± 0.0	0.9 ± 0.2
H <sub>2</sub> usado por la PEM FC x 10 <sup>-12</sup> (kg/s)	8.4	9.5
H <sub>2</sub> usado por la PEM FC x 10 <sup>-12</sup> (m <sup>3</sup> /s)	100	113
mA/mg de biomasa seca final x 10 <sup>-3</sup>	4	5

Las intensidades de corriente y la relación de mA de corriente/mg de biomasa seca final de cultivo que fueron obtenidas, fueron sólo ligeramente superior para el caso de la biomasa de células permeabilizadas, luego del proceso de anaerobiosis-oscuridad y con agitación e iluminación para el proceso de fotosíntesis. Para el caso de los cultivos de células intactas la I máx (mA) generada durante los 100 min de iluminación-agitación fue de 0.8 mA y para el caso de los cultivos de células permeabilizadas fue de 1.2 mA.

Podemos decir que la permeabilización de las células con etanol-tolueno, no obstaculizó la producción de hidrógeno durante el tiempo de monitoreo estudiado, bajo las condiciones experimentales establecidas, por lo que se infiere que no fue afectado el mecanismo de dicha producción.

Fueron sembradas en medio sólido (placas) muestras de cultivo de células intactas y muestras de cultivo de células permeabilizadas. Luego de 10 días de incubación, fue observado que hubo reproducción en el caso de las células intactas, a diferencia de las células permeabilizadas que no se reprodujeron, por lo que al añadir etanol-tolueno para permeabilizar fue afectada la viabilidad de las células. En la Figura 3.42, aparece una fotografía mostrando las células sembradas.



Figura 3.42 Células de cultivo de *Spirulina maxima* 2342 con 10 días de incubación: intactas (a la izquierda), permeabilizadas (a la derecha)

### 3.4.1.1 Conclusiones

1. *Spirulina maxima* 2342 es capaz de producir hidrógeno, bajo las condiciones experimentales establecidas (con células intactas y con células permeabilizadas).
2. El hidrógeno producido, puede ser introducido en una celda de combustible tipo PEM, para generar corriente eléctrica para ambos casos estudiados, siendo usado por la misma  $8.4 \times 10^{-12}$  (kg/s) para las células intactas y  $9.5 \times 10^{-12}$  (kg/s) para células permeabilizadas.
3. La mayor  $I_{m\acute{a}x}$  obtenida (1.2 mA) fue para el caso de cultivo de células permeabilizadas para 0.18 gramos de biomasa seca.
4. La relación  $I_{m\acute{a}x}$  (mA)/g de biomasa fue sólo ligeramente superior para el caso de células permeabilizadas en el tiempo de monitoreo establecido.
5. La corriente eléctrica producida disminuye, cuando se elimina la iluminación del bioreactor con el cultivo de *Spirulina maxima* 2342, para ambos casos estudiados.
6. La permeabilización de las células con etanol-tolueno, no afectó la producción de hidrógeno durante el tiempo de monitoreo establecido, pero si afectó la viabilidad de la células que fueron incubadas en medio sólido durante 10 días, no observándose crecimiento celular.

### **3.4.2 Determinación del flujo de hidrógeno generado por *Spirulina maxima* 2342, a partir de una PEMFC**

Se determinan los flujos de hidrógeno generados por los microorganismos fotosintéticos escogidos (*Spirulina maxima* 2342), bajo diferentes condiciones experimentales, que alimentan a una celda de combustible tipo PEM.

Condiciones experimentales: para la misma característica de la biomasa (concentración) y tres intensidades luminosas diferentes (150, 112 ó 75  $\mu\text{E}/\text{m}^2\cdot\text{s}$ ), dos casos:

Caso 1. Sin adición de ditionita de sodio (0 g)

Caso 2. Con adición de ditionita de sodio (2g)

#### **Materiales y métodos**

##### *Cultivo de microorganismos*

*Spirulina maxima* (cepa UTEX-2342) fue cultivada en 15 litros en la instalación de planta piloto (Figura 2.4). El medio de cultivo empleado fue Medio Completo SOT. (Ogawa y Terui, 1970), epígrafe 2.2.

Se ajusta la concentración del cultivo a emplear para los experimentos (previamente fijada) por densidad óptica (DO) a  $\lambda$  de 750 nm, para garantizar que las características de la biomasa para cada experimento resultara lo más similar posible. Para cada réplica a la que se realizan las mediciones fueron tomados 190 mL de biomasa. A la biomasa se le determinó, peso seco (g/L), pH y clorofila a (mg/L), ésta por el método espectrofotométrico y las ecuaciones de Arnon, 1949, técnicas descritas en el epígrafe. 2.3.

##### *Proceso de anaerobiosis-oscuridad y reacción de fotosíntesis*

El cultivo se somete a un proceso de anaerobiosis y oscuridad, haciéndole pasar un pequeño flujo de argón durante 1 hora para eliminar el oxígeno disuelto, luego el bioreactor con 190 mL de cultivo es iluminado con lámpara de halógeno de 100 W (la intensidad luminosa incidente según el caso experimental) y se mantiene el cultivo en agitación durante 2 horas. Luego se acopla el bioreactor al ánodo de la (PEMFC), para que pase el flujo de gas a la misma y se le añade a éste

un flujo de argón de  $30 \pm 1$  mL/min con el objetivo de aumentar la presión de entrada del gas a la celda y aumentar la actividad de la celda, al cátodo se le inyecta oxígeno comprimido.

### Instalación experimental

La instalación experimental aparece en las Figuras 3.43- a y b y está formada por:

- PEMFC (cuyas características se describen en el epígrafe 2.4.3)
- Voltímetro (mV) (Multímetro digital Autorazing microvolt KEITHLEY DMM; Rango 200 mV; resolución  $1\mu\text{V}$ , exactitud  $\pm 0.007\%$  rgd + 2counts)
- Amperímetro ( $\mu\text{A}$ ) (Multímetro digital BK PRECISION, Modelo 5490; Rango 500  $\mu\text{A}$ ; resolución 10  $\mu\text{A}$ ; exactitud  $0.2\%R + 5D$ )
- Resistencia variable (0-5  $\text{k}\Omega$ )
- Sensor para la medición de temperatura ( $^{\circ}\text{C}$ ) (Multímetro MUL-500; Rango 0 a 400  $^{\circ}\text{C}$ ; resolución 1  $^{\circ}\text{C}$ ; precisión  $\pm 3.0\%$  de rdg  $\pm 3d$ )
- Hidrógeno (g) comprimido (Grado 4.5)
- Oxígeno (g) comprimido (Grado 2.6)
- Argón (g) comprimido (calidad industrial)
- Agitador magnético
- Lámpara 100 W

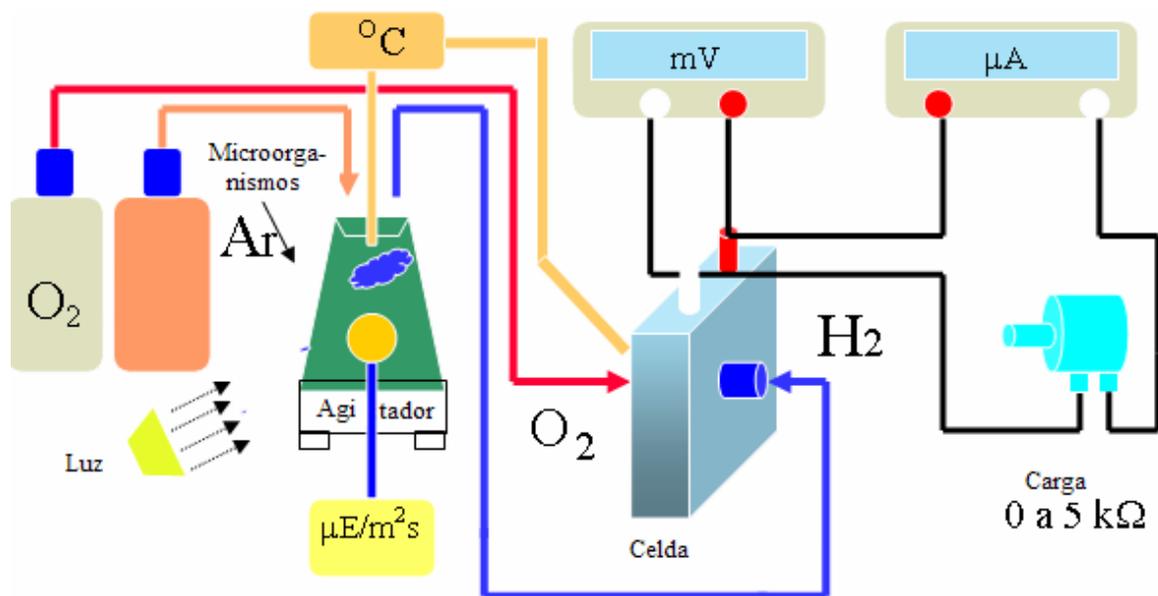


Figura 3.43-a Esquema de la Instalación experimental



Figura 3.43-b Instalación experimental

## Resultados y Discusión

### 3.4.2.1 Metodología para la determinación del flujo de hidrógeno generado por los microorganismos fotosintéticos

Para la determinación del flujo de hidrógeno, que se genera por los microorganismos fotosintéticos, en condiciones de anaerobiosis, según los diferentes casos experimentales fue necesario lo siguiente:

1. Verificar que al conectar el bioreactor, al ánodo de la PEMFC y por el cátodo inyectar oxígeno (g) comprimido, se generara un potencial (mV).
2. Aumentar la actividad de la celda, aumentando la presión en la entrada del ánodo, inyectando junto con el flujo generado por los microorganismos, un pequeño flujo de argón (g) ( $30 \pm 1$ ) mL/min.
3. Realizar prueba patrón con agua destilada, sometida a las mismas condiciones que se aplican al cultivo.

Se presenta a continuación una gráfica, en la Figura 3.43 donde se muestran las diferentes pruebas realizadas, previas a la realización de los experimentos bajo diferentes condiciones.

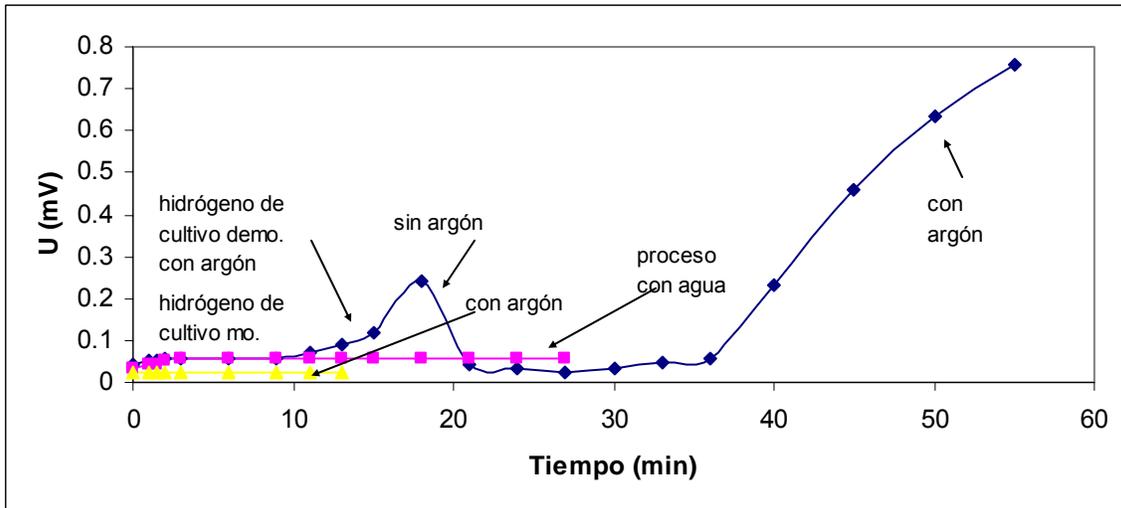


Figura 3.44 Experimentos previos con diferentes condiciones

Se inyecta un flujo de oxígeno por el cátodo de la PEMFC, para todos los casos se verifica el flujo inicial a la salida de 540 mL / min y se observa en la Figura 3.44, lo siguiente:

- cuando se inyecta argón por el ánodo, no se presenta actividad en la celda.
- cuando se inyecta al ánodo el gas generado a partir de agua destilada previamente sometida al proceso de anaerobiosis-oscuridad y luego iluminación, se presentan bajos valores de actividad en la celda que se mantienen estables en el tiempo.
- cuando se inyecta al ánodo el gas generado por los microorganismos, se presentan bajos valores de actividad en la celda, pero superiores al caso explicado anteriormente.

Si se añade a este flujo, un pequeño flujo de argón, aumenta el potencial rápidamente, por lo que se induce que este aumento de presión contribuye considerablemente al aumento de actividad en la PEMFC, si se suprime el flujo de argón disminuye aceleradamente el potencial.

4. Realizar calibración a la PEMFC inyectando oxígeno (g) e hidrógeno (g) comprimidos con flujos pre-determinados, realizando curvas de potencia (I-U).

Los flujos iniciales medidos a la salida de la PEMFC empleados para obtener las curvas I-U, fueron: 540 mL/min de O<sub>2</sub> (g) y 1080 mL/min de H<sub>2</sub> (g).

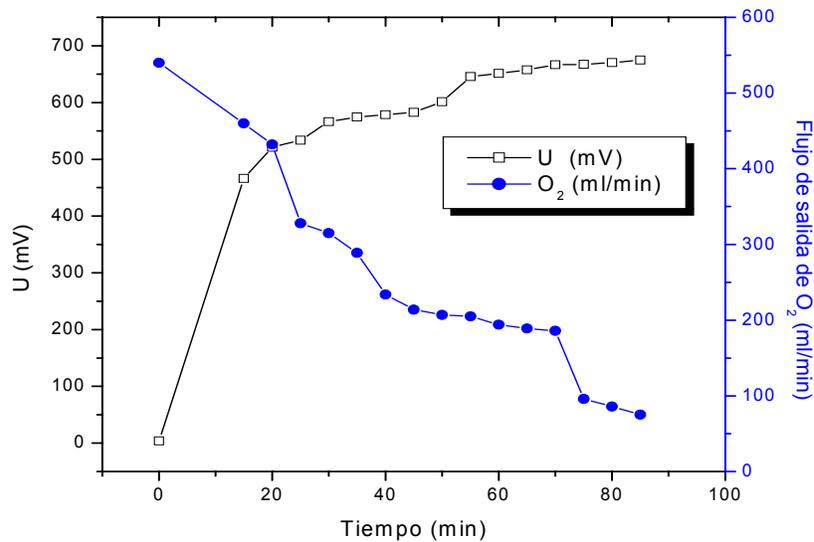


Figura 3.45 Variación del potencial (mV) y el flujo de oxígeno a la salida de la celda vs tiempo.

En la Figura 3.45 se observa que a medida que aumenta el potencial de la celda (mV), disminuye el flujo de oxígeno que va saliendo de la celda en relación al tiempo, infiriéndose que comienza a aumentar el flujo usado por la celda, aumentando la actividad y permitiendo la generación de electricidad.

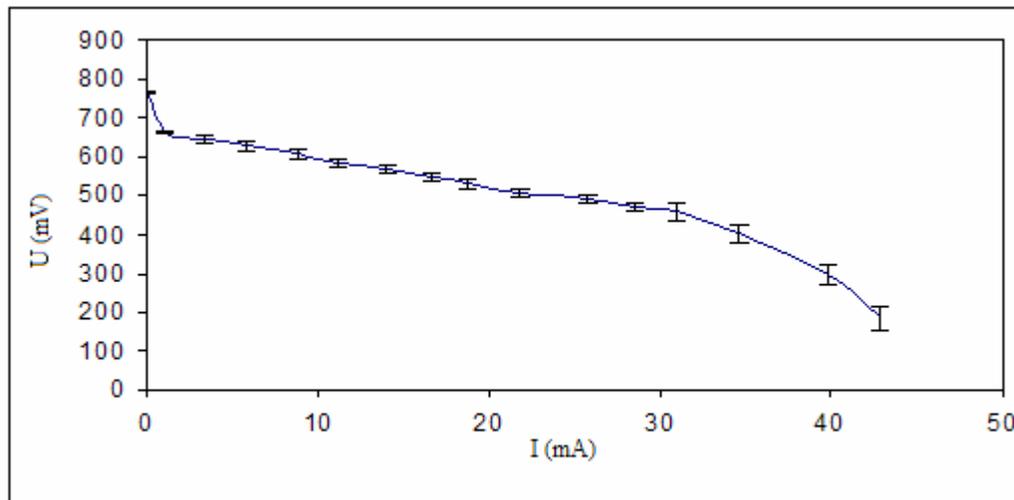


Figura 3.46 Curva I-U para los valores promedio de los experimentos

En la Figura 3.46, se observa que a medida que aumenta la intensidad de la corriente disminuye el potencial de la celda y éste es el comportamiento de la curva característica I-U de la PEMFC. El potencial de la celda disminuye respecto al potencial de la celda en equilibrio, con el aumento

de la intensidad de corriente, debido a la presencia de procesos parásitos que ocurren en los electrodos de la celda. Esto se refleja en una caída de potencial comúnmente conocida como sobrepotencial.

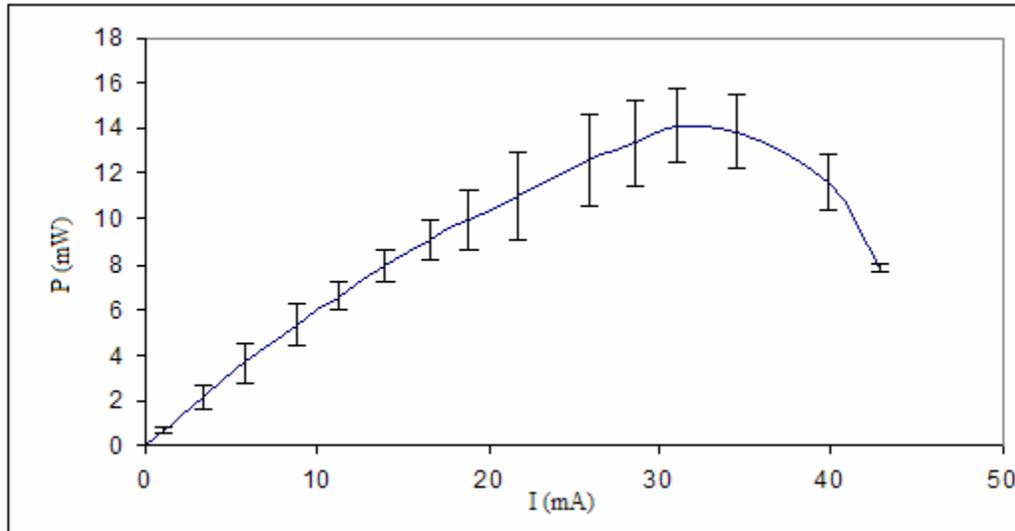
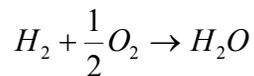


Figura 3.47 Curva I-P para los valores promedio de los experimentos

En la Figura 3.47 se observa que a medida que aumenta la corriente eléctrica, aumenta la potencia generada por la celda, hasta un punto máximo, luego disminuye la misma bruscamente al aumentar la corriente.

5. Determinar la Eficiencia energética de la celda (Eficiencia)

Considerando la reacción global para una PEMFC:



$$Eficiencia = \frac{U_c}{U_{tn}} \tag{3.17}$$

donde:

$U_c$ : voltaje de la celda a la máxima potencia, (V), (de datos experimentales)

$U_{tn}$ : voltaje termoneutral, (V)

$$U_{tn} = \frac{-\Delta H}{nF} \quad (3.18)$$

donde:

$n$ : número de electrones generados por 1 mol de hidrógeno, 2

$F$ : constante de Faraday, 96487 A.s/mol

$\Delta H$ : entalpía, (J/mol) (W.s/mol) (A.V.s/mol)

$$\Delta H = \Delta H_f = (H_f)_{H_2O} - (H_f)_{H_2} - \frac{1}{2}(H_f)_{O_2} \quad (3.19)$$

$$H_f = H_{298.15} + \int_{298.15}^T C_p dT \quad (3.20)$$

donde:

$T$ : temperatura de trabajo, 294.15 K

$C_p$ : capacidad molar a presión constante, (J/mol.K)

298.15 K, temperatura estándar

A la temperatura estándar se tienen los siguientes valores de entalpías de formación:

Tabla 3.14 Entalpías de formación a 298.15 K

	Hf (J/mol)
H <sub>2</sub> O (l)	-285838
H <sub>2</sub> (g)	0
O <sub>2</sub> (g)	0

Para H<sub>2</sub>O:

$$C_p = 143.05 - 58.040T^{0.25} + 8.2751T^{0.5} - 0.036989T \quad (3.21)$$

Para H<sub>2</sub>:

$$Cp = 56.505 - 22222.6T^{-0.75} + 116500T^{-1} - 560700T^{-1.5} \quad (3.22)$$

Para O<sub>2</sub>:

$$Cp = 37.432 + 2.0102 \times 10^{-5} T^{1.5} - 178570 T^{-1.5} + 2368800 T^{-2} \quad (3.23)$$

se sustituye (3.21), (3.22) y (3.23) en (3.20) para cada caso, luego en (3.19), luego en (3.18) y por último en (3.17).

6. Determinar la potencia de entrada de la celda  $P_{ent}$  (mW).

$$P_{ent} = \frac{P_{sal}}{Eficiencia} \quad (3.24)$$

donde:

$P_{sal}$ : potencia máxima de salida de la celda, (mW) (de datos experimentales)

7. Determinar los flujos de hidrógeno usados por la celda  $FlujoH_2usado$ , (mol/h) ó (kg/h) para los datos experimentales de  $I$  (mA) (U.S Energy Department, 2000).

$$FlujoH_2usado(mol/h) = (IA) \left( \frac{1coulomb/s}{1A} \right) \left( \frac{1equiv.dee^-}{96487coulomb} \right) \left( \frac{1molH_2}{2equiv.dee^-} \right) \left( \frac{3600s}{1h} \right) \quad (3.25)$$

donde:

$I$ : corriente generada por la celda (A) (de datos experimentales)

$$FlujoH_2usado(kg/h) = FlujoH_2usado(mol/h) \left( \frac{2.0158g}{1molH_2} \right) \left( \frac{1kg}{1000g} \right) \quad (3.26)$$

8. Determinar los flujos de hidrógeno a la salida de la celda  $FlujoH_2salida$ , (mol/h) (de datos experimentales)

9. Determinar los flujos de hidrógeno a la entrada de la celda  $FlujoH_2entrada$ , (mol/h)

$$FH_2entrada(mol/h) = FH_2salida(mol/h) + FH_2usado(mol/h)$$

10. Determinar la eficiencia de Faraday (%)

$$Eficiencia\ de\ Faraday = \frac{Flujo\ H_2\ usado}{Flujo\ H_2\ entrada} \quad (3.27)$$

11. Graficar Densidad de Corriente (mA/cm<sup>2</sup>) vs Eficiencia de Faraday (%)

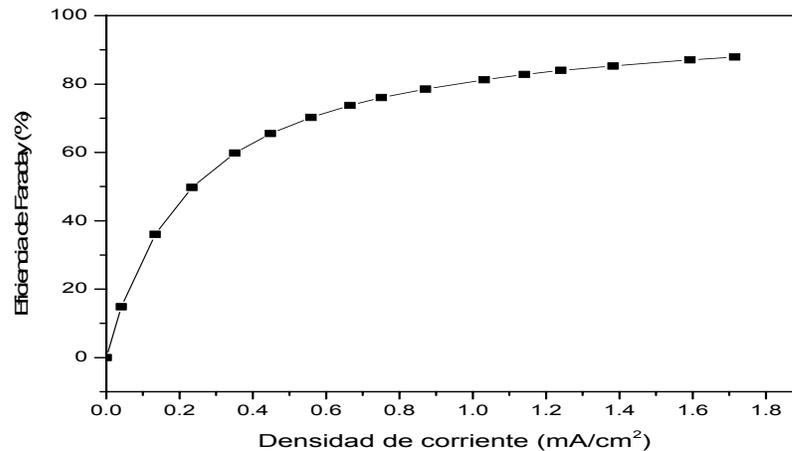


Figura 3.48 Curva Densidad de corriente vs Eficiencia de Faraday determinada a partir de los datos experimentales

12. Realizar el ajuste de la curva y determinar la ecuación de regresión característica.

A partir de la ecuación de regresión y los datos experimentales obtenidos para cada caso experimental, se obtienen los flujos de hidrógeno que entran al ánodo de la PEMFC procedentes del bioreactor y generado por los microorganismos fotosintéticos.

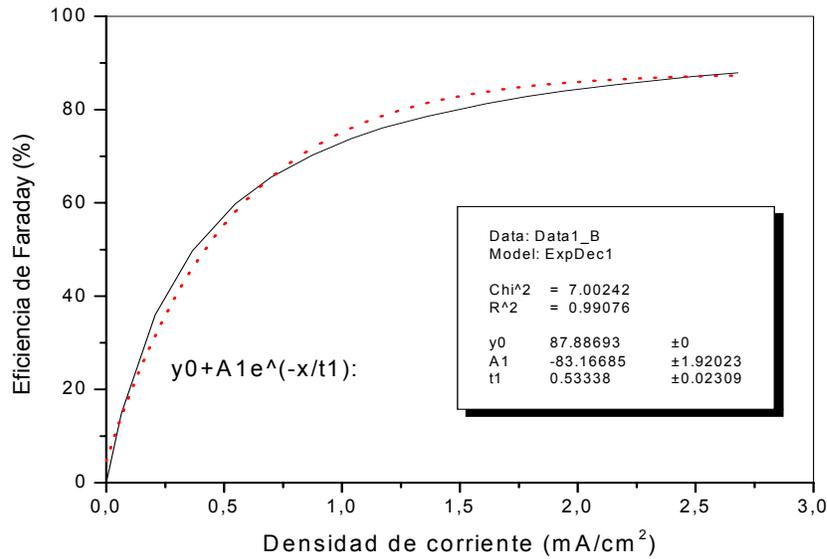


Figura 3.49 Curva con ajuste experimental

13. Para cada caso experimental, en el que se genera hidrógeno por los microorganismos fotosintéticos, con la  $I$  máxima promedio (mA), se determina la densidad de corriente, luego se sustituye en la ecuación y se obtiene la Eficiencia de Faraday. Con ésta y los flujos de hidrógeno usados por la celda, se determinan los flujos de hidrógeno que entran a la celda ( $FlujoH_2$  entrada), (mol/h) ó (kg/h), que son los flujos generados por los microorganismos para cada caso experimental.

$$FlujoH_2 entrada = \frac{FlujoH_2 usado}{EficienciaFaraday} \quad (3.28)$$

A continuación en la Tabla 3.15, se muestran los resultados promedios de las características de la biomasa de *Spirulina maxima* 2342 empleada en los experimentos.

Tabla 3.15 Características de la biomasa de *Spirulina maxima* 2342

Características de la biomasa	<i>Spirulina maxima</i>
Biomasa seca (g)	0.210 ± 0.001
pH	10.180 ± 0.001
Clorofila a (mg)	1.19 ± 0.06
Clorofila a (mg)/biomasa (g)	5.7 ± 0.4

Los valores de pH se encuentran dentro de los parámetros óptimos reportados para la especie empleada (entre 9 y 11) (Kosaric et al.,1974) y los mg de Clorofila/g de biomasa están acorde con los parámetros de calidad de biomasa para el caso de microorganismos fotosintéticos (entre 3 y 10) (Oswald, 1977).

#### Curvas (Tiempo-Temperatura)

Fue monitoreado el comportamiento de la temperatura (°C), en el cultivo que se encuentra dentro del bioreactor en agitación, hasta que se comienza a inyectar el gas al ánodo de la PEMFC, para las tres intensidades luminosas incidentes. En la Figura 3.50 se observa que durante el tiempo de experimentación, a mayor intensidad luminosa incidente es más rápido el aumento de temperatura, pero éste se mantiene luego constante durante un tiempo y los valores alcanzados no ocasionan daños a la integridad del cultivo.

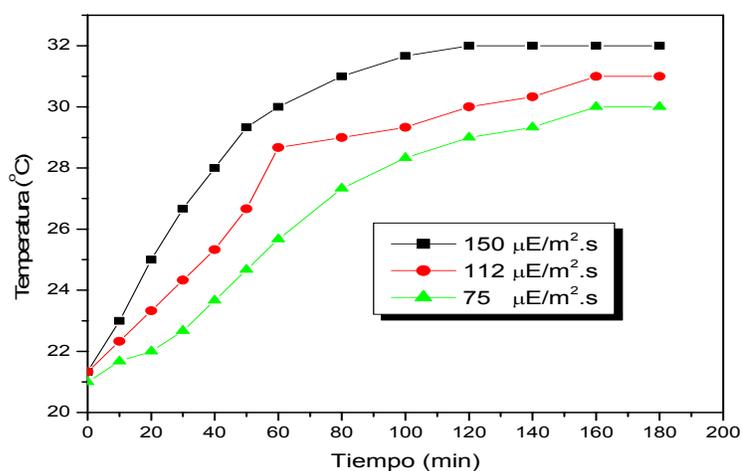


Figura 3.50 Variación de la temperatura vs tiempo para las diferentes intensidades luminosas

### Curvas (Tiempo-U)

Para cada caso experimental se monitorea el potencial de la celda U (mV) durante un tiempo de 30 min aproximadamente hasta que se estabiliza, a partir de este momento se toman los datos de circuito abierto (mV) y se varía la resistencia para tomar datos de I ( $\mu\text{A}$ ) y U (mV). Para cada grupo de datos se realiza la prueba de significación t-Student, (Verma, 2004) con el objetivo de probar si existen o no diferencias significativas entre ellos y por tanto determinar si pueden ser promediados entre sí y verificar así su reproducibilidad, para todos los casos se acepta la hipótesis nula  $H_0$ : no existen diferencias significativas entre los grupos de datos. En el Anexo se muestra un ejemplo de la prueba realizada para uno de los grupos de datos escogido. Además, se determina como medida de tendencia central, la media aritmética y como medida de dispersión, la desviación estándar para todos los grupos de datos.

A continuación se muestran los comportamientos del potencial de la celda en el tiempo, para cada intensidad luminosa fijada.

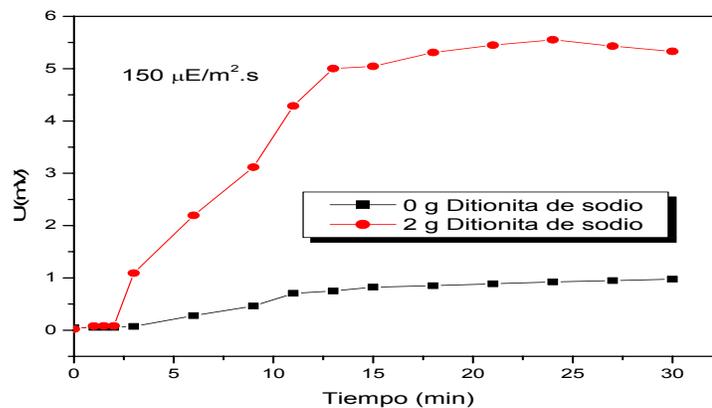


Figura 3.51 Variación de U (mV) en el tiempo para intensidad luminosa de  $150 \mu\text{E}/\text{m}^2 \cdot \text{s}$

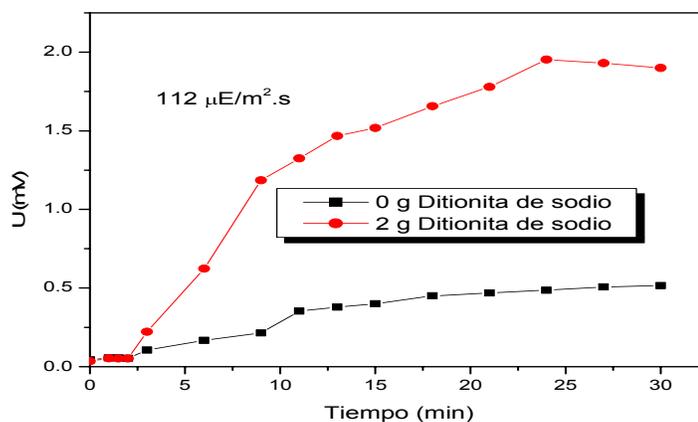


Figura 3.52 Variación de U (mV) en el tiempo para intensidad luminosa de  $112 \mu\text{E}/\text{m}^2.\text{s}$

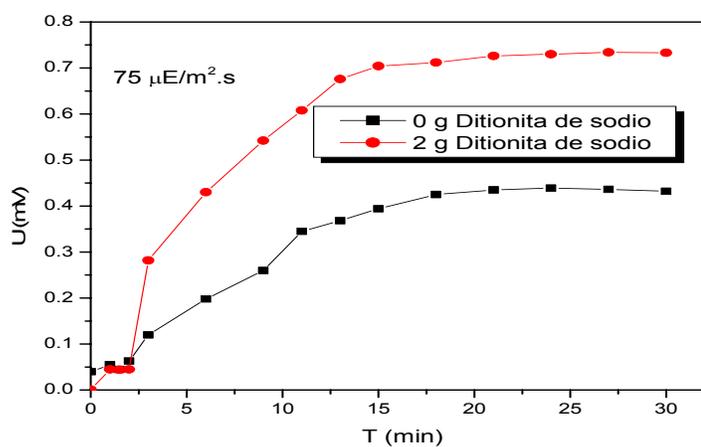


Figura 3.53 Variación de U (mV) en el tiempo para intensidad luminosa de  $75 \mu\text{E}/\text{m}^2.\text{s}$

En las Figuras 3.51, 3.52 y 3.53, se observa que para todos los casos que se añaden 2 g de ditionita de sodio, se obtienen mayores valores de U (mV) en el tiempo de experimentación y estos valores van aumentando proporcionalmente, a medida que aumenta la intensidad luminosa incidente.

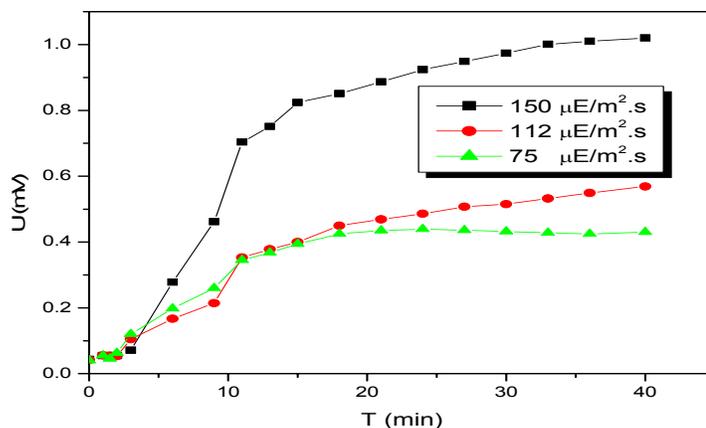


Figura 3.54 Variación de U (mV) en el tiempo sin inclusión de ditionita de sodio

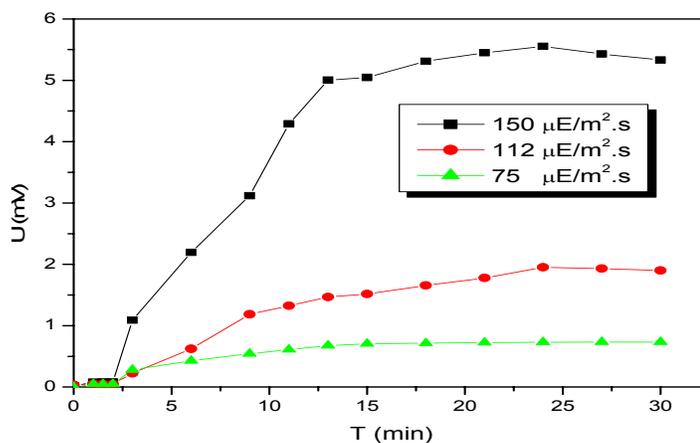


Figura 3.55 Variación de U (mV) en el tiempo con la inclusión de 2 g de ditionita de sodio

Si se comparan los valores de U (mV) en el tiempo cuando no se añade ditionita de sodio (Figura 3.54) para las tres intensidades luminosas incidentes, con los valores cuando se añaden 2g de ditionita de sodio (Figura 3.55), se observa que se alcanzan mayores valores de U (mV) durante el tiempo de experimentación para el último caso. Esto permite afirmar, que hubo un efecto favorable por la inclusión de la ditionita de sodio en el proceso, ya que la hidrogenasa es sensible al oxígeno y este agente reductor ayuda a inhibir su producción y por tanto favorecer la producción de hidrógeno.

### Curvas (I-U)

Con los datos promedios de I (mA) y U (mV) para cada caso estudiado, se presentan a continuación las curvas obtenidas, para cada intensidad luminosa incidente. Las Figuras 3.56, 3.57 y 3.58, son las obtenidas cuando no se añade ditionita de sodio al cultivo, luego del proceso de anaerobiosis-oscuridad.

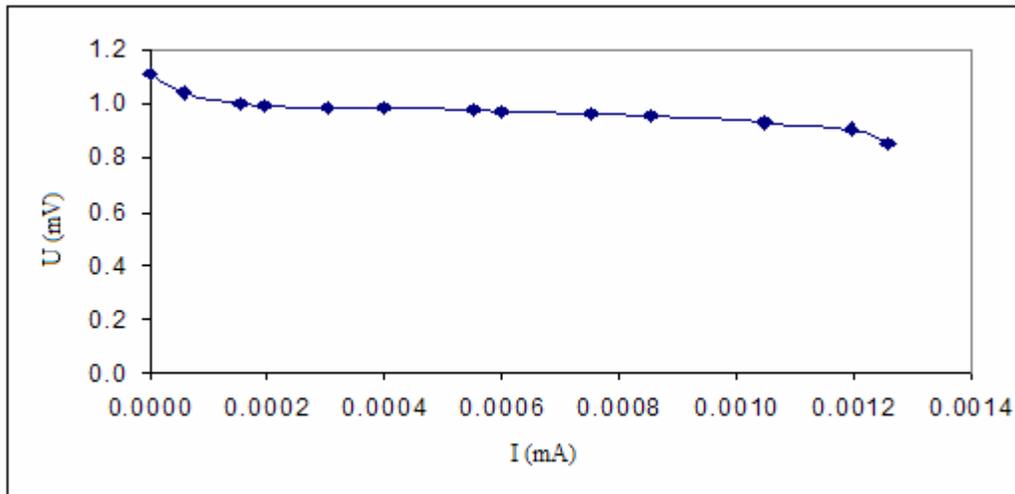


Figura 3.56 Curva I vs U para los valores promedios de los experimentos, con cultivo sin adición de ditionita de sodio e intensidad luminosa incidente de  $150 \mu\text{E}/\text{m}^2.\text{s}$

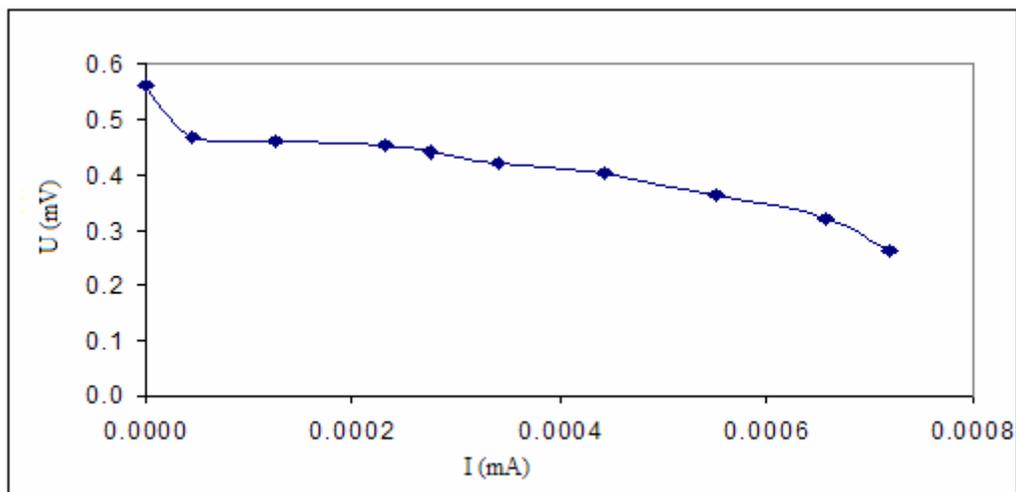


Figura 3.57 Curva I vs U para los valores promedios de los experimentos, con cultivo sin adición de ditionita de sodio e intensidad luminosa de  $112 \mu\text{E}/\text{m}^2.\text{s}$

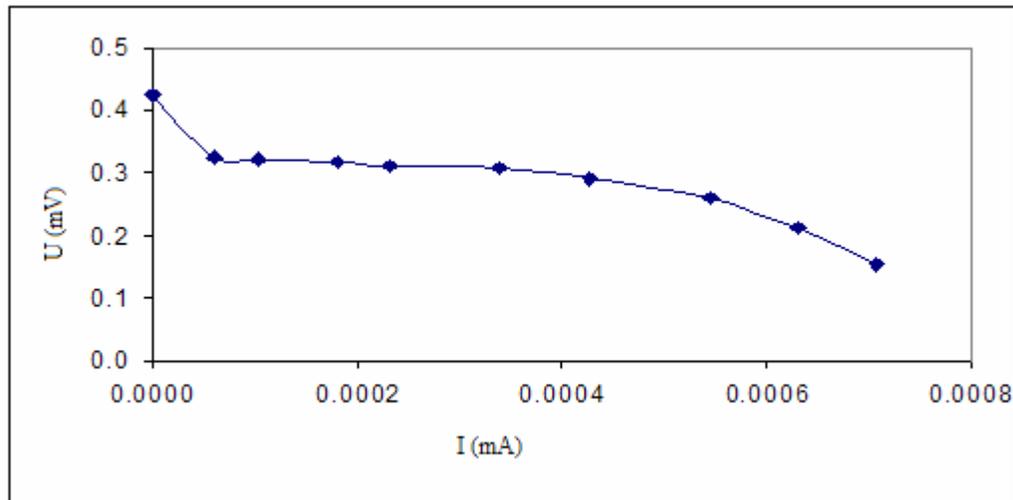


Figura 3.58 Curva I vs U para los valores promedios de los experimentos, con cultivo sin adición de ditionita de sodio e intensidad luminosa de  $75 \mu\text{E}/\text{m}^2.\text{s}$

Se muestra en las Figuras 3.56, 3.57 y 3.58, las gráficas de I-U para los resultados finales promedios de los experimentos, cuando no se añade ditionita de sodio al cultivo. Se observa el comportamiento típico para una curva característica de una PEMFC, el potencial de la celda disminuye a medida que aumenta la intensidad de corriente. Al comparar los resultados de potencial obtenidos para cada intensidad luminosa incidente, se observa que los valores alcanzados de los mismos, son mayores a medida que aumenta la intensidad luminosa incidente.

En las Figuras 3.59, 3.60 y 3.61, se muestran las curvas características obtenidas al añadir 2 g de ditionita de sodio al cultivo, luego del proceso de anaerobiosis-oscuridad.

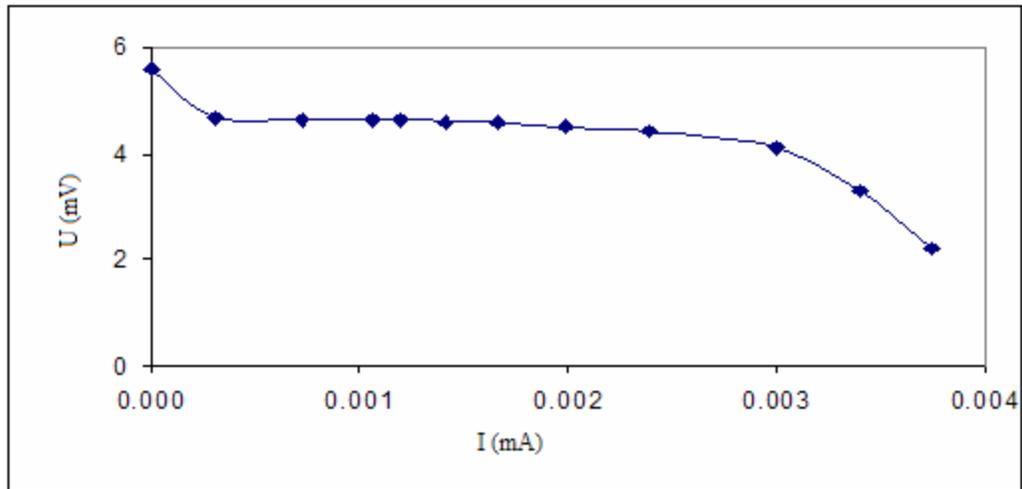


Figura 3.59 Curva I vs U para los valores promedios de los experimentos, con cultivo con adición de 2 g de ditionita de sodio e intensidad luminosa de  $150 \mu\text{E}/\text{m}^2.\text{s}$

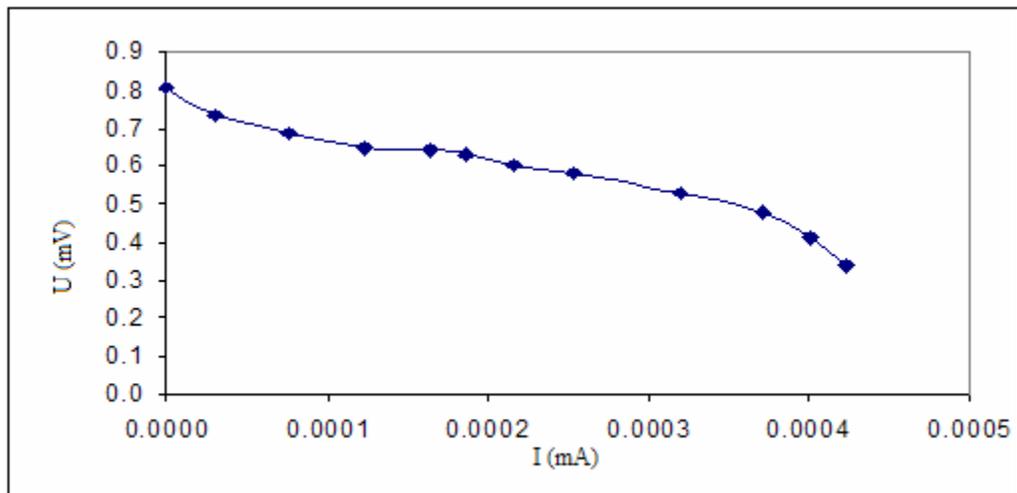


Figura 3.60 Curva I vs U para los valores promedios de los experimentos, con cultivo con adición de 2 g de ditionita de sodio e intensidad luminosa de  $112 \mu\text{E}/\text{m}^2.\text{s}$

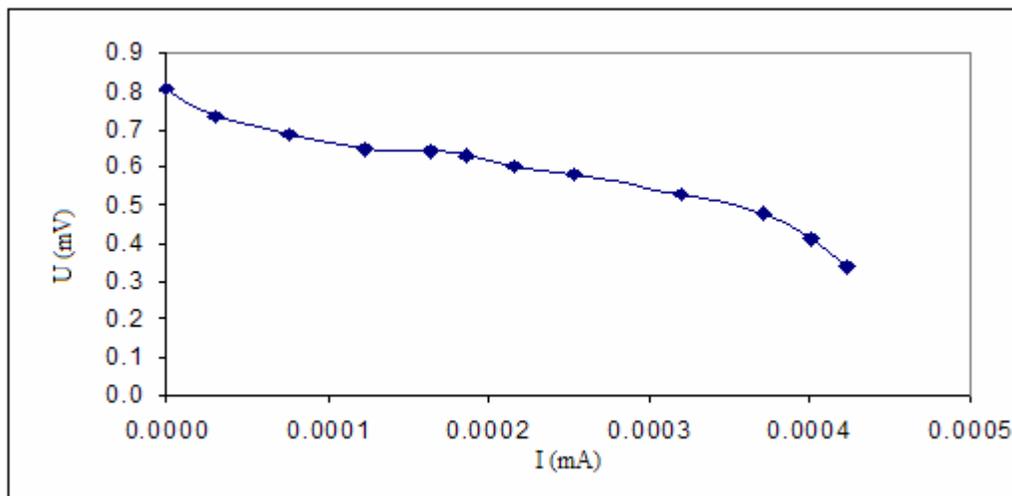


Figura 3.61 Curva I vs U para los valores promedio de los experimentos, con cultivo con adición de 2 g de ditionita de sodio e intensidad luminosa de  $75 \mu\text{E}/\text{m}^2.\text{s}$

En las Figuras 3.59, 3.60 y 3.61 se observa el mismo comportamiento que para el caso en que no se añade ditionita de sodio, el potencial de la celda disminuye a medida que aumenta la intensidad luminosa incidente, siendo mayores los resultados a medida que aumenta la intensidad luminosa incidente, pero al comparar los valores obtenidos cuando no se añade y cuando se añaden 2 g de ditionita de sodio, observamos que los mejores resultados se obtienen para el segundo caso.

#### *Curvas (I-P)*

Con los datos promedio de I (mA) y U (mV) para cada caso estudiado, se calcula la potencia P (mW) de salida generada por la PEMFC. A continuación se presentan las curvas obtenidas para cada intensidad luminosa incidente: los casos en que no se añade ditionita de sodio (Figuras 3.62, 3.63 y 3.64) y cuando se añaden 2 g de ditionita de sodio (Figuras 3.65, 3.66 y 3.67).

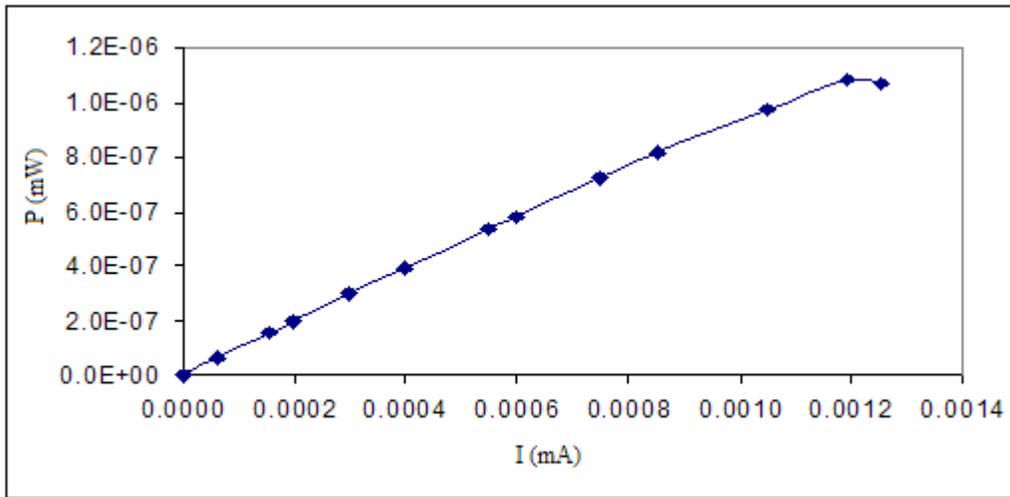


Figura 3.62 Curva I vs P para los valores promedios de los experimentos, con cultivo sin adición de ditionita de sodio e intensidad luminosa de  $150 \mu\text{E}/\text{m}^2.\text{s}$

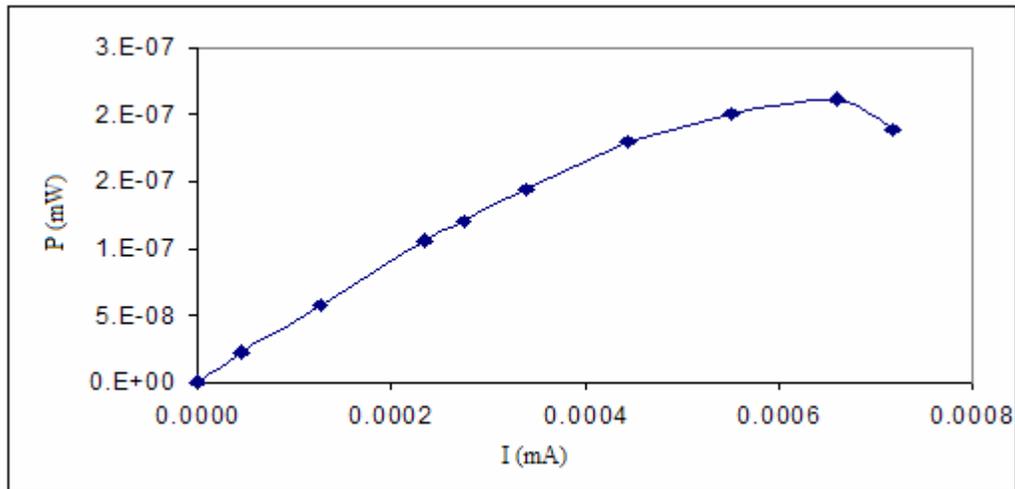


Figura 3.63 Curva I vs P para los valores promedios de los experimentos, con cultivo sin adición de ditionita de sodio e intensidad luminosa de  $112 \mu\text{E}/\text{m}^2.\text{s}$

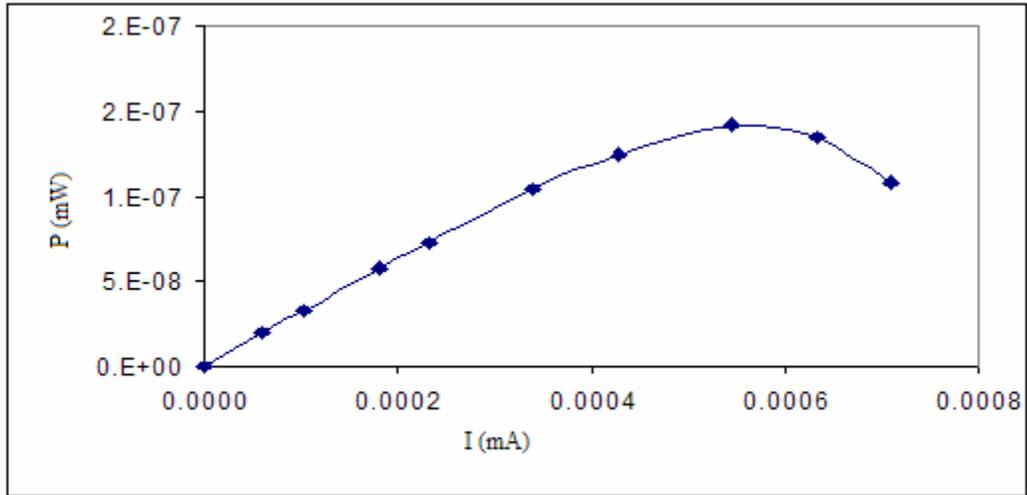


Figura 3.64 Curva I vs P para los valores promedios de los experimentos, con cultivo sin adición de ditionita de sodio e intensidad luminosa de  $75 \mu\text{E}/\text{m}^2.\text{s}$

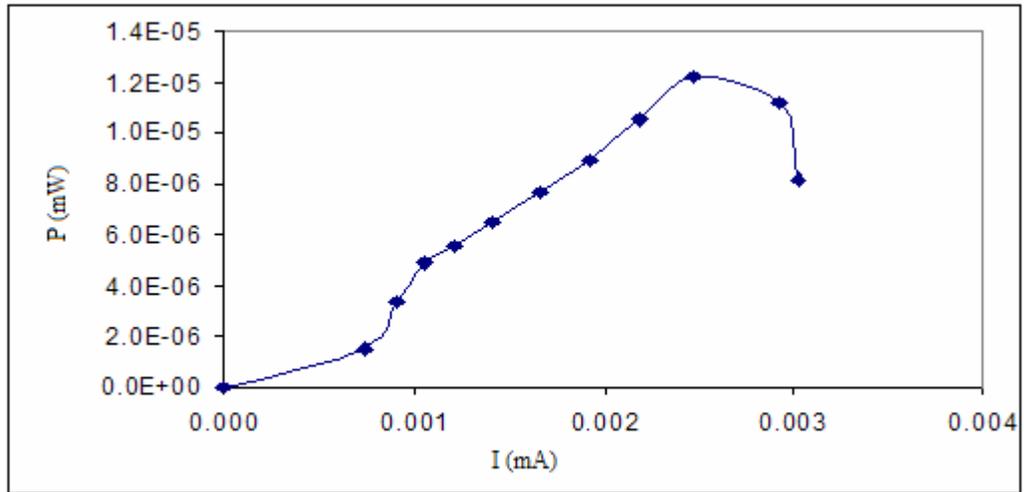


Figura 3.65 Curva I vs P para los valores promedios de los experimentos, con cultivo con adición de 2 g de ditionita de sodio e intensidad luminosa de  $150 \mu\text{E}/\text{m}^2.\text{s}$

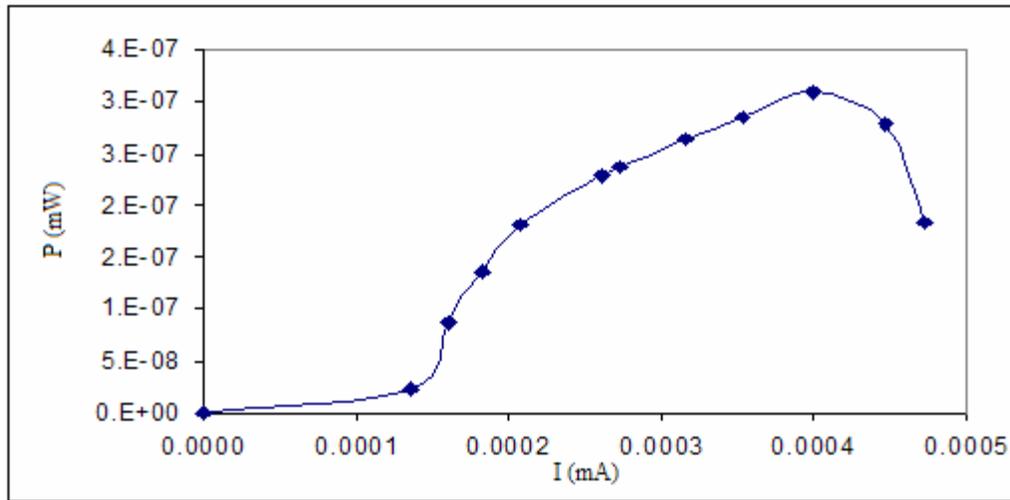


Figura 3.66 Curva I vs P para los valores promedios de los experimentos, con cultivo con adición de 2 g de ditionita de sodio e intensidad luminosa de  $112 \mu\text{E}/\text{m}^2.\text{s}$

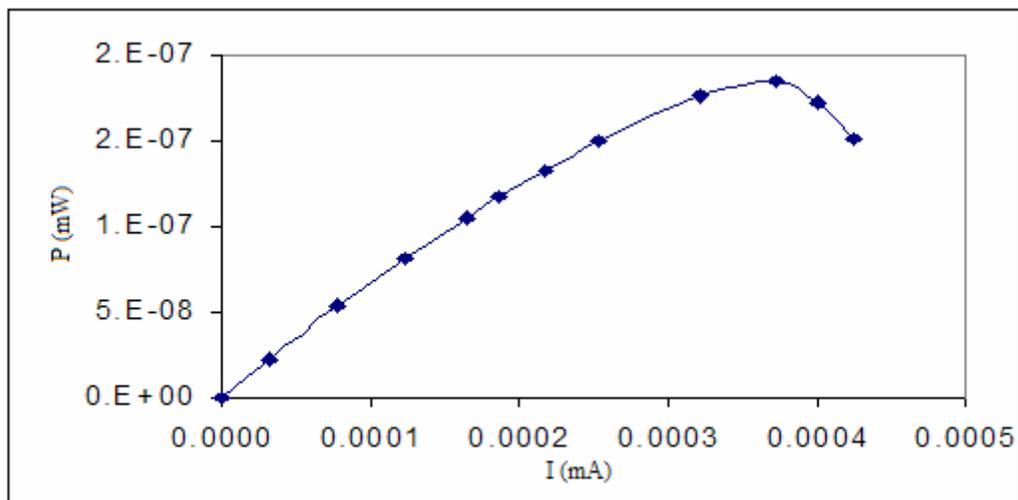


Figura 3.67 Curva I vs P para los valores promedios de los experimentos, con cultivo con adición de 2 g de ditionita de sodio e intensidad luminosa de  $75 \mu\text{E}/\text{m}^2.\text{s}$

En las Figuras de la 3.62 a 3.67, se observa que a medida que aumenta la corriente eléctrica, aumenta la potencia hasta un valor máximo, a partir del cual disminuye para pequeñas

disminuciones de corriente. A medida que aumenta la intensidad luminosa incidente, aumentan los valores de la potencia y a su vez estos son mayores en el caso que se añaden los 2 g de ditionita de sodio. Se calcula la Eficiencia de la Celda y con ésta y la potencia de salida de la celda, se determina la potencia de entrada, mientras que con los valores experimentales de  $I$  ( $\mu\text{A}$ ), se determinan los flujos de hidrógeno usados por la celda.

A la potencia máxima, con la corriente máxima (mA), para cada caso experimental estudiado, se calcula la densidad de corriente ( $\text{mA}/\text{m}^2\cdot\text{s}$ ) y a partir de la ecuación de regresión obtenida, se determina la Eficiencia de Faraday. Con este dato y el flujo de hidrógeno usado por la celda, se calcula el flujo de hidrógeno a la entrada, que es el generado por los microorganismos fotosintéticos. Además se calcula el flujo de hidrógeno generado por los microorganismos por g de biomasa (Tablas 3.16 y 3.17) (Juantorena et al., 2005).

Tabla 3.16 Resumen de Eficiencias de Faraday

SPI-N ( $\mu\text{E}/\text{m}^2\cdot\text{s}$ )	Imáx (mA)	Dens.corriente (x)(mA/cm <sup>2</sup> )	EficFaraday(y) (%)
150	$1.19 \times 10^{-3} \pm 5.77 \times 10^{-4}$	$7.46 \times 10^{-5}$	1.400
112	$6.60 \times 10^{-4} \pm 5.92 \times 10^{-5}$	$4.12 \times 10^{-5}$	1.389
75	$6.33 \times 10^{-4} \pm 2.60 \times 10^{-5}$	$3.96 \times 10^{-5}$	1.389
SPI-DS ( $\mu\text{E}/\text{m}^2\cdot\text{s}$ )			
150	$2.48 \times 10^{-3} \pm 3.00 \times 10^{-4}$	$1.55 \times 10^{-4}$	1.426
112	$4.00 \times 10^{-4} \pm 9.07 \times 10^{-4}$	$2.50 \times 10^{-5}$	1.384
75	$3.72 \times 10^{-4} \pm 1.85 \times 10^{-5}$	$2.33 \times 10^{-5}$	1.383

Tabla 3.17 Resumen de los flujos de hidrógeno por gramo de biomasa seca final

SPI-N ( $\mu\text{E}/\text{m}^2\cdot\text{s}$ )	H <sub>2</sub> usado (kg/h)	H <sub>2</sub> entrada (kg/h)	H <sub>2</sub> entrada(kg/h)/ g de biomasa
150	$4.49 \times 10^{-11}$	$3.23 \times 10^{-9}$	$1.54 \times 10^{-8}$
112	$2.48 \times 10^{-11}$	$1.79 \times 10^{-9}$	$8.53 \times 10^{-9}$
75	$2.38 \times 10^{-11}$	$1.72 \times 10^{-9}$	$8.19 \times 10^{-9}$
SPI-DS ( $\mu\text{E}/\text{m}^2\cdot\text{s}$ )			
150	$9.31 \times 10^{-11}$	$6.62 \times 10^{-9}$	$3.15 \times 10^{-8}$
112	$1.50 \times 10^{-11}$	$1.09 \times 10^{-9}$	$5.19 \times 10^{-9}$
75	$1.40 \times 10^{-11}$	$1.01 \times 10^{-9}$	$4.83 \times 10^{-9}$

SPI-N: *Spirulina maxima* sin adición de ditionita de sodio

SPI-DS: *Spirulina maxima* con adición de 2 g de ditionita de sodio

Imáx : intensidad de corriente

Dens. Corriente: densidad de corriente

Efic. Faraday: Eficiencia de Faraday

H<sub>2</sub>usado: flujo de hidrógeno usado por la PEMFC

H<sub>2</sub>entrada: flujo de hidrógeno de entrada a la PEMFC

Se puede observar que las mayores Eficiencias de Faraday obtenidas, corresponden a la mayor intensidad luminosa incidente de 150  $\mu\text{E}/\text{m}^2.\text{s}$  y es mayor en el caso en el que se añaden 2 g de ditionita de sodio, por lo que su adición tiene un efecto favorable y contribuye a un aumento en el flujo de hidrógeno que entra a la celda, además se obtiene la mayor relación de flujo de hidrógeno por g de biomasa.

### 3.4.2.2 Conclusiones

1. A mayor intensidad luminosa incidente, es más rápido el aumento de la temperatura del cultivo dentro del bioreactor, pero ésta se mantiene constante, durante el tiempo de experimentación, manteniéndose en agitación y los valores alcanzados no ocasionan daños a la calidad del cultivo.
2. Los valores del potencial de la celda (mV) obtenidos van aumentando a medida que aumenta la intensidad luminosa incidente, tanto cuando no se añade ditionita de sodio, como cuando se añaden 2 g de ditionita de sodio, siendo mayores los valores alcanzados en el último caso. Esto permite afirmar que existe un efecto favorable por la inclusión del agente reductor en el proceso, ya que la hidrogenasa es sensible al oxígeno y éste permite inhibir su producción y por lo tanto favorecer la producción de hidrógeno.
3. Los mayores valores de potencia máxima (mW), son alcanzados cuando se añaden los 2 g del agente reductor y a su vez se hacen mayores mientras va aumentando la intensidad luminosa incidente.
4. Los mayores flujos de hidrógeno que entran a la PEMFC, son obtenidos a la mayor intensidad luminosa incidente (150  $\mu\text{E}/\text{m}^2.\text{s}$ ), siendo de  $6.62 \times 10^{-9}$  kg/h.
5. La mayor Eficiencia de Faraday y la mayor relación de flujo de hidrógeno por g de biomasa, corresponden a la mayor intensidad luminosa incidente, de 150  $\mu\text{E}/\text{m}^2.\text{s}$  y al caso en el que se añaden 2 g de ditionita de sodio, por lo que su adición tiene un efecto favorable y contribuye a un aumento en el flujo de hidrógeno que entra a la celda.

### 3.5 Determinación de la eficiencia energética de la producción de hidrógeno

Realizamos la determinación de la eficiencia de la producción de hidrógeno, por los microorganismos (*Spirulina maxima* 2342) con los datos de los resultados de los experimentos, descritos en el epígrafe 3.4, para el caso en que se añade al cultivo 2 g de ditionita de sodio, donde se obtuvieron las mayores producciones de hidrógeno en kg/h y se consideraron tres intensidades luminosas incidentes en el bioreactor: 150, 112 y 75  $\mu\text{E}/\text{m}^2\cdot\text{s}$ , que equivalen a 185, 135 y 90  $\text{W}/\text{m}^2$ .

La eficiencia de la producción de hidrógeno ( $\eta_{\text{H}_2}$ ) (Akkerman et al., 2002), la definimos como:

$$\eta_{\text{H}_2} = \frac{H_2 \text{ prod. m.o} * EH_2}{Elum. abs. * A_b} \quad (3.28)$$

$H_2 \text{ prod. m.o}$ : hidrógeno producido por los microorganismos (kg/h)

$EH_2$ : contenido de energía del hidrógeno (39.4 kW.h/kg de hidrógeno)

$Elum. abs.$ : energía luminosa absorbida ( $\text{W}/\text{m}^2$ )

$A_b$ : área de incidencia luminosa al bioreactor ( $\text{m}^2$ )

Consideraciones que se tienen en cuenta:

1. Se absorbe el 80 % de la intensidad luminosa incidente al bioreactor, a través del vidrio del bioreactor.
2. El área de incidencia luminosa al bioreactor es de  $9.38 \times 10^{-3} \text{ m}^2$ .

Tabla 3.18 Resumen de la eficiencia de la producción de hidrógeno obtenido

Elum.abs. ( $\text{W}/\text{m}^2$ )	$\text{H}_2 \text{ prod. m.o}$ Kg/h	$\eta_{\text{H}_2}$	$\eta_{\text{H}_2}$ (%)
148	$6.62 \times 10^{-9}$	$1.88 \times 10^{-4}$	0.02
108	$1.09 \times 10^{-9}$	$4.24 \times 10^{-5}$	0.004
72	$1.01 \times 10^{-9}$	$5.89 \times 10^{-5}$	0.006

$\text{H}_2 \text{ prod. m.o}$ :  $\text{H}_2$  producido por los microorganismos

Los resultados obtenidos nos indican que la mayor eficiencia de la producción de hidrógeno fue obtenida para el caso de la mayor intensidad luminosa incidente ( $150 \mu\text{E}/\text{m}^2 \cdot \text{s}$  ó  $185 \text{ W}/\text{m}^2$ ).

Se obtienen eficiencias cercanas a las obtenidas a otras cianobacterias como por ejemplo para *A. Cylindrica* en cultivos a cielo abierto de 0.2 % (Miyamoto et al., 1979), sin embargo resulta muy inferior a las obtenidas por microalgas verdes que llegan hasta el 20 % y para bacterias fotoheterotróficas que llegan desde 0.1 hasta 10 % basadas en la PAR (Greenbaum, 1988).

### **3.5.1 Conclusiones**

Se obtiene la mayor eficiencia de la producción de hidrógeno, 0.02 %, para el caso de intensidad luminosa incidente de  $150 \mu\text{E}/\text{m}^2 \cdot \text{s}$ , cuando se añaden 2 g de ditionita de sodio, luego del proceso de anaerobiosis-oscuridad al cultivo de *Spirulina maxima*, esta eficiencia puede ser comparada con la obtenida en otras cianobacterias y bacterias heterotróficas, pero sus valores bajos podrían ser aumentados, mejorando el método y las condiciones bajo las cuales se produce el hidrógeno fotosintético.

# CONCLUSIONES GENERALES

## CONCLUSIONES GENERALES

1. Se mantuvieron 4 cepas de microorganismos fotosintéticos: *Scenedesmus obliquus* 393, 2015, 2016 y *Spirulina maxima* 2342, provenientes de la colección de la Universidad de Texas de E.U; en buen estado de conservación y cultivos unialgales.

2. Fue desarrollada una instalación experimental que permite alcanzar volúmenes de cultivo suficientes para la experimentación (hasta 60 litros) y puede ser empleada en el cultivo de otros microorganismos.

3. Fue seleccionada la cepa de *Spirulina maxima* 2342 para llevar a cabo los experimentos de producción de hidrógeno.

- La PEMFC alimentada con hidrógeno procedente de *Spirulina maxima* 2342, puede generar una mayor cantidad de energía eléctrica por unidad de masa, comparada con *Scenedesmus obliquus* 393.

- Se necesitaría menor volumen de cultivo en el caso de *Spirulina* para el funcionamiento de la PEMFC.

- Se pueden alcanzar mayores concentraciones de biomasa de *Spirulina* en menor tiempo comparada con *Scenedesmus*, es decir se reproduce en menor tiempo.

- *Spirulina* es menos vulnerable a la contaminación por sus altos valores de pH en el medio de cultivo.

-De *Spirulina* puede obtenerse biomasa para alimentación tanto animal como humana, extractos de bioproductos, importantes en la rama químico-farmacéutica y para el tratamiento y descontaminación de aguas residuales, estos aspectos pueden ser considerados y nos permitirán proponer en un futuro, sistemas integrales donde pueda obtenerse energía (hidrógeno) y además emplear la biomasa en alguno de los usos anteriormente mencionados, lo cual sería una posibilidad práctica futura, con ventajas económicas y ambientales.

4. Se detectó con éxito el hidrógeno generado por *Spirulina maxima* 2342, empleando un cromatógrafo de gases con detector de conductividad térmica (CG-TCD), para la misma característica de la biomasa (concentración) e intensidad luminosa de 150  $\mu\text{E}/\text{m}^2\cdot\text{s}$ .

- Se realizaron curvas de calibración, con presiones de inyección total de gas estándar, entre 0 y 40 mm de Hg y entre 0 y 10 mm de Hg.
- Se propuso una metodología que permitió llegar a la cuantificación del hidrógeno, generado por los microorganismos fotosintéticos, aplicando vacío al bioreactor con las muestras de cultivo.
- La cuantificación del hidrógeno generado por *Spirulina maxima* 2342, a partir de los datos obtenidos en el cromatógrafo de gases con TCD, fue realizada con las condiciones descritas en la metodología. El tiempo en el que eluye el gas hidrógeno fue de  $1.48 \pm 0.03$  minutos, con presiones de inyección total de gas estándar entre 0 y 10 mm de Hg.
- Las condiciones de vacío empleadas para el sistema de colección, no afectaron la estructura de las células, así que el método propuesto se puede emplear confiablemente para trabajos en el futuro.
- El sistema de colección se debe mejorar, para reducir al mínimo la contaminación del aire en las muestras y mejorar la eficiencia en la producción de hidrógeno.

5. Se determinó el flujo de hidrógeno generado por *Spirulina maxima* 2342, a partir de la generación de energía eléctrica en una PEMFC, bajo diferentes condiciones experimentales.

- Se propuso una metodología para la determinación del flujo de hidrógeno, generado por los microorganismos fotosintéticos, que podría ser evaluada con otros microorganismos.
- Se obtienen como resultado curvas de potencia, que concuerdan con el comportamiento característico de las PEMFC.
- Se obtienen los mayores valores de potencia máxima (mW), cuando se añaden 2 g del agente reductor, ditionita de sodio y a su vez se hacen mayores mientras va aumentando la intensidad luminosa incidente.
- Los mayores flujos de hidrógeno que entran a la PEMFC, son obtenidos a la mayor intensidad luminosa incidente ( $150 \mu\text{E}/\text{m}^2.\text{s}$ ), siendo de  $6.62 \times 10^{-9}$  kg/h.
- La mayor Eficiencia de Faraday y la mayor relación de flujo de hidrógeno por g de biomasa, corresponden a la mayor intensidad luminosa incidente de  $150 \mu\text{E}/\text{m}^2.\text{s}$  y al caso en el que se añaden 2 g de ditionita de sodio, por lo que su adición tiene un efecto favorable ya que la hidrogenasa es sensible al oxígeno y éste permite inhibir su producción y por lo tanto favorecer la producción de hidrógeno y esto contribuye a un aumento en el flujo de hidrógeno que entra a la celda.

6. Se determinó la eficiencia energética de la producción de hidrógeno, con los microorganismos fotosintéticos escogidos (*Spirulina maxima* 2342), bajo las condiciones establecidas.

- Se obtiene que la mayor eficiencia de la producción de hidrógeno, 0.02 % y resulta cuando la intensidad luminosa incidente es de  $150 \mu\text{E}/\text{m}^2\cdot\text{s}$  al añadir 2 g de ditionita de sodio, luego del proceso de anaerobiosis-oscuridad al que se somete el cultivo y esta eficiencia puede ser comparada con la obtenida en otras cianobacterias y bacterias heterotróficas, pero sus valores bajos podrían ser aumentados, mejorando el método y las condiciones bajo las cuales se produce el hidrógeno fotosintético.

## RECOMENDACIONES

Los resultados obtenidos en el presente trabajo nos permiten proponer las siguientes recomendaciones:

1. Realizar experimentos de detección de hidrógeno en otras cepas de microorganismos fotosintéticos, aprovechando su capacidad de emplear la luz solar y el agua para su generación.
2. Evaluar la metodología empleada para determinar el flujo de hidrógeno producido por los microorganismos, a partir de los datos obtenidos por una PEMFC en otras cepas y comparar los resultados obtenidos y las eficiencias en la producción de hidrógeno.
3. Estudiar otros métodos de anaerobiosis-oscuridad con la inclusión de otras sustancias inhibidoras del oxígeno, que permitan eliminarlo temporalmente, para aumentar las eficiencias en la producción de hidrógeno.
4. Aislar y caracterizar la enzima que permite la generación de hidrógeno en *Spirulina maxima* 2342, la cual aun no ha sido reportada en la literatura internacional.
5. Proponer, diseñar y evaluar un sistema integral a partir del uso de cultivos de *Spirulina maxima*, como microorganismo fotosintético, donde se pueda realizar el tratamiento de residuales, obtener biomasa que puede tener uso en la alimentación animal como suplemento proteico y vitamínico o en la acuicultura, obtener energía de hidrógeno y emplearla en una PEMFC para la generación de electricidad, así como reciclar las aguas tratadas. Este sistema podría resultar factible económicamente si son optimizados algunos parámetros.

## ARTÍCULOS

1. **A.U. Juantorena;** P. J. Sebastian, R. Vázquez Duhalt and R. Tinoco Valencia, "Photobiological hydrogen production employing *Spirulina maxima*", SNMES03-02-111. Journal of New Materials for Electrochemical Systems. 2003. V. 5, p 49. (Artículo completo)
2. **A.U. Juantorena;** P.J. Sebastian, S. Gamboa S., O. Lastres D. and A. Bustos.: "Determination of the hydrogen production by *Spirulina maxima* through the electricity generation in a PEMFC". Journal of New Materials For Electrochemical Systems. (Artículo completo aceptado en abril del 2005).
3. **A.U. Juantorena;** E. Santoyo, P.J. Sebastian, S. Gamboa S., O. Lastres D., D. Sánchez-Escamilla and A. Bustos. : "Hydrogen production employing *Spirulina maxima* 2342: A chemical analysis". International Journal of Hydrogen Energy. 2007 (Artículo completo in Press).
4. **A.U. Juantorena;** R. Tinoco Valencia P. J. Sebastian and R. Vázquez Duhalt: "Hydrogen bioproduction using *Spirulina maxima*". Proceedings XII International Symposium on Solar-Hydrogen-Fuel Cells-7 (International Materials Research Congress 2003). 17-21 de Agosto. 2003. Cancún. México. (Resumen)
5. **A.U. Juantorena;** R. Tinoco Valencia P. J. Sebastian, R. Vázquez Duhalt: "Producción biológica de hidrógeno a partir de *Spirulina maxima* y su uso en una Celda de combustible tipo PEM". Memorias de la XII Semana Nacional de Energía Solar. 6-10 de Octubre 2003. Chihuahua. México. TSIA 13-01. (Artículo completo)
6. **A.U. Juantorena;** R. Tinoco Valencia P. J. Sebastian and R. Vázquez Duhalt "Photobiological hydrogen production-*Spirulina maxima*". Proceedings 2nd ICPB. The Development and Perspectives of Biotechnology Applied to the Oil Industry. Petroleum Biotechnology Research Program. 5-7. Nov. 2003. DF México. ISBN 968-489-018-4. (Resumen in extenso)

7. **A.U. Juantorena;** P. J. Sebastian, A. Bustos G., R. Guevara. J. and R. Vázquez D.: “Photobiological hydrogen production using *Scenedesmus obliquus*”. Proceedings XIII International Symposium on Solar-Hydrogen-Fuel Cells-8 (International Materials Research Congress 2004). 22-26 de Agosto 2004. Cancún. México. (Resumen)
  
8. **A.U. Juantorena;** P.J. Sebastian,., Santoyo, E.; Gamboa S. A., Lastres O. D. Sánchez-Escamilla, D.; A. Bustos. : “Characterzation of the gas generated by *Spirulina maxima* 2342”. Proceedings XIV International Symposium on Solar-Hydrogen-Fuel Cells-9 (International Materials Research Congress 2005). 21-25 de Agosto 2005. Cancún. México. (Resumen)
  
9. **A.U. Juantorena;** P.J. Sebastian, S. Gamboa S., O. Lastres D., A. Bustos.: “Metodología para la determinación de los flujos de hidrógeno generados por microorganismos fotosintéticos”. XXIX Semana Nacional de Energía Solar. 3 al 7 de octubre 2005. Tuxtla Gutiérrez. Chiapas. México TSIA 01. (Artículo completo)
  
10. **A.U. Juantorena;** P.J. Sebastian, S. Gamboa S., O. Lastres D., A. Bustos.: “A methodology to determine the hydrogen flow a photosynthetic bioreactor”. Memorias del 2do Congreso Europeo del Hidrógeno. 2do Encuentro Empresarial del Hidrógeno y las Pilas de Combustible. 22-25 Noviembre 2005.Zaragoza. España. (Resumen in extenso)

## **PARTICIPACIÓN EN CONGRESOS**

- **ACEPTACIONES DE TRABAJOS (2003)**

1. II Congreso de Estudiantes. CIE-UNAM. 29-30 de Mayo 2003. Temixco. Morelos. México.
2. 5th International Symposium on New Materials for Electrochemical Systems. July 6-11. 2003. Montreal. Canadá.
3. XII International Materials Research Congress. 17-21 de Agosto 2003. Cancún. México.
4. 2nd ICPB. The Development and Perspectives of Biotechnology Applied to the Oil Industry. Petroleum Biotechnology Research Program. 5-7 de Noviembre. 2003. DF México.
5. XII Semana Nacional de Energía Solar. 6-10 de Octubre 2003. Chihuahua. México.

- **PARTICIPACIÓN (2003)**

1. II Congreso de Estudiantes. CIE-UNAM. 29-30 de Mayo 2003. Temixco. Morelos. México.
2. XII International Materials Research Congress. 17-21 de Agosto 2003. Cancún. México.
3. 2nd ICPB. The Development and Perspectives of Biotechnology Applied to the Oil Industry. Petroleum Biotechnology Research Program. 5-7 de Noviembre. 2003. DF México.

- **ACEPTACIONES DE TRABAJOS (2004)**

1. III Congreso de Estudiantes. CIE-UNAM. 20-21 Mayo 2004. Temixco. Morelos. México.
2. XIII International Materials Research Congress. 22-26 de Agosto 2004. Cancún. México.

- **PARTICIPACIÓN (2004)**

1. III Congreso de Estudiantes. CIE-UNAM. 20-21 Mayo 2004. Temixco. Morelos. México.
2. XIII International Materials Research Congress. 22-26 de Agosto 2004. Cancún. México.

- **ACEPTACIONES DE TRABAJOS (2005)**

1. IV Congreso de Estudiantes. CIE-UNAM. 19-20 Mayo 2005. Temixco. Morelos. México.
2. XIV International Materials Research Congress. 21-25 de Agosto 2005. Cancún. México.
3. XXIX Semana Nacional de Energía Solar. 3 al 7 de octubre 2005. Tuxtla Gutiérrez. Chiapas. México.
4. XVIII International Congress of Mechanical Engineering. 6-11 Noviembre 2005. Ouo Preto, MG. Brasil.
5. 2do Congreso Europeo del Hidrógeno. 2do Encuentro Empresarial del Hidrógeno y las Pilas de Combustible. 22-25 Noviembre 2005.

- **PARTICIPACIÓN (2005)**

1. IV Congreso de Estudiantes. CIE-UNAM. 19-20 Mayo 2004. Temixco. Morelos. México.
2. 2do Congreso Europeo del Hidrógeno. 2do Encuentro Empresarial del Hidrógeno y las Pilas de Combustible. 22-25 Noviembre 2005. Zaragoza. España.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Akkerman, I.; Janssen, M.; Rocha, J.; Wijffels, R. 2002: *International Journal of Hydrogen Energy*. 27, 1283-1289.
- Amirav, A. 2001: *American Laboratory*. October. 28-34.
- Aoyama, K.; Uemura, J.; Miyake, I. and Asada, Y. 1997: *Journal Fermentation Bioengineering*. 83, 17-20.
- Appleby, A. 1999: *Scientific American*. 52, 276.
- Arnon D. 1949: *Plant Physiology*. 24, 1-15.
- Asada, Y. and Kawamura, S. 1986: *Journal Fermentation Technology*. 64, 553-556.
- Benemann, J. and Weare, N. 1974: *Science*. 184, 174-175.
- Beneman, J. 1996: *Nature Biotechnology*. Vol. 14.
- Beneman, J. 1997: *International Journal of Hydrogen Energy*. 22, 979-987.
- Beneman, J. 1998: *IEA Technical Report*. 35 pp.
- Blanca, A. 2001: *Manual de operación Espectrómetro de masas DYCOR*. IBT-UNAM.
- Borodin, V.; Tsygankov, A.; Rao, K.; Hall, D. 2000: *Biotechnology and Bioengineering*. Vol. 69 (5), 478-485.
- Czernik, S.; French, R.; Feik, C. and Chornet, E. 2000: *Proceedings of the DOE Hydrogen Program Review*. NREL/CP-570-28890.
- Debabrata, D.; Nejat, T. 2001: *International Journal of Hydrogen Energy*. 26, 13-28.
- De Lacey, A.; Hatchikian E.; Volbeda, A.; Frey, M.; Fontecilla-Camps, J.; Fernández, V. 1997: *Journal American Chemical Society*. 119, 7181-7189.
- De Lacey, A.; Santamaría, E.; Hatchikian, E.; Fernández, V. 2000: *Biochimics et Biophys Acta*. 1481, 371-380.
- De Lacey, A.; Stadler C.; Cavazza, C.; Hatchikian, E.; Fernández, V. 2000: *Journal American Chemical Society*. 122, 11232-11233.
- De Lacey, A.; Detcheverry, M.; Moiroux, J.; Bourdillon, C. 2001: *Biotechnology Bioenergy*. 68, 1-10.

- Durand, H-Chastel. 1980: Algae Biomass. Ed. Shelef and J. Soeder. Elsevier.
- El-Shishtawy RMA.; Kitajima, Y.; Otsuka, S.; Kawasaki, S.; Morimoto, M. 1998: Zaborsky OR. Ed. Biohydrogen. London. Plenum Press. 117-38.
- Fedler, C. and Parker, N. 1993: Paper No. 936056. An ASAE/CSAE Meeting presentation.
- Freewantle, M. 2002: Science and Technology. July 22. <http://PUBS.ACS.ORG/CEN>
- Gaffron, H. 1939: American Journal Botany. 27, 273-283.
- Gaffron, H. and Rubin, J. 1942: Genetic Physiology. 26, 219-240.
- Ghirardi, M.; Zhang, L.; Lee, J.; Flynn, T.; Seibert, M.; Greenbaum, E. and Melis, A. 2000a: Review. Elsevier TIBTECH Science Ltd. Vol.18, 506-511.
- Ghirardi, M.; Kosourov, S.; Tsygankov, A.; Seibert, M. 2000b: Proceedings of the DOE Hydrogen Program Review. NREL/CP-570-28890.
- Giddings, J. 1991: Unified Separation Science. Wiley-Interscience. USA.
- Gosselink, J. 2002: International Journal of Hydrogen Energy. 27, 1125-1129.
- Greenbaum, E. et. al. 1995: Nature. 376, 438-441.
- Greenbaum, E. 1988: Biophysical Journal. 54, 365-8.
- Gross, W. and Pulz, O. 2004: Applied Microbiology and Biotechnology. Mini-Review. 25 pp.
- Healey, F. 1970: Plant (Berlin) 91, 220-226.
- Hill, H. and Mc Minn; D. 1992: Detectors for Capillary Chromatography in Chemical Analysis Series Wiley-Interscience. USA. Vol. 121.
- Jackson, D. and Elims, J. 1996: Reports Mass. State Board Health p 410.
- Janssen, M.; Winter, M.; Tramper, J.; Mur, L.; Snel, J.; Wijffels, R. 2000: Journal of Biotechnology. 78, 123-137.
- Janssen, M.; Bresser, L.; Baijens, T.; Tramper, J.; Mur, L.; Snel, J.; Wijffels, R. 2000-1: Journal of Applied Phycology. 12, 225-237.
- Jorquera, O.; Hernández, J.; Herrera, L. 2001: Ciencia Abierta. Universidad de Chile.
- Juantorena, A. P.J. Sebastian; Gamboa, S.; Lastres, O.; Bustos, A. 2006: New Materials for Electrochemical Systems. (accepted)

- Juantorena, A. P.J. Sebastian; Santoyo, E.; Gamboa, S.; Lastres, O.; Sánchez, D.; Bustos, A. 2007: *International Journal of Hydrogen Energy*. (In Press)
- Kordesh, K.; Simader, G. 1995: *Chemical Review*. 95.191.
- Kosaric, N., Nguyen, N. and Bergongnou, M., 1974: *Biotechnology and Bioengineering*. 16 (7), 881-896.
- Kumazawa S. and Mitsui, A., 1981: *International Journal of Hydrogen Energy*. 6, 339-348.
- Kumazawa, S. and Mitsui, A., 1994: *Biotechnology and Bioengineering*, 44, 854-858.
- Larminie, J. and Dicks, A. 2000: *Fuel Cell Systems Explained*. John Wiley and Sons, LTD. Oxford Brookes University. UK.
- Lindblad, P.; Asada, Y.; Beneman, J.; Hallenbeck, P.; Mellis, A.; Miyake, J.; Seibert, M.; Skulberg, O. 2000: *IEA Hydrogen Agreement, Task 15: Photobiological Hydrogen Production—An International Collaboration*.
- Lee, J.; Mets, L.; Blankinship, S. and Greenbaum, E. 1999: *Proceedings of the DOE Hydrogen Program Review*. NREL/CP-570-26938.
- Markov, S.; Weaver, P. and Seiber, M. 1996: *Proceedings of the 11<sup>th</sup> World Hydrogen Conference*. Germany. 2619-2624.
- Melis, A. and Zhang, L. 1999: *Proceedings U.S. DOE Hydrogen Program Review NREL/CP-570-26938*.
- Melis, A.; Zhang, L.; Foriester, M.; Ghirardi, M.; Seibert, M. 2000: *Plant Physiology*. Vol.122, 127-135.
- Melis, A.; Happe, T. 2001: *Plant Physiology*. 127, 740-748.
- Miura, Y. et. al. 1986: *Agricultural Biological Chemical*. 50, 2837-2844.
- Mitsui, A. et al. 1986: *Nature*. 323,720-722.
- Miyake, M.; Sekine, M.; Vasilieva, L.1998: *Zaborsky OR. Ed. Biohydrogen*. London. Plenum Press. 81-86.
- Miyamoto, K.; Hallenbeck, P.; Beneman, J. 1979: *Journal Fermentation Technology*. 57, 287-293.
- Morita, M.; Watanabe, Y; Saiki, H. 2000: *Applied Biochemistry and Biotechnology*. Vol. 87, 203-218.

- Morita, M.; Watanabe, Y.; Saiki, H. 2000-1: *Biotechnology and Bioengineering*. Vol. 69 (6), 693-698.
- Morita, M., Watanabe, Y., Saiki, H. 2001: *Biotechnology and Bioengineering*. Vol. 74 (6), 466-475.
- Moreira, J. 2003: Tesis para obtener el Grado de Doctor en Ingeniería (Energía). CIE. UNAM.
- Nicolet, Y.; De Lacey, A.; Vernede, X.; Fernández, V.; Hatchikian E.; Fontecilla-Camps J. 2001: *Journal American Chemical Society*. 123, 1596-1601.
- Ogawa, T. and Terui, G. 1970: *Journal Fermentation Technology*. 48, 361-367.
- Oh, Y.; Seol, E.; Kim, J.; Park, S. 2003: *International Journal of Hydrogen Energy*. 28 (12), 1353-1359.
- Ooshima, H.; Takakuwa, S.; Katsuda, T.; Okuda, M. 1998: *Journal Fermentation Bioengineering*. 85 (5) 70-74.
- Oswald, W. 1977: *Handbook of Microbiology*. Cleveland, Ohio: CRC Press.
- Pattabi, M.; Castellanos, R.; Castillo, R.; Ocampo, A.; Sebastian, P.; McClure, J. and Mathew, X. 2001: *International Journal of Hydrogen Energy*. 26, 171.
- Polle, J.; Beneman, J.; Tanaka, A.; Melis, A. 2000: *Proceeding of the Hydrogen Program Review, NEREL/CP-570-28890*.
- Richmond, A. 1986: *Handbook of Microalgal mass culture*. CRC Press. Boca Ratón. Florida. 203-223.
- Rocheleau, R.; Turn, S.; Nemoto, Y.; Zaborsky, O.; Radway, J. 1999: *Proceeding of the Hydrogen Program Review, NEREL/CP-570-26938*.
- Santoyo, E.; Verma, S.P.; Nieva, D. and Portugal, E. 1991: *Journal of Volcanology and Geothermal Research*. Vol. 47, 161-181.
- Santoyo, E. and Verma, S.P. 2003: *Journal of Chromatography A*. Vol. 997 (1-2), 171-182.
- Sasaki, K. 1998: Zaborsky OR. Ed. *Biohydrogen*. London. Plenum Press. 113-175.
- Scott, R. 1995: *Techniques and Practice of Chromatography*. Vol. 70. *Chromatographic Science Series*. Marcel Dekker. USA.
- Schomburg, G. 1990: *Gas Chromatography: A Practical Course*. VCH. Germany.
- Schulz, R., 1996: *Journal Marine Biotechnology*. 4, 16-22.

- Sebastian, P.J.; Mathew, X. and Turner J. 1999: La Revista Solar. ANES. ISES. 39.
- Sebastian, P.J. and Rodríguez, F. 2000: Surface Engineering. 16, 43.
- Sebastian P.J. 2000: International Journal of Hydrogen Energy. 25, 255.
- Sebastian, P.J.; Ocampo, A. and Moreira, J. 2001: International Journal of Hydrogen Energy. 26, 139.
- Sebastian, P.J.; Ocampo A. and Moreira, J. 2001: Journal New Materials for Electrochemical Systems. 4, 3.
- Skoog, D. and Leary. 1994: Análisis Instrumental. 4ª Edición. McGraw-Hill. España.
- Skoog, D. Holler, F and Nieman, T. 2001. Principios de Análisis Instrumental. 5ª. McGraw-Hill. España.
- Stadler,C.; De Lacey. A.; Montet, Y.; Volbeda, A.; Fontecilla-Camps, J.; Conesa, J.; Fernández, V. 2002: Inorganic Chemical. (Press).
- Teplyako, V.; Gassanova, E.; Sostina, E.; Slepova, E.; Modigell, M.; Netrusov, A. 2002: International Journal of Hydrogen Energy. 27. 1149-1155.
- Troshina, O.; Serebryakova, L.; Sheremetieva, M.; Lindblad, P. 2002: International Journal of Hydrogen Energy. 27. 1283-1289.
- Turkarlan, S.; Yigit, D.; Aslan, K. 1998: Zaborsky OR. Ed. Biohydrogen. London. Plenum Press. 151-6.
- Ulleberg, Ø. 1998: Norwegian Konttinen P. and Lund P.D. (Eds). Vol.1, 242-249.
- US. Energy Department. 1995: DOE/GO 10095-099. DE95004024.
- US. Energy Department. 2000: Fuel Cell Handbook (5ta Ed.)
- US. Energy Department. 2001: H<sub>2</sub> Information Network. Hydrogen Frequently Asked Questions (FAQs).
- Urbina, M; Valencia, G. 1987: Probabilidad y estadística. Aplicaciones y métodos. Mc Graw Hill, 651 p. (Traducción del libro de Canavos, G.)
- Vázquez, R. 2002: Termodinámica biológica. AGT. Ed. S.A.
- Verma, S. 2004: La Estadística aplicada a la Geoquímica Analítica. Curso corto Pre-congreso. XIV Congreso Nacional de Geoquímica. Hermosillo. Sonora. México. 142p.
- Wangenstein, O. 2001: Ciencia Digital. 25. <http://www.cienciadigital.net>

Wünschiers, R.; Heide, H.; Follmann, H.; Senger, H.; Schulz, R. 1999: FEBS Letters 455. 162-164 pp.

Wünschiers, R. 2000: Journal of Biological Education 34 (4).

Wünschiers, R; Stangier, K.; Senger, H.; Schulz, R. 2001a: Current Microbiology Vol. 42. 353-360.

Wünschiers, R; Senger, H; Schulz, R. 2001b: Biochimica et Biophysica Acta 1503. 271-278.

Wünschiers, R. and Lindblad, P. 2002: International Journal of Hydrogen Energy. 27. 1131-1140.

Wykoff, D.; Davies, J.; Melis, A.; Grossman, A. 1998: Plant Physiology. 117, 129-139.

Zurrer, H.; Bachofen, R. 1979: Applied Environmental Microbiology. 37 (5), 789-881.

<http://www.geocities.com/labalmar/spirulina.html#2>

<http://www.esi.unav.es> (Libro electrónico. Ciencias de la tierra y del medio ambiente)

<http://www.eren.doe.gov/consumerinfo/refbriefs/a109.html>

<http://infoleg.mecon.gov.ar/txtnorma/dto202-2003-17.htm>

<http://latina.chem.cinvestav.mx/RLQ/tutoriales/cromatografia/Gas.htm>

# **ANEXO**

## **APLICACIÓN DE PRUEBA ESTADÍSTICA A DATOS EXPERIMENTALES**

Se tienen las muestras de datos correspondientes a los experimentos realizados en la PEMFC (epígrafe 3.4.2) y se determina para las réplicas de los grupos de datos individuales de I(mA) y U(mV), la Prueba de significación t-Student.

### Ejemplo de Comparación de datos experimentales para Grupo 1 y Grupo 2

Tabla 1. Grupo1 de I(mA) y U(mV) de la PEMFC

<b>X1</b>	<b>I(mA)</b>	<b>Y1</b>	<b>E(mV)</b>
X1	0.00	Y1	764.23
X2	0.82	Y2	660.15
X3	3.70	Y3	640.01
X4	6.45	Y4	620.25
X5	9.33	Y5	600.73
X6	12.55	Y6	580.20
X7	15.56	Y7	560.02
X8	18.54	Y8	540.82
X9	21.32	Y9	523.72
X10	25.02	Y10	500.67
X11	28.89	Y11	480.21
X12	32.05	Y12	463.70
X13	35.14	Y13	442.82
X14	39.20	Y14	395.00
X15	46.40	Y15	280.00
X16	50.10	Y16	160.00

Tabla 2. Grupo 2 de I(mA) y U(mV) de la PEMFC

<b>X2</b>	<b>I(mA)</b>	<b>Y1</b>	<b>E(mV)</b>
X1	0.00	Y1	766.77
X2	1.11	Y2	666.72
X3	2.33	Y3	660.01
X4	4.14	Y4	640.72
X5	6.94	Y5	620.39
X6	10.22	Y6	600.30
X7	13.19	Y7	580.10
X8	16.07	Y8	560.96
X9	19.37	Y9	523.04
X10	23.37	Y10	500.42
X11	27.93	Y11	485.32
X12	30.30	Y12	462.15
X13	32.41	Y13	445.53
X14	36.30	Y14	387.00
X15	41.10	Y15	280.00
X16	43.70	Y16	180.00

## Prueba t-student para $X_i$ I(mA) de ambas bases de datos

H0: No existen diferencias significativas entre las  $X_i$ .

H1: Si existen diferencias significativas entre las  $X_i$ .

X1m	19.664567
Y1m	536.8353333
sX	14.52342912
sY	118.3185684
nx1	16
ny1	16
X2m	17.653073
Y2m	545.2953333
sX	13.65767226
sY	123.8066462
nx2	16
ny2	16

$$s_x = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (X_{1i} - \bar{X}_1)^2 + \sum_{i=1}^n (X_{2i} - \bar{X}_2)^2}{(n_{X1} + n_{X2} - 2)}}$$

$s_x = 15.45879045$

**$s_x = 15.458$**

$$t_x = \frac{|\bar{X}_1 - \bar{X}_2|}{s_x \left[ \sqrt{\left( \frac{1}{n_{X1}} + \frac{1}{n_{X2}} \right)} \right]}$$

$t_x = 0.368034118$

**$t_x = 0.368$**

(VCr. t) = 2.98\*

0.01 nivel de significado

99 % de confianza

df = 14

$t_x < t_{VCr.}$  ,  $0.37 < 2.98$

VCr.

Entonces se acepta H0. No existen diferencias significativas entre las  $X_i$  para 0.01 de nivel de significado y 99 % de confianza.

### Prueba t-student para $Y_i$ U(mV) de ambas bases de datos

H0: No existen diferencias significativas entre las  $Y_i$ .

H1: Si existen diferencias significativas entre las  $Y_i$ .

$$S_Y = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (Y_{1i} - \bar{Y}_1)^2 + \sum_{i=1}^n (Y_{2i} - \bar{Y}_2)^2}{(n_{Y1} + n_{Y2} - 2)}}$$

$$S_y = 151.2204482$$

$$S_y = \mathbf{151.220}$$

$$t_y = \frac{|\bar{Y}_1 - \bar{Y}_2|}{S_Y \left[ \sqrt{\left( \frac{1}{n_{Y1}} + \frac{1}{n_{Y2}} \right)} \right]}$$

$$t_y = 0.158235832$$

$$t_y = \mathbf{0.158}$$

$$(VCr. t) = 2.98^*$$

0.01 nivel de significado

99 % de confianza

$$df = 14$$

$$t_x < t_{VCr.}, 0.16 < 2.98$$

Entonces se acepta H0. No existen diferencias significativas entre las  $Y_i$  para 0.01 de nivel de significado y 99 % de confianza.

### Comparación de datos experimentales para Grupo 1 y Grupo 3

Tabla 1. Grupo 1 de I(mA) y U(mV) de la PEMFC

<b>X1</b>	<b>I(mA)</b>	<b>Y1</b>	<b>E(mV)</b>
X1	0.00	Y1	764.23
X2	0.82	Y2	660.15
X3	3.70	Y3	640.01
X4	6.45	Y4	620.25
X5	9.33	Y5	600.73
X6	12.55	Y6	580.20
X7	15.56	Y7	560.02
X8	18.54	Y8	540.82
X9	21.32	Y9	523.72
X10	25.02	Y10	500.67
X11	28.89	Y11	480.21
X12	32.05	Y12	463.70
X13	35.14	Y13	442.82
X14	39.20	Y14	395.00
X15	46.40	Y15	280.00
X16	50.10	Y16	160.00

Tabla 3. Grupo 3 de I(mA) y U(mV) de la PEMFC

<b>X2</b>	<b>I(mA)</b>	<b>Y1</b>	<b>E(mV)</b>
X1	0.00	Y1	767.82
X2	1.18	Y2	663.59
X3	3.94	Y3	640.23
X4	6.95	Y4	620.34
X5	10.05	Y5	600.97
X6	10.79	Y6	582.99
X7	13.20	Y7	560.47
X8	15.25	Y8	544.45
X9	15.65	Y9	542.37
X10	16.95	Y10	522.36
X11	20.57	Y11	501.02
X12	23.20	Y12	484.05
X13	25.50	Y13	483.00
X14	28.20	Y14	429.00
X15	32.00	Y15	327.00
X16	34.80	Y16	220.00

### Prueba t-student para $X_i$ I(mA) de ambas bases de datos

H0: No existen diferencias significativas entre las  $X_i$ .

H1: Si existen diferencias significativas entre las  $X_i$ .

X1m	19.664567
Y1m	536.835333
sX	14.5234291
sY	118.318568
nx1	16
ny1	16

X2m	14.895467
Y2m	551.310667
sX	9.72694437
sY	104.767762
nx2	16
ny2	16

$$s_x = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (X_{1i} - \bar{X}_1)^2 + \sum_{i=1}^n (X_{2i} - \bar{X}_2)^2}{(n_{X1} + n_{X2} - 2)}}$$

$s_x = 13.66274034$

**$s_x = 13.663$**

$$t_x = \frac{|\bar{X}_1 - \bar{X}_2|}{s_x \left[ \sqrt{\left( \frac{1}{n_{X1}} + \frac{1}{n_{X2}} \right)} \right]}$$

$t_x = 0.98728743$

**$t_x = 0.987$**

(VCr. t) = 2.98\*

0.01 nivel de significado

99 % de confianza

df = 14

$t_x < t_{VCr.}$  ,  $0.99 < 2.98$

Entonces se acepta H0. No existen diferencias significativas entre las  $X_i$  para 0.01 de nivel de significado y 99 % de confianza.

### Prueba t-student para $Y_i$ U(mV) de ambas bases de datos

H0: No existen diferencias significativas entre las  $Y_i$ .

H1: Si existen diferencias significativas entre las  $Y_i$ .

$$s_Y = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (Y_{1i} - \bar{Y}_1)^2 + \sum_{i=1}^n (Y_{2i} - \bar{Y}_2)^2}{(n_{Y1} + n_{Y2} - 2)}}$$

$$s_Y = 141.5897327$$

$$s_Y = 141.590$$

$$t_y = \frac{|\bar{Y}_1 - \bar{Y}_2|}{s_Y \left[ \sqrt{\left( \frac{1}{n_{Y1}} + \frac{1}{n_{Y2}} \right)} \right]}$$

$$t_y = 0.28916239$$

$$t_y = 0.289$$

$$(VCr. t) = 2.98^*$$

0.01 nivel de significado

99 % de confianza

$$df = 14$$

$$t_x < t_{VCr.}, 0.29 < 2.98$$

Entonces se acepta H0. No existen diferencias significativas entre las  $Y_i$  para 0.01 de nivel de significado y 99 % de confianza.

### Comparación de datos experimentales para Grupo 2 y Grupo 3

Tabla 2. Grupo 2 de I(mA) y U(mV) de la PEMFC

<b>X2</b>	<b>I(mA)</b>	<b>Y1</b>	<b>E(mV)</b>
X1	0.00	Y1	766.77
X2	1.11	Y2	666.72
X3	2.33	Y3	660.01
X4	4.14	Y4	640.72
X5	6.94	Y5	620.39
X6	10.22	Y6	600.30
X7	13.19	Y7	580.10
X8	16.07	Y8	560.96
X9	19.37	Y9	523.04
X10	23.37	Y10	500.42
X11	27.93	Y11	485.32
X12	30.30	Y12	462.15
X13	32.41	Y13	445.53
X14	36.30	Y14	387.00
X15	41.10	Y15	280.00
X16	43.70	Y16	180.00

Tabla 3. Grupo 3 de I(mA) y U (mV) de la PEMFC

<b>X2</b>	<b>I(mA)</b>	<b>Y1</b>	<b>E(mV)</b>
X1	0.00	Y1	767.82
X2	1.18	Y2	663.59
X3	3.94	Y3	640.23
X4	6.95	Y4	620.34
X5	10.05	Y5	600.97
X6	10.79	Y6	582.99
X7	13.20	Y7	560.47
X8	15.25	Y8	544.45
X9	15.65	Y9	542.37
X10	16.95	Y10	522.36
X11	20.57	Y11	501.02
X12	23.20	Y12	484.05
X13	25.50	Y13	483.00
X14	28.20	Y14	429.00
X15	32.00	Y15	327.00
X16	34.80	Y16	220.00

## Prueba t-student para $X_i$ I(mA) de ambas bases de datos

H0: No existen diferencias significativas entre las  $X_i$ .

H1: Si existen diferencias significativas entre las  $X_i$ .

X1m	17.653073
Y1m	545.295333
sX	13.6576723
sY	123.806646
nx1	16
ny1	16
X2m	14.895467
Y2m	551.310667
sX	9.72694437
sY	104.767762
nx2	16
ny2	16

$$s_x = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (X_{1i} - \bar{X}_1)^2 + \sum_{i=1}^n (X_{2i} - \bar{X}_2)^2}{(n_{X1} + n_{X2} - 2)}}$$

$$s_x = 12.40225625$$

$$s_x = \mathbf{12.402}$$

$$t_x = \frac{|\bar{X}_1 - \bar{X}_2|}{s_x \left[ \sqrt{\left( \frac{1}{n_{X1}} + \frac{1}{n_{X2}} \right)} \right]}$$

$$t_x = 0.628892787$$

$$t_x = \mathbf{0.629}$$

$$(VCr. t) = 2.98^*$$

0.01 nivel de significado

99 % de confianza

$$df = 14$$

$$t_x < t_{VCr.}, 0.63 < 2.98$$

Entonces se acepta H0. No existen diferencias significativas entre las  $X_i$  para 0.01 de nivel de significado y 99% de confianza.

### Prueba t-student para $Y_i$ U (mV) de ambas bases de datos.

H0: No existen diferencias significativas entre las  $Y_i$ .

H1: Si existen diferencias significativas entre las  $Y_i$ .

$$s_Y = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (Y_{1i} - \bar{Y}_1)^2 + \sum_{i=1}^n (Y_{2i} - \bar{Y}_2)^2}{(n_{Y1} + n_{Y2} - 2)}}$$

$$S_y = 129.3189667$$

$$S_y = \mathbf{129.319}$$

$$t_y = \frac{|\bar{Y}_1 - \bar{Y}_2|}{s_Y \left[ \sqrt{\left( \frac{1}{n_{Y1}} + \frac{1}{n_{Y2}} \right)} \right]}$$

$$t_y = 0.131565635$$

$$t_y = \mathbf{0.132}$$

$$(V_{Cr. t}) = 2.98^*$$

0.01 nivel de significado

99 % de confianza

$$df = 14$$

$$t_x < t_{V_{Cr.}}, 0.13 < 2.98$$

Entonces se acepta H0. No existen diferencias significativas entre las  $Y_i$  para 0.01 de nivel de significado y 99 % de confianza.

Para todos los casos se acepta la hipótesis H0, es decir que no existen diferencias significativas entre los grupos de datos, por tanto sí se pueden mezclar para ser promediados y realizar los análisis correspondientes.

\*Tabla A1, pág. 90. Valores críticos de la distribución t-Student (Verma, S. 2004). Estos valores están tomados de la tabla F del libro de Urbina, M; Valencia, G. 1987: Probabilidad y estadística. Aplicaciones y métodos. Mc Graw Hill, 651 p. (Traducción del libro de Canavos, G.)