

**Centro de Investigación Científica y de Educación
Superior de Ensenada, Baja California**



**Programa de Posgrado en Ciencias de la Vida
Con Orientación en Biotecnología Marina**

**Efecto de las condiciones ambientales y adición de
consumidores de oxígeno sobre el crecimiento y la
producción de hidrógeno en cultivos de clorofíceas**

Tesis

que para cubrir parcialmente los requisitos necesarios para obtener el grado de
Doctor en Ciencias

Presenta:

Luis Alberto Márquez Reyes

Ensenada, Baja California, México

2016

Tesis defendida por

Luis Alberto Márquez Reyes

y aprobada por el siguiente Comité

Dra. M. del Pilar Sánchez Saavedra

Codirector del Comité

Dra. Idania Valdez Vazquez

Codirector del Comité

Dra. Elizabeth Ponce

Miembro del Comité

Dra. Ana Elena Escalante Hernández

Miembro del Comité

Dr. Alexei Fedorovich Licea Navarro

Miembro del Comité



Dra. Clara Elizabeth Galindo Sánchez

Coordinador del Posgrado en Ciencias
en Ciencias de la vida

Dra. Rufina Hernández Martínez

Directora de Estudios de Posgrado

Luis Alberto Márquez Reyes © 2016

Queda prohibida la reproducción parcial o total de esta obra sin el permiso formal y explícito del autor

Resumen de la tesis, que presenta **Luis Alberto Márquez Reyes** como requisito parcial para la obtención del grado de Doctor en Ciencias de la Vida con Orientación en Biotecnología Marina.

Efecto de las condiciones ambientales y la adición de consumidores de oxígeno sobre el crecimiento y la producción de hidrógeno en cultivos de clorofíceas

Resumen aprobado por:

Dra. M. del Pilar Sánchez Saavedra
Codirector del Comité

Dra. Idania Valdez Vazquez
Codirector del Comité

Las microalgas clorofíceas son capaces de producir hidrógeno (H_2) vía biofotólisis, la cual debe ocurrir en un ambiente anaerobio debido a la sensibilidad al oxígeno (O_2) de la enzima Fe-hidrogenasa encargada de producir H_2 . El objetivo de este trabajo fue estudiar el efecto de las condiciones ambientales y remoción del O_2 fotosintético sobre crecimiento y producción de hidrógeno en cultivos de microalgas. Se realizó: A) la bioprospección de 5 especies de clorofíceas: *Chlamydomonas gloeopara*, *C. mexicana*, *C. reinhardtii*, *Chlorella vulgaris* y *Scenedesmus obliquus* como posibles productoras de H_2 utilizando el protocolo de privación de azufre bajo condiciones autotróficas y heterotróficas; B) se estudió el efecto de la irradiancia (100 y 400 $\mu E/m^2/s$), temperatura (20, 25 y 30°C) y fuente de carbono (ácido acético y sacarosa) sobre el crecimiento y la producción de H_2 ; y C) se estudió el efecto de agentes reductores (ácido ascórbico, cisteína, sulfito de sodio e hidroquinona) sobre la concentración de O_2 fotosintético, crecimiento y producción de H_2 en cultivos provistos de azufre.

Los resultados de la bioprospección mostraron que en general la mayor producción de H_2 se obtuvo bajo condiciones heterotróficas por las especies: *S. obliquus* (74 mL H_2/L) > *C. mexicana* (62 mL H_2/L) > *C. gloeopara* (30 mL H_2/L) > *C. reinhardtii* (26 mL H_2/L). De aquí que los ensayos consecutivos se realizaron con *S. obliquus* y *C. gloeopara*. Se encontró que la irradiancia, pero no la temperatura tuvo un efecto positivo sobre el crecimiento y la producción de H_2 ($p < 0.05$). La mayor producción de H_2 en *C. gloeopara* y *S. obliquus* se presentó en el tratamiento a 25 °C - 100 $\mu E/m^2/s$ con 73 mL de H_2/L y 54 mL de H_2/L , respectivamente. La fuente de carbono influyó sobre el crecimiento y la producción H_2 ($p < 0.05$). Sólo se logró producir H_2 en los tratamientos con ácido acético, *C. gloeopara* con 48 mL/L y *S. obliquus* con 46 mL/L. Del ensayo con los agentes reductores, la cisteína fue el único compuesto que no inhibió el crecimiento de las clorofíceas, e incluso lo estimuló, y fue posible mantener niveles menores a 125 pmol y 3.73 pmol de O_2 fotosintético durante 192 h para *C. gloeopara* y *S. obliquus*, respectivamente. La producción de H_2 con cisteína fue 4 veces mayor que bajo el protocolo de privación azufre. Estos resultados demuestran por primera ocasión que la fotosíntesis oxigénica y la producción anaerobia de H_2 fueron conciliadas por más de 40 h mediante la captura del O_2 con cisteína. Esta es una nueva alternativa en la producción de H_2 con microalgas mediante el uso de secuestradores de O_2 químicos y/o biológicos.

Palabras clave: agentes reductores, cisteína, clorofíceas, hidrógeno, microalgas.

Abstract of the thesis presented by **Luis Alberto Márquez Reyes** as a partial requirement to obtain the Doctor of Science degree in Life Science with orientation in Marine Biotechnology.

Effects of environmental conditions and addition of reducing agents on the growth and hydrogen production in the culture of Chlorophyceae

Abstract approved by:

Dra. M. del Pilar Sánchez Saavedra
Codirector del Comité

Dra. Idania Valdez Vazquez
Codirector del Comité

H₂ production in microalgae *via* photolysis takes place only under anaerobic conditions because the Fe-hydrogenase - enzyme responsible for H₂ production - is sensitive to the oxygen (O₂). The objective of this research was to study the effects of environmental conditions and removal of the photosynthetic O₂ on the growth and H₂ production in microalgal cultures. To this end, the research was divided into three phases: A) bioprospection of five species as H₂ producers: *Chlamydomonas gloeopara*, *Chlamydomonas mexicana*, *Chlamydomonas reinhardtii*, *Chlorella vulgaris* and *Scenedesmus obliquus* cultured under sulfur deprivation and autotrophic and heterotrophic conditions; B) determination of the effects of the irradiance (100 and 400 $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$), temperature (20, 25 and 30°C) and source of carbon (acetic acid and sucrose) on the growth and H₂ production; and C) determination of the effects of reducing agents (ascorbic acid, cysteine, sodium sulfite and hydroquinone) on the concentration of photosynthetic O₂, growth and H₂ production in cultures provided with sulfur salts.

The results of bioprospection show that the highest H₂ productions were obtained under heterotrophic conditions: *S. obliquus* (74 mL H₂/L) > *C. mexicana* (62 mL H₂/L) > *C. gloeopara* > (30 mL H₂/L) > *C. reinhardtii* (26 mL H₂/L). Based on these results, *S. obliquus* and *C. gloeopara* were selected to perform the following tests. The irradiance - but not temperature - has a positive effect on the growth and H₂ production ($p < 0.05$). The highest H₂ production for *C. gloeopara* and *S. obliquus* was observed at 25°C - 100 $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$ with 73 mL H₂/L and 54 mL H₂/L, respectively. The source of carbon has a significant effect on the growth and H₂ production ($p < 0.05$): only treatments with acetic acid produced H₂, 48 mL H₂/L for *C. gloeopara* and 46 mL H₂/L for *S. obliquus*. From the reducing agents tested, only cysteine did not inhibit the growth, actually stimulated it, and the photosynthetic O₂ was kept below 125 pmol and 3.73 pmol during 192 h for *C. gloeopara* and *S. obliquus*, respectively. In the cysteine treatments, H₂ production was four times higher than the treatments under sulfur deprivation. These results demonstrated that the oxygenic photosynthesis and anaerobic H₂ production were conciliated for more than 40 h by capturing the photosynthetic O₂ as quickly as it is evolved. This study presents a novel approach to produce H₂ for microalgal cultures by sequestering O₂ with reducing agents or O₂-consuming bacteria.

ÍNDICE	PÁGINA	Página
Lista de Figuras		V
Página		VII
Lista de Tablas		IX
Página		IX
1. INTRODUCCIÓN		1
1.1 Fotosíntesis en algas verdes unicelulares		3
1.2. Función y estructura del fotosistema II (PSII)		6
1.3. Función y estructura del Fotosistema I (PSI)		7
1.4. Producción de H ₂ en microalgas		7
1.5. Producción de H ₂ en deficiencia de azufre		10
1.6. Material de reserva en las algas verdes		13
1.7. Efecto de la luz sobre la producción de H ₂		14
1.8. Efecto de los nutrientes sobre la producción de H ₂		15
1.9. Producción anaerobia de H ₂ mediante el uso de agentes reductores		16
2. JUSTIFICACIÓN		20
3. HIPÓTESIS		21
4. OBJETIVO GENERAL		22
4.1 Objetivos Particulares		22
5. MATERIALES Y MÉTODOS		23
5.1. Especies de trabajo		23
5.2. Bioprospección de especies con potencial para la producción de H ₂ en cultivos con medio autótrofo y heterótrofo		25
5.2.1. Inducción anaerobia para la producción de H ₂ en cultivos autótrofo y heterótrofo		28
5.2.2. Métodos analíticos		29
Crecimiento y pH		29
Carbohidratos totales		30
Pigmentos		30
Peso seco		31
Fotosíntesis		31
Producción de H ₂ : método colorimétrico y por cromatografía		32
5.2.3. El análisis estadístico		33
5.3. Efecto de las condiciones ambientales sobre el crecimiento microalgal y la producción de H ₂		34
5.3.1. Efecto de la irradiancia y temperatura sobre crecimiento microalgal y producción de H ₂		34
Selección de especies		34
5.3.2. Efecto del aporte de carbono sobre la producción de H ₂		36
5.3.4. Análisis estadístico		37
5.4. Producción de H₂ mediante la reducción del O₂ fotosintético en el cultivo de microalgas		39
5.4.1. Efectos de los agentes reductores sobre el crecimiento y la reducción del O ₂ disuelto		39
5.4.2. Inducción anaerobia para la producción de H ₂ con un agente reductor		40
5.4.3. Ensayo confirmatorio de la producción anaerobia de H ₂ con la especie control: <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>		41
5.4.4. Inducción anaerobia para la producción de H ₂ en <i>Scenedesmus obliquus</i> empleando una especie de bacteria		41
5.4.4.1. Especies de trabajo		41
5.4.4.2. Preparación del inóculo de bacterias consumidoras de O ₂		42
5.4.4.3. Producción de H ₂ de un cultivo mixto bacteria-microalga		42

5.4.4.4. Métodos analíticos	43
Crecimiento	43
Carbohidratos totales	43
Pigmentos	44
Producción de H₂	44
5.4.5. Análisis estadístico	44
6. RESULTADOS	46
6.1. Bioprospección de especies con potencial para la producción de H₂ en cultivos con medio autótrofo y heterótrofo	46
6.2. Efecto de las condiciones ambientales sobre el crecimiento microalgal	54
6.2.1. Efecto de la irradiancia y temperatura sobre el crecimiento y producción de H ₂	54
6.2.2. Efecto del aporte de carbono sobre la producción de H ₂	61
6.3. Producción de H₂ mediante la reducción de O₂ fotosintético en el cultivo de las microalgas <i>Chlamydomonas gloeopara</i> y <i>Scenedesmus obliquus</i>	67
6.3.1 Efectos de los agentes reductores sobre el crecimiento y O ₂ disuelto	67
6.3.2. Inducción para la producción de H ₂ mediante un agente reductor	73
6.3.3. Ensayo confirmatorio de la producción anaerobia de H ₂ con una especie control: <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	78
6.3.4. Inducción anaerobia de la producción de H ₂ en <i>Scenedesmus obliquus</i> empleando una especie de bacteria	81
7. DISCUSIÓN	85
7.1. Bioprospección de especies con potencial para la producción de H₂ en cultivos con medio autótrofo y heterótrofo	85
7.2. Efecto de las condiciones ambientales sobre el crecimiento microalgal y la producción de hidrógeno	95
7.2.1. Efecto de la irradiancia y la temperatura sobre el crecimiento y la producción de H ₂	95
7.2.2. Efecto del aporte de carbono sobre la producción de H ₂	100
7.3. Producción de H₂ mediante la reducción del O₂ fotosintético en el cultivo de las microalgas <i>Chlamydomonas gloeopara</i> y <i>Scenedesmus obliquus</i>	104
7.3.1. Inducción anaerobia para la producción de H ₂	107
7.3.2. Inducción anaerobia para la producción de H ₂ en <i>Scenedesmus obliquus</i> empleando una especie de bacteria	110
8. CONCLUSIONES	114
9. RECOMENDACIONES	116
10. LITERATURA CITADA	117
11. APENDICE	137
11.1. Efecto del aporte químico de nitrógeno (NO₃ y NH₄Cl) sobre el crecimiento	137
11.1.1. Resultados: Efecto del aporte químico de nitrógeno (NO ₃ y NH ₄ Cl) sobre el crecimiento	138
11.2. Producción de biogás con medio “f”	140
11.2.1. Resultados: Producción de biogás con medio “f”	140
11.3. Producción de H₂ en cultivos con medio autótrofo y heterótrofo	143
11.3.2. Resultados: Producción de H ₂ en cultivos con medio autótrofo y heterótrofo	144

Lista de Figuras

	Página
Figura 1. Transferencia energética de electrones en la fotosíntesis de organismos oxigénicos.....	5
Figura 2. Representación esquemática de las rutas metabólicas utilizadas por <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	11
Figura 3. Esquema general del trabajo de tesis sobre el efecto de las condiciones ambientales y la adición de consumidores de oxígeno.....	23
Figura 4. Biorreactor de vidrio cerrado herméticamente acoplado al dispositivo de medición de gas por desplazamiento de salmuera acidificada.....	29
Figura 5. Curvas de crecimiento de las microalgas <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> (CMR), <i>Scenedesmus obliquus</i>	47
Figura 6. Cambios de color inducidos por hidrogenación catalítica del reactivo de Wilkinson con el colorante azul brillante de Coomassie.....	50
Figura 7. Curvas de crecimiento durante la producción de biomasa (Etapa I) y la producción de H ₂ mediante de la privación de azufre.....	55
Figura 8. Curvas de crecimiento durante la producción de biomasa (Etapa I) y la producción de H ₂ mediante de la privación de azufre.....	56
Figura 9. Concentración de carbohidratos totales (µg/10 ⁶ cél) el día 7 del cultivo durante la etapa de producción de biomasa (Etapa I).....	57
Figura 10. Concentración de carbohidratos totales (µg/10 ⁶ cél) el día 7 del cultivo durante la etapa de producción de biomasa (Etapa I).....	58
Figura 11. Concentración de clorofila "a" y carotenoides (pg/10 ⁶ cél/mL) de <i>Chlamydomonas gloeopara</i> durante la etapa de producción.....	59
Figura 12. Concentración de clorofila "a" y carotenoides (pg/10 ⁶ cél/mL) de <i>Scenedesmus obliquus</i> durante la etapa de producción de biomasa.....	60
Figura 13. Curvas de crecimiento durante la producción de biomasa (Etapa I) y la producción de H ₂ mediante de la privación de azufre.....	62
Figura 14. Curvas de crecimiento durante la producción de biomasa (Etapa I) y la producción de H ₂ mediante de la privación de azufre.....	62
Figura 15. Concentración de carbohidratos totales (µg/10 ⁶ cél) de <i>Chlamydomonas gloeopara</i> (A) y <i>Scenedesmus obliquus</i> (B).....	64
Figura 16. Curva de crecimiento de <i>Chlamydomonas gloeopara</i> cultivada en medio heterótrofo (TAP) a 100 µE/m ² /s.....	68
Figura 17. Curva de crecimiento <i>Scenedesmus obliquus</i> cultivada en medio heterótrofo (TAP) a 100 µE/m ² /s.....	69
Figura 18. Porcentaje de O ₂ disuelto en un cultivo de <i>Chlamydomonas gloeopara</i> a los 8 días de incubación cultivada.....	71

Figura 19. Porcentaje de O ₂ disuelto en un cultivo de <i>Scenedesmus obliquus</i> a los 8 días de incubación cultivada.....	72
Figura 20. Curvas de crecimiento (-□-), concentración de carbohidratos totales (—▲—), producción de hidrógeno (H ₂ , -✱-) y producción oxígeno (O ₂ , —●—) de <i>Chlamydomonas gloeopara</i>	75
Figura 21. Curvas de crecimiento (-□-), concentración de carbohidratos totales (—▲—), producción de hidrógeno (H ₂ , -✱-) y producción oxígeno (O ₂ , —●—) de <i>Scenedesmus obliquus</i> cultivada en medio heterótrofo.....	77
Figura 22. Porcentaje de O ₂ en la fase gaseosa y producción de H ₂ en un cultivo de <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> con la adición de tres	79
Figura 23. Coloración de los cultivos de <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> con la adición de cisteína (1 g/L).....	80
Figura 24. Curva de crecimiento de <i>Scenedesmus obliquus</i> (10 ⁶ cél/mL, -□-), concentración de carbohidratos totales (—▲—).....	82
Figura 25. Coloración de los cultivos de <i>Scenedesmus obliquus</i> cultivadas en: medio TAP; TAP y la especie de bacteria aislada.	83
Figura 26. Curva de crecimiento de las bacterias aerobias facultativas (x 10 ⁵ UFC/mL) en medio TAP y consumo de O ₂	84

Lista de Tablas

	Página
Tabla 1. Formulación de los medios de cultivo heterótrofo TAP (Harris, 2009) y autótrofo "f" (Guillard y Ryther, 1962)	27
Tabla 2. Tasa de crecimiento, concentración de carbohidratos totales, clorofila "a", "b", carotenoides, peso, producción de H ₂ ,.....	48
Tabla 3. Valores promedio y desviación estándar de la tasa fotosintética máxima (P _{máx}), la eficiencia fotosintética (α).....	53
Tabla 4. Tasa de crecimiento en fase exponencial (μ) de <i>Chlamydomonas gloeopara</i> y <i>Scenedesmus obliquus</i> cultivadas	63
Tabla 5. Tamaño celular (μm) de <i>Chlamydomonas gloeopara</i> y <i>Scenedesmus obliquus</i> mantenidas en tratamientos.	65
Tabla 6. Valores promedio y desviación estándar del peso seco total, el peso de ceniza y el peso seco orgánico ($\mu\text{g/mL}$).	66
Tabla 7. Resultados de producción de H ₂ por diferentes especies de microalgas bajo condiciones heterótrofas y autótrofas.	92
Tabla 8. Fuentes de carbono utilizada en los cultivos de microalgas.....	101

1. Introducción

Existe una constante investigación para producir combustibles renovables con el fin de satisfacer la creciente demanda de energéticos, la cual aumenta a un ritmo de 1.6% anual. Actualmente, el 80% de la demanda energética mundial depende de las reservas de combustibles fósiles (Das y Veziroglu, 2001; Tamburic *et al.*, 2011) y se estima que las reservas tendrán una disminución drástica en los siguientes 25 años (International Energy Agency, 2016). A partir de la década de los 90's quedó de manifiesto que el uso continuo de combustibles fósiles resulta una actividad ambientalmente insostenible. Las principales causas de la disminución de las reservas de petróleo son: los escasos descubrimientos de nuevos yacimientos de petróleo y la disminución de las reservas mundiales petrolíferas, donde sólo los yacimientos del Medio Oriente han podido mantener un crecimiento en su producción. Este panorama de escases de combustibles fósiles ha creado una inestabilidad mundial en los precios del petróleo, la cual se agudizará cuando se reduzca la extracción del crudo en Medio Oriente, generando desabasto de energéticos con un impacto negativo sobre la economía de las naciones y la sociedad en general. Por otro lado, las actividades antropogénicas basadas principalmente en el consumo de combustibles fósiles, han contribuido al problema mundial del incremento de la temperatura de la superficie del planeta (Chisti, 2007), principalmente por la emisión de dióxido de carbono (CO₂) a la atmósfera.

Por lo anterior, es necesario encontrar un mecanismo alternativo de generación de energía libre de emisiones de carbono a la atmósfera, menos contaminante, renovable, disponible y abundante (Edwards, 2008; He *et al.*, 2012).

Dentro de las alternativas energéticas más prometedoras, se encuentra el hidrógeno (H₂). El H₂ ha sido objeto de gran interés al ser considerado el combustible más atractivo para satisfacer las necesidades energéticas en el futuro, gracias a la energía química almacenada en el enlace H-H, que durante la ignición libera gran cantidad de energía por unidad de masa (2.1 y 2.8 veces más que el gas natural y la gasolina, respectivamente). La combustión del H₂ puro no emite gases contaminantes, como compuestos de carbono, sulfuro o nitrógeno y la producción de H₂ a través de microalgas aporta indirectamente una disminución a la atmósfera de los gases de efecto invernadero (GEI), ya que, el

producto final de la reacción de combustión es agua (Álvarez-Velden, 2002; Fierro *et al.*, 2003).

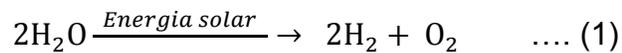
El H₂ es el elemento más abundante en la naturaleza, constituyendo aproximadamente el 75% de la materia del universo y en la masa del planeta solamente constituye el 0.87%. No obstante, el H₂ se encuentra combinado con el oxígeno para formar agua y cerca del 11% del peso del agua es H₂. Actualmente, el 90% de la producción mundial de H₂ (aproximadamente 45 billones de toneladas) se obtiene a partir de combustibles fósiles (principalmente metano) mediante el método de reformación con vapor a altas temperaturas (700-1100 °C) (Aceves-Lara *et al.*, 2007; Kashahara, 2016). El 10% restante de la producción mundial de H₂ se obtiene por medio de electrólisis (Kumari *et al.*, 2016; Verfondern, 2016) y de mecanismos biológicos donde intervienen bacterias (Jiang *et al.*, 2015; Trchounian y Trchounian, 2015) o microalgas (Torzillo *et al.*, 2015; Volgusheva *et al.*, 2015).

La utilización de H₂ como energético presenta un desafío importante, ya que la mayoría del H₂ se encuentra unido con otro elemento y se debe separar. La fuente principal de H₂ es el agua, que se encuentra de forma abundante en los océanos, ríos, lagos, y otros (Yoder-López, 2007).

Dentro de las tecnologías de producción de H₂ se encuentra la biofotólisis, también conocida como fotodisociación biológica del agua, y se refiere a la conversión del agua y energía lumínica en H₂ y O₂ mediante microorganismos fotoautótrofos como las microalgas (Jorquera *et al.*, 2001). Estos microorganismos han sido sugeridos como excelentes candidatos para la producción de H₂, gracias a ventajas tales como: que su cultivo no compite por tierra cultivable para la producción de alimentos como ocurre con el cultivo de almidones o azúcar para la producción de los biocombustibles de primera generación; se pueden cultivar en aguas residuales y actuar como biodepuradoras (Steele *et al.*, 2014); sirven como secuestradoras de CO₂ atmosférico; son más eficientes que las plantas superiores en convertir la energía solar en energía química y nutrientes para su crecimiento; debido a su estructura biológica simple y a que no generan estructuras reproductivas especializadas sus requerimientos nutricionales son simples (Miao y Wu, 2006; Amutha y Murugesan, 2011; Zhu *et al.*, 2013).

La capacidad de las microalgas para la producción de H₂ fue descubierta por Hans Gaffron y colaboradores hace más de 70 años empleando *Scenedesmus obliquus*. Se

encontró que las células de microalgas, después de un periodo de crecimiento aerobio con gran producción de biomasa, podían ser adaptadas bajo oscuridad a condiciones anaerobias para inducir la expresión del sistema enzimático responsable de la liberación de trazas de H₂. Se encontró que la producción H₂ se podía incrementar durante el periodo de anaerobiosis manteniendo a las células con iluminación constante, ya que la oxidación del agua liberaba electrones que eran dispuestos como H₂ (1).



Durante la biofotólisis u oxidación de la molécula del agua, el sistema fotosintético de las microalgas convierte la energía solar en energía química en forma de H₂. Este proceso lo realizan las microalgas mediante la acción de la enzima Fe-hidrogenasa (Fe-H₂asa), que usa los electrones que se liberan de la ruptura de la molécula de agua para la formación de H₂ (Ni *et al.*, 2006).

Se han estudiado diversos factores que afectan la producción de H₂ en las algas verdes, tal como: temperatura (Graves *et al.*, 1989), pH (Kosourov *et al.*, 2003), intensidad luminosa (Laurinavichene *et al.*, 2004; Kim *et al.*, 2006; Degrene *et al.*, 2010), tipo y concentración de nutrientes inorgánicos (Kosourov *et al.*, 2002; Kosourov *et al.*, 2007), la fuente de carbono (Dutta *et al.*, 2005) y la especie de microalga (Skjånes *et al.*, 2008; Chader *et al.*, 2009; He *et al.*, 2012). Sin embargo, sólo se ha estudiado un pequeño número de especies de algas verdes y combinaciones similares de parámetros ambientales. Por lo tanto, es necesario continuar la investigación con las especies hasta ahora evaluadas y mejorar la velocidad de producción de H₂, determinar el potencial de nuevas especies para la producción de H₂ y determinar la combinación de parámetros ambientales que favorezcan la producción de H₂.

1.1 Fotosíntesis en algas verdes unicelulares

La fotosíntesis es el proceso fotobiológico fundamental, donde se utiliza la energía de una fuente luminosa, como el sol y se transforma en energía química, siendo el adenosin trifosfato (ATP) la primera molécula donde se almacena la energía (Krause y Weis, 1991). La fotosíntesis se lleva a cabo en los cloroplastos, los cuales están conformados por un

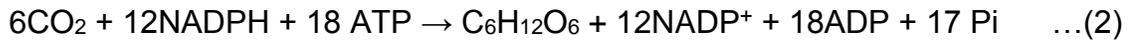
espacio intracelular conocido como estroma, que alberga las enzimas encargadas de la transformación del CO₂ atmosférico en materia orgánica. Dentro del cloroplasto existen estructuras cilíndricas aplanadas denominadas tilacoides, que al apilarse son llamados granas. La membrana de los tilacoides contiene la cadena transportadora de electrones, una ATP sintetasa y el sistema fotosintético de absorción de la luz con sus pigmentos fotosintéticos, como la clorofila entre otros. La clorofila es el principal cosechador de la luz emitida por el sol, absorbiendo las longitudes de ondas del violeta, azul, anaranjado-rojizo, rojo y pocas radiaciones de las longitudes de onda intermedias, verde-amarillo-anaranjado (Prince y Kheshgi, 2005).

La fotosíntesis es un proceso que ocurre en dos fases: la fase luminosa y la fase oscura. La fase luminosa es un proceso que depende de la luz, donde se llevan a cabo las reacciones fotosintéticas de transferencia de electrones y donde la energía derivada de la luz (dos fotones) activa dos electrones del centro de reacción de la clorofila "a". Esto permite que los electrones del centro de reacción se desplacen a lo largo de una cadena de óxido-reducción de la membrana tilacoidal, provocando la oxidación del centro de reacción. Para recuperar los electrones perdidos, la clorofila "a" obtiene sus electrones de la biofotólisis del agua, lo cual produce la liberación de O₂ al medio. Este proceso de transporte electrónico bombea protones de H⁺ a través de la membrana tilacoidal hacia el interior, la fuerza protón-motriz resultante impulsa el proceso de síntesis de ATP en el estroma. Al mismo tiempo, las reacciones de transporte electrónico generan electrones de alta energía, junto con H⁺, que transforman el NADP⁺ en su forma reducida NADPH (Alberts *et al.*, 2002).

La segunda fase de la fotosíntesis se conoce como las reacciones oscuras o reacciones de fijación de carbono. Estas reacciones son independientes de la luz y se realizan cuando los productos de las reacciones luminosas son utilizados para sintetizar carbohidratos a partir de la fijación de CO₂, en un proceso denominado Ciclo de Calvin. Para ello, es necesario que la fuente de energía (ATP) y el poder reductor (NADPH) producidos en las reacciones fotosintéticas de transferencia de electrones (reacciones luminosas) se encuentren presentes (Figura 1).

Todas las reacciones del Ciclo de Calvin, son catalizadas por enzimas específicas. Para la formación de una molécula de azúcar-fosfato se requiere la fijación de 6 moléculas de

CO₂, por lo que la estequiometría final del ciclo de Calvin se puede resumir en la ecuación (2):



La glucosa producida en el Ciclo de Calvin, es movilizada dentro del organismo para satisfacer las necesidades metabólicas de la célula y con esto se completa la fotosíntesis (Prince y Kheshgi, 2005).

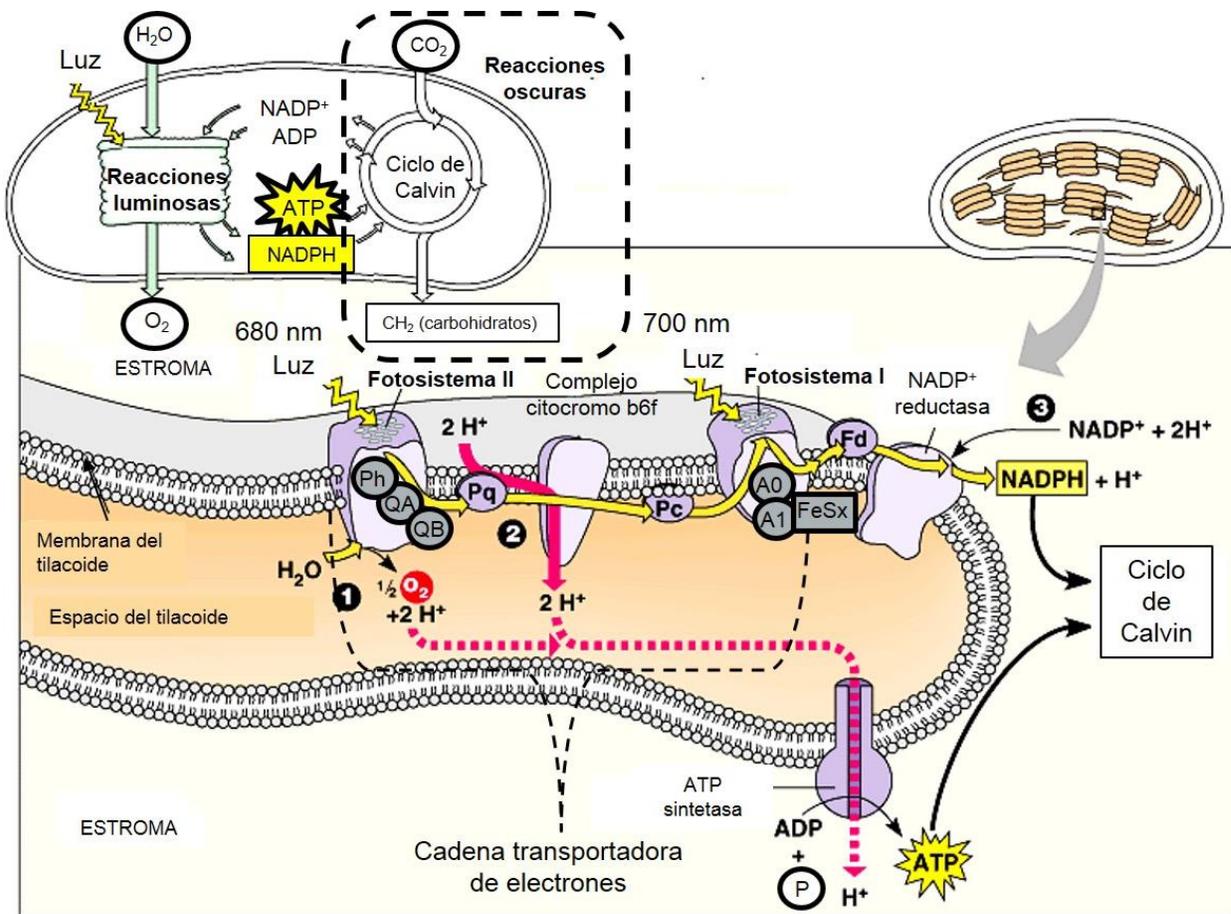


Figura 1. Transferencia energética de electrones en la fotosíntesis de organismos oxigénicos. Los fotones actúan como agentes reductores y dejan a la clorofila, en una forma oxidada. Después los electrones son transferidos al fotosistema II que oxida y rompe la molécula del agua y que, a su vez oxida el agua para liberar O₂. Posteriormente, se da el paso de electrones a través de la feofitina (Ph) y quinonas (QA y QB), hacia el complejo citocromo b₆ f y al fotosistema I (PSI) que después es oxidado por un fotón. El electrón del PSI pasa a través de las quinonas (A₀, A₁) y del complejo hierro-azufre (FeSx, A y B) para llegar a la ferredoxina (Fd). Bajo estas condiciones fisiológicas se reduce el NADP⁺, y es utilizado para fijar el CO₂.

1.2. Función y estructura del fotosistema II (PSII)

La fotosíntesis en las plantas, algas y cianobacterias depende de las moléculas de clorofila y de energía lumínica. La fotosíntesis se desarrolla en dos centros de reacción fotoquímica conocidos como fotosistemas I y II (PSI y PSII, respectivamente). Estos fotosistemas se encuentran embebidos en las membranas de los tilacoides y utilizan la energía del fotón incidente para crear una corriente eléctrica y mover electrones a través de la membrana, generando un potencial de membrana, un poder oxidante (nicotinamida adenina dinucleótido fosfato, NAD⁺; y un gradiente de protones) y un poder reductor (NADPH). En el PSII se oxida la molécula de agua, liberando al O₂ y proveyendo un flujo de electrones al complejo citocromo b6f (Stroebel *et al.*, 2003).

Durante la fotosíntesis, el PSII es el primer fotosistema en funcionar. El PSII consta de dos componentes: un centro de reacción fotoquímico, formado de un complejo proteico y clorofilas que captan la energía solar (680 nm) convirtiéndola en energía química; y un complejo antena, formado por moléculas de pigmento que capturan la energía solar y la canalizan al centro de reacción (Alberts *et al.*, 2002).

El complejo antena consta de varias moléculas de clorofila unidas entre sí, fijadas por proteínas a la membrana tilacoidal. Cuando una molécula de clorofila del complejo antena se excita, provoca que uno de sus electrones se desplace de un orbital molecular de menor energía a otro de mayor energía. La energía absorbida por el complejo es rápidamente transferida desde una molécula de clorofila a otra, mediante transferencia energética por resonancia, hasta que alcanza el centro fotoquímico de reacción (un par especial de moléculas de clorofila), que actúa como un embudo de electrones de alta energía. La molécula formada durante la transferencia de energía es inestable y tiende a volver a su estado original no excitado de forma cíclica (Raven *et al.*, 1992; Allen, 2003). El centro de reacción fotoquímico transfiere los electrones a la cadena transportadora de electrones.

El PSII es un complejo enzimático que cataliza la reacción fotoinducida de oxidación del agua y reducción de la plastoquinona. El PSII consta de 25 proteínas denominadas PsbA-Z. De ellas, 17 corresponden a proteínas intrínsecas de la membrana. Las proteínas centrales D1 y D2, de 30 a 32 kDa, contienen los cofactores redox implicados en la oxidación del agua y reducción de la plastoquinona. En el centro de reacción fotoquímico se encuentran asociados cuatro iones de manganeso y tres cofactores: el Ca²⁺, Cl⁻ y

HCO_3^- (Figura 1). Así, el mecanismo de fotólisis del agua opera como un motor cíclico de cuatro tiempos que arranca cuatro electrones y cuatro protones a dos moléculas de agua que mantienen el transporte electrónico y un gradiente protónico a través de la membrana y desprende O_2 molecular (Arellano y de Las Rivas, 2006). Las proteínas centrales son dañadas constantemente debido a la exposición lumínica, por tanto, deben reemplazarse constantemente para mantener el ciclo de absorción y de transferencia de electrones (Melis y Chen, 2005).

1.3. Función y estructura del Fotosistema I (PSI)

El PSII y el PSI operan en serie transportando electrones y están unidos a través de la cadena transportadora. El complejo citocromo b6f de la cadena transportadora de electrones reduce el PSI (Ben-Shem *et al.*, 2003), y finalmente los electrones liberados de la oxidación del agua son transportados a la proteína hierro-sulfuro ferredoxina. En el estroma la ferredoxina proporciona los electrones a la molécula NADP^+ para generar su forma reducida NADPH. Esta transferencia de electrones genera un gradiente electroquímico transmembranal de protones que son utilizados en el cloroplasto por la enzima ATPasa para generar ATP (Steinberg-Yfrach *et al.*, 1998). Bajo condiciones fisiológicas normales, el NADPH y el ATP generados durante el flujo de electrones se consumen en el Ciclo de Calvin-Benson, donde se fija el CO_2 y se producen hidratos de carbono (Figura 1). Asimismo, se debe conservar una adecuada relación entre el ATP y NADPH que es mantenida por un flujo cíclico de electrones en torno al PSI (Arellano y de Las Rivas, 2006).

1.4. Producción de H_2 en microalgas

Existen diversos mecanismos para la producción de H_2 con microalgas: la biofotólisis directa, la biofotólisis indirecta y la fermentación oscura. La biofotólisis directa es un proceso biológico de producción de H_2 en donde se emplea el sistema fotosintético de microalgas para convertir la energía solar en energía química en forma de H_2 en presencia de la enzima Fe-hidrogenasa (Fe- H_2 asa) (Ni *et al.*, 2006). La biofotólisis directa

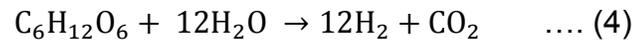
se lleva en los dos fotosistemas de las microalgas, donde, el PSI se encarga de reducir el CO_2 , mientras el PSII divide la molécula de agua produciendo O_2 y H^+ . En el proceso de biofotólisis, dos protones provenientes de la fotólisis del agua puede promover la reducción del CO_2 para formar carbohidratos o bien la formación H_2 con la presencia de la Fe- H_2 asa. En este proceso, los electrones se generan cuando el PSII absorbe la energía de la luz. Entonces, los electrones son transferidos a la ferredoxina (Fd) usando la energía solar absorbida por el PSI. Finalmente, la Fe- H_2 asa acepta los electrones de la Fd para producir H_2 . Para mantener la producción H_2 mediante la biofotólisis directa es indispensable tener un nivel bajo de O_2 , ya que la actividad de la Fe- H_2 asa es extremadamente sensible al O_2 (Hallenbeck y Benemann, 2002).

Algunas algas verdes pueden agotar el O_2 durante la respiración oxidativa y producir gran cantidad de sustratos (carbohidratos) que son consumidos durante la biofotólisis y estimulan la producción de H_2 (Ni *et al.*, 2006). La eficiencia en la conversión de un fotón de luz visible en H_2 es de alrededor del 22% manteniendo niveles de O_2 por debajo del 0.1% (Hallenbeck y Benemann, 2002).

En la biofotólisis indirecta, el problema de la sensibilidad de la Fe- H_2 asa al O_2 en el proceso de producción de H_2 , se evita por la separación espacial y/o temporal de la evolución del O_2 y del H_2 . Así, la biofotólisis indirecta implica la separación de la evolución del O_2 y el H_2 en reacciones de etapas separadas, que son acopladas a través de la fijación/evolución del CO_2 (Hallenbeck y Benemann, 2002). Este proceso de biofotólisis es el proceso mayormente usado por las cianobacterias, no obstante, algunas microalgas son capaces de producir H_2 mediante este proceso. La biofotólisis indirecta involucra la reducción no fotoquímica de la plastoquinona, usando electrones del NADPH, generado primeramente del catabolismo del almidón, seguido de la reducción de la ferredoxina dependiente de la luz por el PSI. Este camino es independiente del PSII, no obstante, es dependiente de la actividad de la NADPH-plastoquinona oxidoreductasa (Ball y Deschamps, 2008). Este proceso involucra cuatro etapas (I) la producción de biomasa mediante la fotosíntesis con el 10% de eficiencia y almacenamiento de carbohidratos (principalmente almidón); (II) la concentración de biomasa, (III) la fermentación aerobia oscura, produciendo cuatro moles de H_2 por cada mol de glucosa contenida en la célula, junto con 2 moles de acetatos y (IV) la conversión de dos moles de acetato en 8 moles de H_2 . Las cianobacterias son típicamente usadas para producir H_2 mediante este

proceso y la tasa de producción es comparable a la obtenida con las algas verdes (Ni *et al.*, 2006).

La reacción se puede resumir de la siguiente forma (3 y 4):



La fermentación oscura la realizan las bacterias anaerobias entre 30 °C y 80 °C (Lin y Jo, 2003), así como algunas microalgas como *Chlorococcum littorale*, tales como las algas verdes que utilizan sustratos ricos en carbohidratos para producir H₂ en condiciones de oscuridad (Ueno *et al.*, 1998; Ni *et al.*, 2006). A diferencia del proceso de la biofotólisis que sólo produce H₂, los productos de la fermentación oscura son en su mayoría H₂ y CO₂. Utilizando la glucosa como sustrato se producen máximo 4 moles de H₂ por cada mol de glucosa, siendo el producto final el ácido acético. La reacción se puede resumir de la siguiente forma (5):



En *Chlamydomonas* la fermentación oscura esta acoplada con el catabolismo del almidón, similar a lo que ocurre con las bacterias anaerobias o eucariotas amitocondriados como *Trichomonas vaginalis* (Dyall *et al.*, 2004). Estos organismos acoplan la oxidación del piruvato a la reducción de la ferredoxina vía la enzima piruvato-ferredoxina-oxidoreductasa (PFR1). La PFR1 oxida el piruvato a acetil-CoA y CO₂, y esto causa la reducción de la ferredoxina que es el donador de electrón para la Fe-H₂asa (Ball y Deschamps, 2008).

1.5. Producción de H₂ en deficiencia de azufre

Melis *et al.* (2000) realizaron un avance significativo en el proceso de producción de H₂ en microalgas al eliminar el azufre del medio de cultivo e inducir la expresión de la enzima Fe-H₂asa. La inducción de la Fe-H₂asa para producción de H₂ requiere de la siguiente secuencia fisiológica de eventos: a) fase aerobia, durante la cual está activa la evolución fotosintética de O₂; b) el consumo del O₂ donde la evolución fotosintética del O₂ cae por debajo de la respiración, permitiendo el consumo neto del O₂; c) fase anaerobia donde la mayor parte del O₂ ha sido removido del medio y se induce la expresión de la Fe-H₂asa; d) la fotoproducción anaerobia de H₂ donde se observa la mayor actividad de la Fe-H₂asa; y e) la terminación de la producción de H₂ donde toda la actividad celular gradualmente se inactiva (Kosourov *et al.*, 2002).

Durante la producción de H₂ ocurre un daño foto-oxidativo en el PSII que reduce drásticamente su actividad fotoquímica. El foto-daño oxidativo se produce con frecuencia en el centro de reacción del PSII. Esto causa una inactivación irreversible de la separación de cargas fotoquímicas y de las reacciones de transporte de electrones dentro de la proteína D1 del PSII (Figura 2). Este efecto adverso dispara un mecanismo que conduce a la eliminación selectiva y sustitución de los centros de reacción foto-inactivados de la proteína D1 del holo-complejo PSII. El daño en el PSII y el ciclo de reparación conlleva altas tasas de renovación de D1, y requiere una alta biosíntesis de D1 del *novo* en el cloroplasto. Cuando la reparación PSII se ve impedida, se inactiva el centro de reacción de la proteína D1 y sin poder reemplazarlo de manera eficiente, entonces la tasa de oxidación del H₂O y la evolución del O₂ disminuye en los cloroplastos (Haußühl *et al.*, 2001).

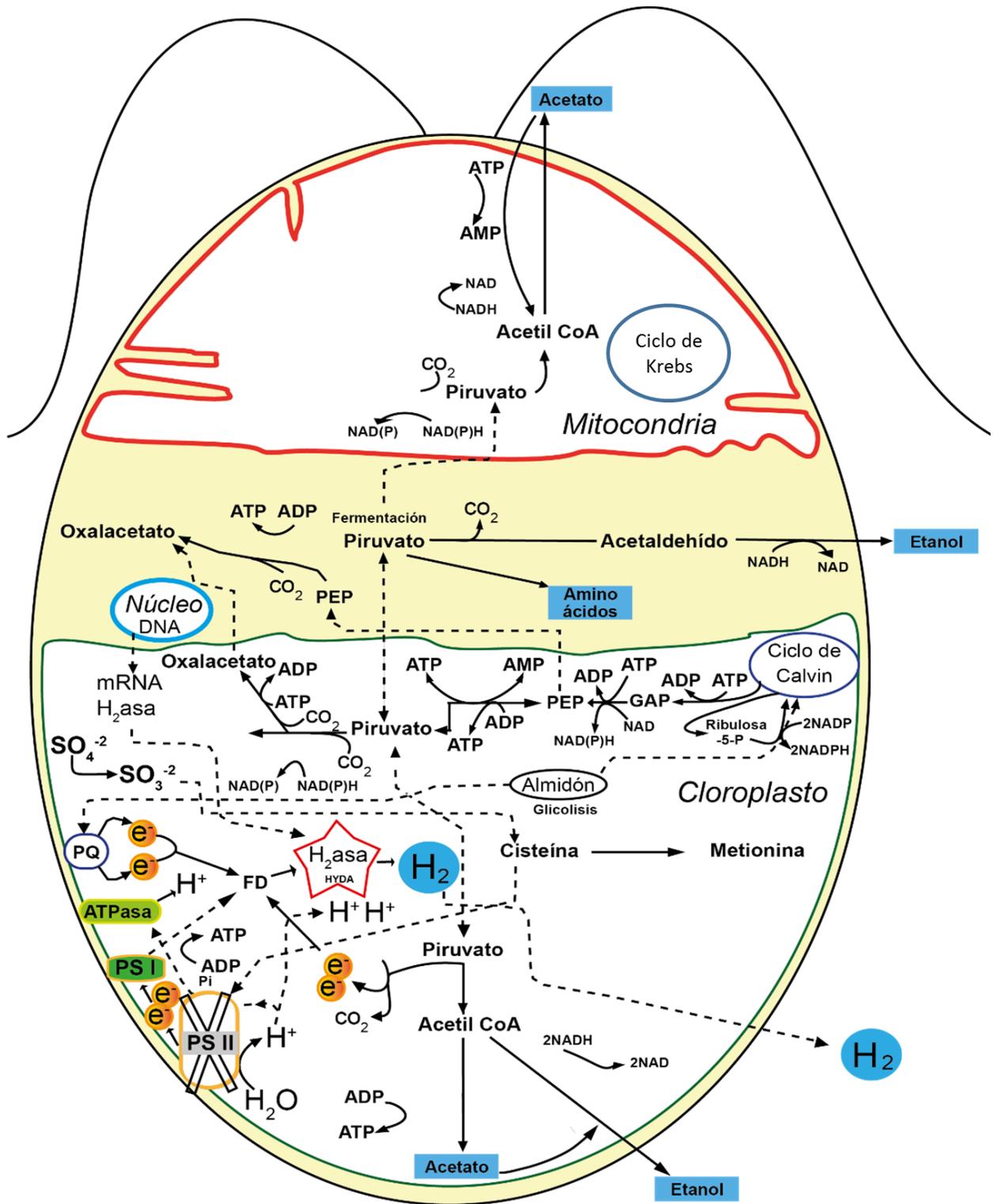


Figura 2. Representación esquemática de las rutas metabólicas utilizadas por *Chlamydomonas reinhardtii* cuando se expone a condiciones anaerobias en la fase oscura en privación de azufre (Melis *et al.*, 2000). Abreviaturas de enzimas son: FD, ferredoxina; PEP, carboxiquinasa; PEP, carboxilasa; PQ, plastoquinona; ATP, adenosin trifosfato; ADP, adenosin difosfato; AMP, adenosin monofosfato; Fe-H₂asa, Fe-hidrogenasa. Modificado de Atteia *et al.* (2013).

La limitación fisiológica del proceso de reparación del PSII por la carencia de azufre y la desaceleración reversible en la sustitución de D1, provoca una reorientación del transporte de electrones hacia la producción de H₂ en los cloroplastos de las algas verdes (Melis *et al.*, 2000). En las algas verdes unicelulares, la continua biosíntesis *de novo* y la sustitución de la proteína D1 requiere una continua absorción y asimilación de sulfato por los cloroplastos (Melis y Chen, 2005). La asimilación de sulfato es necesaria para la producción de cisteína y la metionina en el cloroplasto, los cuales son componentes esenciales de la estructura química de la proteína D1. Además, estos aminoácidos esenciales son necesarios para la posterior síntesis de proteínas en diversos compartimentos celulares (Vallon y Spalding, 2009).

La biosíntesis de la proteína D1 *de novo* consume la mayor parte de la cisteína y la metionina (Hell, 1997). Por lo tanto, estos aminoácidos se generan continuamente por la absorción y asimilación de sulfato, y los excesos de aminoácidos son liberados del cloroplasto al citosol para servir en las necesidades de la biosíntesis de proteínas. Como las algas verdes no tienen vacuolas en las que almacenen moléculas inorgánicas esenciales, como los sulfatos y otros nutrientes, entonces la privación del sulfato afecta las tasas de biosíntesis *de novo* de la proteína D1 en el cloroplasto.

En ausencia de un suministro suficiente de azufre al cloroplasto, la biosíntesis de la proteína D1 es impedida, y el ciclo de reparación del PSII es arrestado en la configuración PSII quinona no reductor. En consecuencia, en ausencia de azufre la tasa de fotosíntesis disminuye casi de manera exponencial en función del tiempo en alrededor de 10 a 18 h (Wykoff *et al.*, 1998; Melis *et al.*, 2000), sin afectar la tasa de respiración mitocondrial (Ghirardi *et al.*, 2000). Después de las 24 h de la privación de azufre, la fotosíntesis disminuye a un nivel de actividad menor que la respiración celular en *Chlamydomonas reinhardtii* (Melis *et al.*, 2000). Ya que la respiración domina las actividades de la bioenergética celular, los cultivos se vuelven anaerobios en la luz (Ghirardi *et al.*, 2000), permitiendo la expresión espontánea de la Fe-H₂asa en las microalgas y la producción H₂ durante la exposición a la luz (Melis *et al.*, 2000). Se ha demostrado que, en condiciones de privación de azufre, los electrones para la generación de H₂ son derivados principalmente de la oxidación residual del H₂O en el PSII. Otra parte de los electrones provienen del catabolismo endógeno de los sustratos de reserva (Ghirardi *et al.*, 2000), la cual alimenta la Fe-H₂asa y contribuye a la producción de H₂. La atenuación fisiológica

de la relación fotosíntesis-respiración mantiene la evolución de H₂ por un máximo de 4 días, produciendo H₂ que se libera al medio en forma de burbujas (Melis *et al.*, 2007).

1.6. Material de reserva en las algas verdes

El material de reserva producido por las microalgas (carbohidratos principalmente en forma de almidón) es importante durante la producción de H₂, ya que parte de los electrones utilizados para la producción de H₂ provienen de esta fuente. La síntesis del almidón en las algas verdes es controlada por la disponibilidad de sustratos (CO₂) y la energía que se genera a través de la fotosíntesis ocurre en presencia de luz, mientras que la degradación se lleva a cabo en la fase oscura. Así, es posible decir que el metabolismo del almidón se encuentra bajo el control del ciclo circadiano. En el Ciclo de Calvin, el CO₂ fijado se combina con el agua para constituir la molécula ribulosa-1,5-bifosfato y formar dos moléculas de 3-fosfoglicerato, que posteriormente son reducidas y transformadas en carbohidratos (glicógeno y almidón) para ser almacenados en el cloroplasto. Los glucanos ramificados α -1,4 vinculados a través de los enlaces α -1,6 glicosídicos son las formas de almacenamiento de polisacáridos en las algas verdes, constituyendo el glicógeno y el almidón, cerca del 60% del total de los carbohidratos (Benneman, 1998). Durante la producción de H₂, las células consumen grandes cantidades de almidón y proteína almacenados (Zhang *et al.*, 2002).

La comprensión de estos fenómenos es fundamental en los esfuerzos para mejorar el rendimiento y la estabilidad del proceso de producción de H₂ en las microalgas verdes. La carencia de azufre en los organismos fotosintéticos dispara un gran cambio en la expresión génica y metabólica en las células, específicamente en la degradación de las proteínas y en un inusual, pero importante, incremento en el contenido celular de almidón. La acumulación de almidón incrementa el volumen celular cerca de 10 veces dentro de las primeras 24-48 h después de la falta de azufre (Zhang *et al.*, 2002). Después hay una subsecuente regulación en el catabolismo del almidón en la luz, ocurriendo con la evolución del H₂. Fisiológicamente, cuando los cultivos provistos de azufre, se someten a condiciones con carencia de azufre, la oxidación fotosintética del H₂O disminuye exponencialmente durante 15 h a casi a la mitad, al igual que una disminución sustancial de la enzima ribulosa-1,5-bifosfato carboxilasa / oxigenasa (Rubisco), lo que sugiere una

degradación rápida y selectiva de esta proteína. Esto a su vez, origina una disminución de la actividad del ciclo de Calvin (Zhang *et al.*, 2002), lo que sigue una estricta dependencia de la luz y la redirección del metabolismo celular endógeno hacia la acumulación de almidón (Melis, 2007).

La interrupción de la acumulación de almidón en las microalgas expuestas a una fuente lumínica ocurre durante el proceso de producción H_2 . En ausencia de luz, los niveles de almidón se mantienen altos, a pesar de la pérdida en la actividad fotosintética. Durante la producción de H_2 y el catabolismo del almidón, las células generan y secretan al medio pequeñas moléculas orgánicas, tales como formiato, acetato y etanol (Winkler *et al.*, 2002). Esto supone fuertemente que el catabolismo del almidón en la etapa tardía de la carencia de azufre, es parte integral del metabolismo de la producción de H_2 . Ya que proporciona el sustrato endógeno necesario para el soportar el proceso de evolución de H_2 , al proporcionar los electrones al complejo de la plastoquinona del cloroplasto y por sostener indirectamente la respiración mitocondrial para el mantenimiento de la anaerobiosis en la microalga (Melis, 2007).

1.7. Efecto de la luz sobre la producción de H_2

La intensidad luminosa es la variable que promueve los mayores cambios bioquímicos en las microalgas. Por lo general, la actividad fotosintética aumenta al incrementarse la intensidad luminosa hasta llegar a un punto óptimo. Sin embargo, cada especie está adaptada a ciertas condiciones de iluminación y cuando se superan ciertos límites, se pueden deteriorar los pigmentos fotosintéticos y causar disminución en la actividad fotosintética. El incremento de la intensidad luminosa produce una disminución del contenido de clorofila y carotenoides (Bermúdez *et al.*, 2002).

El papel de la luz es fundamental en las microalgas, ya que es necesaria para la fotosíntesis. Para la producción de H_2 , es comúnmente aceptado que la luz origina la foto-inhibición de H_2 , como resultado de la evolución simultánea del O_2 en alta intensidad de luz. Esto inhibe la enzima clave en el proceso, la Fe- H_2 asa (Laurinavichene *et al.*, 2004). Para el caso de los cultivos carentes de azufre, no ocurre esta inhibición, debido a que la evolución del O_2 se detiene, por la ausencia de un suministro de azufre al cloroplasto,

donde es necesario para la biosíntesis de la proteína D1. Por tanto, el ciclo de reparación del PSII se detiene y se frena la evolución del O₂ (Eroglu y Melis, 2011).

En la microalga *C. reinhardtii*, después de un periodo de oscuridad y de anaerobiosis de aproximadamente 5 min se produce H₂ (Melis *et al.*, 2000), al ser cultivada en un medio libre de azufre. Y la producción de H₂ se incrementa cuando se mantiene la luz constante (Melis *et al.*, 2000). Además, la intensidad y la duración de la iluminación afecta la producción de H₂ (Kim *et al.*, 2006; Oncel y Vardar, 2011).

1.8. Efecto de los nutrientes sobre la producción de H₂

La fuente principal de carbono para las microalgas es el CO₂, sin embargo, algunas especies de microalgas son capaces de utilizar compuestos orgánicos como azúcares, ácidos orgánicos, alcoholes, aminoácidos, extracto de levadura y peptonas, para la producción de biomasa y funciones vitales, lo que se denomina condición heterótrofa (Bermúdez *et al.*, 2003).

La condición heterotrófica se constituye cuando la célula microalgal es capaz de mantener un crecimiento estable y sostenido basando su metabolismo en algún sustrato orgánico en ausencia de iluminación. En ocasiones pueden llegar a utilizar simultáneamente luz (CO₂ como fuente de carbono) y sustratos orgánicos, manifestando una capacidad mixotrófica (Prosperi *et al.*, 1992; Ortega *et al.*, 2004). Es decir, la microalga es capaz de mantener su crecimiento utilizando un componente autótrofo, a partir de dióxido de carbono y luz, y un componente heterótrofo a partir de un compuesto orgánico. Las investigaciones en bioenergética del crecimiento microalgal, tanto experimentales como teóricas, sugieren que la mayor productividad se obtiene bajo condiciones mixotróficas (Lee *et al.*, 1989).

La fuente de carbono es importante ya que se ha observado que incrementa la producción de H₂ y coincide con una oxidación de sustratos orgánicos, principalmente carbohidratos (Tsygankov *et al.*, 2002; Laurinavichene *et al.*, 2004). La acumulación de carbohidratos en microalgas depende de la disponibilidad de acetato en el medio de cultivo. Una alta concentración de acetato incrementa la actividad enzimática de las microalgas (Combres *et al.*, 1994). Así, el acetato es metabolizado a acetil CoA y se convierte a succinato que es utilizado como precursor de la síntesis de carbohidratos (Ortega *et al.*, 2004).

Las rutas metabólicas del acetato, glucosa o etanol en las microalgas clorófitas, están descritas por la actividad de la enzima isocitrato liasa a través del ciclo del glioxalato. En *Scenedesmus obliquus*, la actividad de la isocitrato liasa incrementa en función de la concentración de acetato (Combres *et al.*, 1994). Así, el acetato se metaboliza a acetil CoA, luego es convertido en succinato y posteriormente utilizado como precursor para la síntesis de carbohidratos en *Chlorella pyrenoidosa*, *Chlorella autotrophica* y *C. reinhardtii* (Ortega *et al.*, 2004).

El acetato sirve como fuente de carbono para *Chlamydomonas humicola* y *Scenedesmus obliquus*, observándose un incremento en el crecimiento de la biomasa (Laliberte y de la Noue, 1993; Combres *et al.*, 1994). De igual forma, la glucosa, citrato y bicarbonato dan resultados tanto positivos como negativos en el crecimiento de microalgas (Chu *et al.*, 1994).

Por otro lado, la producción de H₂ está influenciada por varios metabolitos incluidos el acetato, CO₂, nitritos y nitratos. En *Chlamydomonas*, la foto-producción de H₂ mejora con la presencia de acetato (Happe *et al.*, 1994). Esto se debe a la acumulación de compuestos orgánicos reducidos y derivados del almidón y de la asimilación de acetato (Gibbs *et al.*, 1986). Durante el catabolismo anaerobio, estos sustratos proveen electrones a la Fe-H₂asa vía el complejo plastoquinona y el PSI, y también pueden ser usados para respirar en bajos niveles de O₂ producidos por el PSII durante las condiciones de foto-producción de H₂ (Gibbs *et al.*, 1986).

1.9. Producción anaerobia de H₂ mediante el uso de agentes reductores

La producción de H₂ por microalgas se clasifica en 2 categorías: fotólisis directa, cuando H₂ se produce a partir de electrones que surgen del proceso de disociación del agua de la fotosíntesis; y fotólisis indirecta, cuando H₂ se produce a partir de electrones que se derivan del catabolismo de los carbohidratos (Prince y Kheshgi, 2005). En ambos procesos, la Fe-H₂asa reduce los electrones a H₂ molecular. Sin embargo, la expresión de hidrogenasa y su actividad se suprimen por el O₂ que se produce durante la fotosíntesis (Forestier *et al.*, 2003). Así, durante la fotólisis directa, las microalgas producen H₂ pero también O₂ que a su vez inhibe Fe-H₂asa y, por tanto, la producción de H₂. Para hacer frente a esta incompatibilidad de producción simultánea de H₂ y O₂,

algunos investigadores se han centrado en la identificación o la mejora de microalgas mediante ingeniería genética para producir hidrogenasas tolerantes al O₂ que restrinja el acceso al sitio catalítico (Cohen *et al.*, 2005).

Por otro lado, la fotólisis indirecta es efectuada cuando el O₂ y la producción de H₂ están separados por el tiempo: la actividad de la fotosíntesis oxigénica se reduce o se inhibe, mientras que la respiración mitocondrial se mantiene sin cambios y consume el O₂ presente. En estas condiciones, hay un consumo neto de O₂ por las células, se establecen condiciones anaerobias que son necesarias para la expresión de la Fe-H₂asa y se lleva a cabo la producción de H₂. Para alterar la relación fotosíntesis:respiración en las microalgas, se han propuesto varias estrategias, tales como: la privación de azufre del medio de cultivo lo que inhibe de manera reversiblemente el PSII (Melis *et al.*, 2000); mutantes que tengan la antena cosechadora de luz truncada para aumentar la producción H₂ (Kosourov *et al.*, 2011); mutantes con Fe-H₂asa tolerantes al O₂ provenientes de otros organismos como *Ralstonia eutropha* (Murthy y Ghirardi, 2013); mutantes con una menor actividad de la sulfato permeasa para limitar el suministro de sulfatos al cloroplasto y reducir la evolución del O₂, el uso de inhibidores del PSII (Chen *et al.*, 2005); y la generación de mutantes con la capacidad de sobre acumular almidón y así mejorar la producción de H₂ (Kruze *et al.*, 2005). Sin embargo, ninguno de estos métodos ha conseguido su desarrollo completo.

Por su parte, el protocolo más empleado para la producción de H₂ con microalgas, el método de privación de azufre, presenta diferentes complicaciones como: causa la muerte de los cultivos de microalgas; resulta costoso de escalar a volúmenes de cultivo industrial y; requiere de un método de cosecha para las microalgas, como la centrifugación, que promueve la muerte de las células y que presenta altos consumos de energía (Tamburic *et al.*, 2011). Por lo tanto, los métodos sencillos y económicos que fomenten una condición conocida como "fotosíntesis anaerobia oxigénica" debe ser desarrollada, en la cual el O₂ fotosintético se consuma tan pronto como sea liberado, creando condiciones anaerobias para el metabolismo de producción de H₂ (Hemschemeier *et al.*, 2009). Dicho consumo de O₂ mejoraría la producción de H₂ porque ambos procesos, la fotosíntesis y el catabolismo de carbohidratos donaría electrones a la Fe-H₂asa. Para demostrar este concepto, se pueden utilizar agentes reductores para disminuir la producción de O₂ de la fotosíntesis y para inducir la producción anaeróbica

de H_2 , cuando la fotosíntesis y la respiración mitocondrial ocurren simultáneamente. Existen varios agentes capaces de reducir el O_2 disuelto del medio de cultivo, tales como: el sulfito sodio, la hidroquinona, el ácido ascórbico y la cisteína.

El sulfito sodio es una sal inorgánica con propiedades antioxidantes y conservadoras y cuando se oxida toma un O_2 y se convierte en sulfato de sodio. Los sulfitos son capaces de afectar la formación de hidrogenasa pero no su actividad en cultivos de *Scenedesmus* (Hartman y Krasna, 1963). Además, el sulfito de sodio y el bisulfito de sodio previenen la acumulación de O_2 fotosintético en cultivos de *Phaeodactylum tricornutum* (Acien-Fernandez *et al.*, 2003). El tiosulfato de sodio es un agente reductor capaz de secuestrar a las especies reactivas de O_2 (ROS, por sus siglas en inglés) y proteger las células de *Chlorella sp.* y *Chlorella sorokiniana* (Feng *et al.*, 2005; Ngangkham *et al.*, 2012).

La hidroquinona es un fenol que reacciona con el O_2 molecular en soluciones alcali (auto-oxidación) (La Mer y Rideal, 1924) y elimina el O_2 del medio acuoso (Kerst, 1981). La velocidad de auto-oxidación depende del pH, se producen rápidamente a pH alcalino para dar una solución marrón pero muy lentamente en medio ácido. Su ecotoxicidad es alta (<1 mg / L para los organismos acuáticos) y las cianobacterias son muy sensibles a la hidroquinona (Bähns *et al.*, 2013), mientras que las especies de algas verdes, levaduras, hongos y plantas son más resistentes (Trevors y Basaraba, 1980). Los efectos inhibidores de los compuestos fenólicos, tales como lignina, parecen ser algistática en lugar de alguicida (Xiao *et al.*, 2010). Por lo tanto, la hidroquinona podría tener un efecto similar en microalgas. En cultivos de microalgas, los agentes reductores actúan como antioxidantes que atrapan los ROS y protegen a las células de sus efectos (Asada, 2006). Los antioxidantes comunes en los organismos fotosintéticos incluyen: pigmentos, metales, compuestos de sulfito, cisteína, y ácido ascórbico (Slater *et al.*, 1987; Davey *et al.*, 2000).

La cisteína es un agente reductor usado para preparar los medios anaerobios para el crecimiento de microorganismos anaerobios estrictos. La cisteína tiene propiedades reductoras gracias a su grupo tiol, que reacciona con un grupo tiol de otra cisteína para generar un enlace disulfuro, liberando $2H_2$ que reacciona con O_2 para formar agua. El grupo tiol ayuda a la célula a combatir el estrés oxidativo mediante la captura de las especies reactivas de O_2 , tales como O_2 , O_2^- y H_2O_2 (He y Häder).

El ácido ascórbico es muy popular por su actividad antioxidante, neutralizando los radicales libres, capturando los O_2^- y O_3^- y la descomposición de los peróxidos de hidrógeno (Davey *et al.*, 2000). En los cultivos de *Anabaena* sp., el ácido ascórbico invierte el estrés oxidativo, protege lípidos de la oxidación y evita el fotoblanqueamiento de clorofilas (He y Häder). Los agentes reductores se pueden utilizar en cultivos de algas para estudiar sus efectos sobre el consumo de O_2 fotosintético y examinar la producción de H_2 cuando la fotosíntesis oxigénica y la respiración mitocondrial se producen de forma simultánea. Pero sin que afecten el estado fisiológico de las microalgas y la inducción de la expresión y actividad de Fe- H_2 asa. Con el objeto de mejorar los rendimientos de producción de H_2 en *Chlamydomonas reinhardtii* cc849 se han estudiado, además de los agentes reductores, la adición de diferentes géneros de bacterias (*Stenotrophomonas* y *Pseudomonas*) para aumentar la tasa de respiración o el consumo de O_2 , logrando aproximadamente 4 veces más producción de H_2 con los cocultivos (Li *et al.*, 2013).

2. JUSTIFICACIÓN

En la actualidad existe una necesidad para producir combustibles con el fin de satisfacer la creciente demanda de energéticos, sin depender de los combustibles fósiles, mediante un mecanismo alternativo de generación de energía libre de emisiones de carbono a la atmósfera, menos contaminante, renovable, disponible y abundante.

La alternativa con mayor potencial es la producción del gas H_2 . Este gas tiene gran cantidad de energía por unidad de masa y su combustión no emite gases contaminantes. No obstante, su utilización como energético presenta un desafío importante, ya que se encuentra unido con otro elemento y debe separarse. Algunas especies de microalgas son capaces de separar el H_2 mediante la biofotólisis utilizando la enzima Fe- H_2 asa en un medio anaerobio a través del protocolo de privación de azufre del medio de cultivo.

Sin embargo, sólo se ha estudiado un pequeño número de especies de microalgas y algunas combinaciones de parámetros ambientales. Además, el método de privación de azufre, presenta diferentes complicaciones como: provocar la muerte de los cultivos de microalgas; resulta costoso de escalar a volúmenes de cultivo industrial; requiere de un método de cosecha costoso y; disminuye la vida productiva de los cultivos de microalgas. Por lo tanto, es necesario continuar la investigación en busca de: especies de microalgas con el potencial para producir H_2 ; determinar la combinación de parámetros ambientales que favorezcan la producción de H_2 y; determinar la viabilidad del uso de agentes reductores capaces de disminuir el O_2 disuelto del medio de cultivo para lograr la producción de H_2 .

3. HIPÓTESIS

La producción de H_2 con microalgas clorofíceas aumenta cuando se eleva la irradiancia y la temperatura en los cultivos

La producción de H_2 con las microalgas clorofíceas aumentará al sustituir la fuente de carbono orgánica del medio TAP por una fuente más económica y de fácil acceso como la sacarosa y ácido acético comercial

Si las microalgas son capaces de producir H_2 bajo condiciones anaerobias a través de la enzima Fe- H_2 asa que es altamente sensible al O_2 mediante la eliminación del azufre del medio de cultivo, entonces, será posible producir H_2 manteniendo niveles mínimos de O_2 fotosintético mediante la adición de consumidores químicos y/o biológicos de O_2 sin privar a las microalgas de azufre.

4. OBJETIVO GENERAL

Determinar el efecto de las condiciones ambientales y la reducción de los niveles de oxígeno fotosintético sobre el crecimiento y la producción de hidrógeno en cultivos de microalgas (*Chlorophyceae*).

4.1 Objetivos Particulares

- Evaluar el potencial de cinco especies de microalgas para producción de H₂ en cultivos bajo condiciones autotróficas y heterotróficas mediante el protocolo de privación de azufre.
- Evaluar el efecto de distintas condiciones ambientales de cultivo (irradiancia, temperatura y fuente de carbono) sobre la producción de H₂ en cultivos de las especies seleccionadas, *C. gloeopara* y *S. obliquus*, mediante el protocolo de privación de azufre.
- Desarrollar estrategias para el establecimiento y mantenimiento de condiciones anaerobias mediante el consumo del O₂ fotosintético en cultivos heterótrofos de microalgas provistos de azufre que permitan la producción de H₂.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. Especies de trabajo

Este estudio se dividió en tres secciones de manera que se logran cubrir los objetivos específicos. Cada sección se subdividió en diferentes ensayos que estuvieron ligados, con el fin de cubrir el objetivo general (Figura 3).

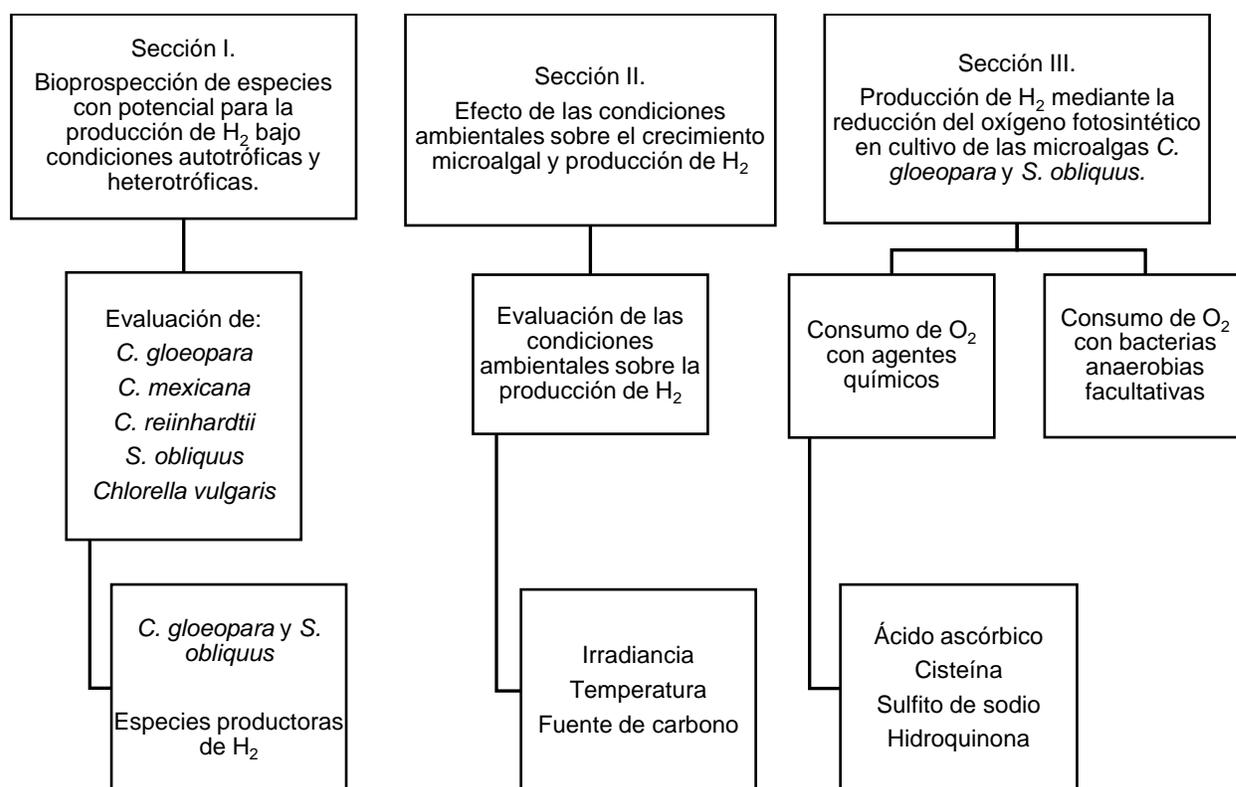


Figura 3. Esquema general del trabajo de tesis sobre el efecto de las condiciones ambientales y la adición de consumidores de oxígeno sobre el crecimiento y la producción de hidrógeno en cultivos de microalgas (Chlorophyceae).

Para el presente estudio se utilizaron cinco especies de microalgas de la clase Chlorophyceae: *Chlamydomonas gloeopara*, *C. mexicana*, *Scenedesmus obliquus* y *Chlorella vulgaris* procedentes de la colección particular de la Dra. Pilar Sánchez del Laboratorio de Biología y Cultivo de Microalgas del Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada (CICESE).

C. gloeopara Rodhe y Skuja 1948 (CMGO) obtenida del Institute of Applied Microbiology, The University of Tokyo, Bunkyo-Ku, Tokyo, Japan (IAM). Se adquirió por compra en 1990 y la Dra. M. del Pilar Sánchez Saavedra la mantiene en cultivo desde 1996. Son células bentónicas, esféricas, aisladas o en conglomerados. Sus dimensiones son de 5.5 a 11 μm de diámetro, no móviles.

C. mexicana Lewin 1957 (CMM) obtenida del Institute of Applied Microbiology, The University of Tokyo, Bunkyo-Ku, Tokyo, Japan (IAM). Se adquirió por compra en 1990 y la Dra. M. del Pilar Sánchez Saavedra la mantiene en cultivo desde 1996. Son células bentónicas de forma ovoide constan de dos vacuolas contráctiles apicales, su cloroplasto es en forma de copa y tiene dos flagelos. Tienen un diámetro de 5.5 a 11 μm y son no móviles.

C. reinhardtii (CMR) son células móviles unicelulares ovoides con un diámetro aproximado de 10 μm y se desplaza mediante el uso de dos flagelos. Como especie control en los ensayos de producción de H_2 , se utilizó *C. reinhardtii* CDBB-A-1050 (CC-125 wild type mt⁺ 137c), debido a su capacidad para producir H_2 (Godaux *et al.*, 2013). *C. reinhardtii* fue obtenida de la Colección Nacional de Cepas Microbianas y Cultivos Celulares del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (CINVESTAV-IPN). Esta especie se adquirió por compra en 2012 y la Dra. M. del Pilar Sánchez Saavedra la mantiene en cultivo desde 2013.

Chlorella vulgaris Beyerinck 1890 (CLV) obtenida del Institute of Applied Microbiology, The University of Tokyo, Bunkyo-Ku, Tokyo, Japan (IAM). Se adquirió por compra en 1990 y la Dra. M. del Pilar Sánchez Saavedra la mantiene en cultivo desde 1996. Son células esféricas con un diámetro de 5 a 10 μm y son móviles. Esta especie se utiliza comercialmente, principalmente debido a su capacidad de acumular ácidos grasos saturados e insaturados (Liang *et al.*, 2009).

S. obliquus (Turpin) Kützing 1833 (SCO) obtenida del Institute of Applied Microbiology, The University of Tokyo, Bunkyo-Ku, Tokyo, Japan (IAM). Se adquirió por compra en 1990 y la Dra. M. del Pilar Sánchez Saavedra la mantiene en cultivo desde 1996. Son células móviles que forman un cenobio, que es un agregado de células que consta de 2 a 4 células fusiformes con ápices acusados en series lineales o sublineales con tamaños entre 3 y 9 μm de ancho por 10 a 21 μm de largo y su pared celular es lisa sin espinas y son no móviles (Tiffany y Briton, 1971).

El mantenimiento de las cinco especies se realizó en cultivos por lotes, monoespecíficos, no axénicos en frascos de vidrio de 500 mL con 150 mL de medio autótrofo "f" (Guillard y Ryther, 1962), a una irradiancia de $80 \mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$ provista por medio de lámparas fluorescentes de luz blanca fría (Philips F40CW), con luz continua y una temperatura controlada de $20 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$.

Para la preparación del medio de cultivo, se utilizaron frascos de vidrio de 500 mL con 150 mL de agua del sistema potable de la ciudad de Ensenada que fueron esterilizados con calor húmedo 20 min a $120 \text{ }^\circ\text{C}$ y a $1.05 \text{ kg}/\text{m}^2$ de presión. Posteriormente, las botellas con agua estéril se dejaron enfriar hasta alcanzar $20 \text{ }^\circ\text{C}$ y se colocaron dentro de una campana de flujo laminar (Air Clean 600 PCR Workstation, ISC BioExpress) previamente esterilizada con luz UV durante 20 min. Dentro de la campana de flujo laminar se adicionaron a las botellas con agua esterilizada los nutrientes del medio "f".

5.2. Bioprospección de especies con potencial para la producción de H_2 en cultivos con medio autótrofo y heterótrofo

Los cultivos de las cinco especies de Chlorophyceae se mantuvieron en frascos de vidrio de 500 mL con 150 mL de medio autótrofo "f" (Guillard y Ryther, 1962), a $20 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ con luz fría provista por lámparas fluorescentes (F40CW) y con una irradiancia continua de $80 \mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$. Se realizó una modificación al medio de cultivo autótrofo "f" (Guillard y Ryther, 1962), donde se sustituyó la concentración molar de nitrógeno aportado por el NaNO_3 por una concentración equivalente de NH_4Cl .

En este ensayo se evaluaron dos tipos de medios de cultivo (Tabla 1): como medio autótrofo se utilizó medio "f" modificado (Guillard y Ryther, 1962) y como medio heterótrofo se utilizó el medio TAP (Harris, 2009).

Los tratamientos se realizaron por triplicado y se mantuvieron en matraces Erlenmeyer de 250 mL con 120 mL de cada tipo de medio. Los 2 medios de cultivo se esterilizaron y prepararon como se describe en la sección 5.1.

Los matraces Erlenmeyer se inocularon con: 8.75×10^3 cél/mL de *C. gloeopara*; 27.5×10^3 cél/mL de *C. mexicana*; 50×10^3 cél/mL de *C. reinhardtii*; 50×10^3 cél/mL de *Chlorella vulgaris*; y 113.8×10^3 cél/mL de *S. obliquus*.

Las condiciones de cultivo para la producción de biomasa fueron (Etapa I): temperatura de $20 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$, la luz se suministró de forma continua y fue provista por medio de lámparas

fluorescentes de 40 watts de luz blanca a una irradiancia de $100 \mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$. Los matraces Erlenmeyer con los cultivos fueron agitados manualmente dos veces al día por 30 segundos durante 6 días.

Tabla 1. Formulación de los medios de cultivo heterótrofo TAP (Harris, 2009) y autótrofo “f” (Guillard y Ryther, 1962) modificado para un litro de medio de cultivo.

<u>Medio TAP (Harris, 2009)</u>		<u>Medio “f” modificado (Guillard y Ryther, 1963)</u>	
<u>1) Solución Tris en 1 L</u>		<u>a) Solución nitratos y fosfatos en 1 L</u>	
Tris base $H_2NC(CH_2OH)_3$	2.42 g	NH_4Cl	94.32 g
hidroximetil amino metano			
<u>2) Sales TAP en 1 L</u>		NaH_2PO_4	10.00 g
NH_4Cl	15 g		
$MgSO_4 \cdot 7H_2O \ddagger$	4 g		
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	2 g	<u>b) Solución de vitaminas en 1 L</u>	
<u>3) Solución de fosfatos en 100 mL</u>		Biotina	10 mL de 0.2 mg/L
K_2HPO_4	28.8 g	Vitamina B12	1 mL de 2 mg/L
KH_2PO_4	14.4 g	Tiamina HCl	0.4 g
<u>4) Elementos Traza en 100 mL</u>		<u>c) Elementos traza en 1 L</u>	
$CuSO_4 \cdot 5H_2O \ddagger$	0.16 g	$CuSO_4 \cdot 5H_2O \ddagger$	2.00 g
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O \ddagger$	2.20 g	$ZnSO_4 \cdot 7H_2O \ddagger$	4.40 g
$CoCl_2 \cdot 6H_2O$	0.16 g	$CoCl_2 \cdot 6H_2O$	2.00 g
$MnCl_2 \cdot 4H_2O$	0.50 g	$MnCl_2 \cdot 4H_2O$	3.60 g
$(NH_4)_6MoO_3$	0.11 g	$NaMoO_4 \cdot 2H_2O$	1.26 g
$Na_2EDTA \cdot 2H_2O$	5.00 g	Na_2EDTA	8.72 g
H_3BO_3	1.14 g	$FeCl_3 \cdot 6H_2O$	6.30 g
<u>Mezcla final para 1 L de medio</u>		<u>Mezcla final para 1 L de medio</u>	
1) Solución Tris	972.6 mL	a) Solución nitratos y fosfatos	1 mL
2) Sales TAP	25 mL	b) Solución de vitaminas	1 mL
3) Solución de fosfatos	0.375 mL	c) Elementos traza	1 mL
4) Elementos Traza	1 mL	Agua potable esterilizada	997 mL
Ác. acético CH_3COOH	1 mL		

‡ Sales de azufre (SO_4^{2-}) reemplazadas por sales de cloruro ($MgCl_2$, $ZnCl_2$, $CuCl_2$ y $FeCl_2$) para la inducción a la producción de H_2 .

5.2.1. Inducción anaerobia para la producción de H₂ en cultivos autótrofo y heterótrofo

Después de tener los cultivos por 6 días en la etapa de producción de biomasa (Etapa I), las células de cada especie de microalga fueron inducidas a la producción de H₂ (Etapa II). Para la inducción a la producción de H₂ en la presente investigación, las células fueron cosechadas y transferidas a un medio libre de azufre ya fuese el autótrofo o bien el medio heterótrofo, en donde todas las sales de azufre (SO₄⁻²) de los dos medios fueron reemplazadas por sales de cloruro (MgCl₂, ZnCl₂, CuCl₂ y FeCl₂) (Melis *et al.*, 2000; Tsygankov *et al.*, 2006). Para los cultivos de *C. gloeopara*, *C. mexicana* y *Chlorella vulgaris* la biomasa de células fue cosechada mediante sedimentación después de 2 horas de haber sido agitadas. Mientras que la biomasa de *C. reinhardtii* y *S. obliquus* se cosecharon por centrifugación a 453 gravedades durante 4 min a 20 °C. El paquete de células de cada especie fue lavado dos veces con medio heterótrofo TAP o bien medio autótrofo "f" libre de azufre, dependiendo de cada tratamiento.

Todo el paquete celular obtenido de los cultivos mantenidos en las tres repeticiones experimentales de cada especie, fueron transferidos para cada especie y tipo de medio de cultivo a un solo biorreactor de 250 mL, para inducir la producción H₂ mediante la privación del azufre en el medio (Etapa II). Cada biorreactor fue provisto con medio heterótrofo o bien medio autótrofo libre de azufre según el caso para cada tratamiento.

Los biorreactores se cerraron herméticamente después de 24 h de haber iniciado la etapa de inducción a la producción de H₂. Para medir el volumen de gas producido en cada biorreactor, se conectó una manguera de plástico desde la tapa de los biorreactores hasta el interior de un tubo Falcon graduado invertido de fondo cónico (18 mL). El tubo Falcon contenía en su totalidad salmuera acidificada (HCl y pH 2) y se colocó dentro de un vaso de precipitado de 100 mL para medir el gas producido por desplazamiento de la salmuera (Figura 4). Los cultivos se mantuvieron bajo condiciones de luz y temperatura similares a las descritas para la sección de producción de biomasa (Etapa I, sección 5.2).



Figura 4. Biorreactor de vidrio cerrado herméticamente acoplado al dispositivo de medición de gas por desplazamiento de salmuera acidificada.

La producción de H_2 expresado como $mL H_2/L$ se obtuvo para cada caso de la relación entre el volumen de H_2 producido en la Etapa II en cada biorreactor respecto al volumen total de cultivo. La productividad de H_2 se obtuvo de la relación entre la producción de H_2 entre el tiempo total de la Etapa II (h).

El rendimiento se obtuvo dividiendo la producción de H_2 de cada tratamiento entre el peso seco orgánico (PSO) en la Etapa II.

5.2.2. Métodos analíticos

Crecimiento y pH

La evaluación del crecimiento ($cél/mL$) se llevó a cabo durante la producción de biomasa (Etapa I), mediante el conteo de células cada día usando una cámara de Neubauer (de 0.10 mm de profundidad, Hausser Scientific) y un microscopio (Carl Zeiss Axio Lab. A1). Con los datos de crecimiento de la fase exponencial, se calculó la tasa de crecimiento usando la ecuación descrita por Fogg y Thake (1987).

$$\mu = \frac{(\log_2 N_2) - (\log_2 N_1)}{t_2 - t_1} \quad (2)$$

En donde μ es la tasa de crecimiento, N_2 es la concentración de células al tiempo 2 (t_2), al final de la fase de crecimiento exponencial y N_1 es la concentración de células al tiempo 1 (t_1), al inicio de la fase de crecimiento exponencial. \log_2 es el logaritmo base dos de los datos de los conteos de células.

Al final de la Etapa II, se evaluó el tamaño de las células para determinar el posible efecto por las condiciones experimentales. Se tomó una alícuota de 1 mL de cada cultivo y se preservó con lugol. Las mediciones de las células se realizaron con un microscopio (Carl Zeiss Axio Lab. A1) con aumento 50X.

El pH del medio de cultivo se determinó con un potenciómetro portátil HI 98103 (Hanna).

Carbohidratos totales

Para cuantificar el contenido de los carbohidratos totales y de pigmentos, se tomaron submuestras de 2 mL de cada condición experimental y se pasaron a través de filtros de fibra de vidrio 24 mm de diámetro Whatman GF/C con una abertura de poro de 1 μm . Los carbohidratos totales se cuantificaron los días 3 y 6 durante la etapa de producción de biomasa (Etapa I) y el día 20 de la etapa de inducción a la producción de H_2 (Etapa II). La extracción de los carbohidratos totales se realizó de acuerdo al método de Whyte (1987); y la cuantificación utilizando el método de fenol-ácido sulfúrico (Dubois *et al.*, 1956). La disminución de carbohidratos se obtuvo al restar de la concentración de carbohidratos de la Etapa II, la concentración de carbohidratos de la Etapa I.

Pigmentos

Los pigmentos: clorofila "a" y los carotenoides se extrajeron con acetona (90%) y se cuantificaron siguiendo la técnica espectrofotométrica descrita por Parsons *et al.* (1984) y usando un espectrofotómetro Hach modelo DR/40000 UV-VIS.

Peso seco

El peso seco total (PS), peso seco orgánico (PSO) y peso de cenizas (PC) para cada especie y en cada condición experimental se cuantificó según la técnica propuesta por Sorokin (1973). Para las mediciones de peso seco se emplearon filtros de fibra de vidrio con una apertura de 1 μm (GF/C Whatman de 47 mm de diámetro). Estos filtros fueron previamente pre-incinerados en una mufla (Furnace FB 1415M, Barnstead International) a una temperatura de 450 °C por un periodo de 6 h. Para evaluar el peso seco, los filtros con muestras se mantuvieron en una estufa (Liberberg Blue M, modelo OV 560A-2) a una temperatura de 60 °C por un periodo de 8 h, a distintos intervalos de tiempo los filtros se pesaron en una balanza (Mettler, modelo AE-240), hasta alcanzar peso seco constante. Para evaluar el contenido de cenizas los filtros con muestras secas, fueron incinerados en una mufla a una temperatura de 450 °C por un periodo de 6 h y fueron pesados hasta obtener peso seco constante. El peso seco orgánico de las muestras se calculó restando al peso seco total menos el peso de cenizas.

Fotosíntesis

Para medir la tasa fotosintética de los cultivos de las diferentes especies de microalgas mantenidos en los dos medios "f" y TAP, se utilizó el método de evaluación de la producción de O₂ de las células. Las mediciones se realizaron el día 6 (final de la Etapa I) y el día 20 (final de la Etapa II). Se tomó una alícuota de 9 mL de cultivo de cada condición experimental. Previo a las mediciones, las muestras se colocaron en oscuridad durante 10 minutos, para que las células se mantuviesen ávidas de luz.

Para la Etapa II, las tres repeticiones de cada tratamiento se acopiaron en un sólo cultivo para aumentar la señal debido a la poca biomasa de células. Por tanto, no se tienen repeticiones de los tratamientos.

La producción de O₂ disuelto de cada muestra se midió dentro de una cámara de acrílico cerrada tipo Clark con un volumen de 7.5 mL, la cual estaba equipada con un electrodo de O₂ de alta sensibilidad (YSI 5331, Yellow Spring Instruments Co., USA) conectado a un fotodetector y a un graficador de banda marca Hent Schlumberger interconectado a un modulador y a un amplificador. Durante las mediciones, dentro de la cámara se colocó un agitador magnético a una velocidad de agitación de 150 rpm. Previo a las mediciones

se estableció la línea base con 0% y 100% de saturación O₂ a nivel del mar a una temperatura de 26 °C.

La fotosíntesis se midió por medio de la evolución del O₂ producido con distintas irradiancias al colocar el cultivo en la cámara de acrílico. Se utilizó una lámpara de halógeno de 250 W (Xenophot HLX, Osram, Munich, Germany) como fuente de luz y las distintas irradiancias se obtuvieron colocando 6 filtros con malla de distinta abertura dejando pasar diferentes cantidades de luz (100, 142, 315, 664, 830, 1827, 2740, 5066 μE/m²/s). Las irradiancias se midieron con un radiómetro equipado con un sensor 4π marca Biospherical Instrument (modelo QSL-100). El O₂ consumido por las microalgas (respiración) se registró colocando la cámara en oscuridad.

Con los datos obtenidos de la producción de O₂ para cada irradiancia, se calcularon los parámetros fotosintéticos a partir de las curvas fotosíntesis-irradiancia (P-E). Con los valores de la fase lineal de la curva de fotosíntesis se realizó una regresión lineal para obtener la eficiencia fotosintética o pendiente inicial de la fotosíntesis (α) y además se obtuvo la fotosíntesis máxima (P_{máx}) y el índice de saturación lumínica (Ik) (Figuroa *et al.*, 1997).

Producción de H₂: método colorimétrico y por cromatografía

La producción del gas H₂ se evaluó diariamente por el método de desplazamiento de salmuera acidificada. La detección cualitativa del H₂ se realizó colectando el gas acumulado por medio de una jeringa y burbujeándolo dentro de un tubo de vidrio sellado herméticamente al vacío que contenía una solución de azul de Coomassie 0.025 M en presencia del catalizador de Wilkinson (Katsuda *et al.*, 2006). Como control positivo de la presencia de H₂ se utilizó gas H₂ grado cromatográfico y como control negativo aire. El cambio de coloración de azul intenso a azul traslucido o gris claro indicó la presencia de H₂ en la muestra de gas. A menor coloración de la solución de azul de Coomassie mayor la concentración de H₂. Además, la cuantificación del contenido de H₂ producido en cada tratamiento, se realizó en el laboratorio del Departamento de Biología Molecular del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A. C. (IPICYT) utilizando un cromatógrafo de gases (modelo 6890N, Agilent, Santa Clara, CA) equipado con un

detector de conductividad térmica (TCD) y columna capilar Hp Molsieve (30 mm x 0,32 mm x 12 µm) con gas argón como acarreador con un flujo de 1.6 mL/min. Las temperaturas se mantuvieron a 210 °C, 200 °C y 40 °C para el detector, el inyector y la columna, respectivamente. Se inyectaron 30 µL de gas de cada una de las muestras.

5.2.3. El análisis estadístico

Los valores de la tasa de crecimiento de *C. gloeopara*, *C. mexicana*, *C. reinhardtii*, *S. obliquus* y *Chlorella vulgaris* del ensayo bioprospección con medio autótrofo y heterótrofo se analizaron mediante un análisis de covarianza de dos vías (ANCOVA), en donde se utilizó el tiempo en días como covariable y con un nivel de confianza del 95%. Cuando se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos, se utilizó el análisis *a posteriori* de Tukey.

Para la tasa específica de crecimiento en la fase exponencial y la producción de H₂, los datos fueron analizados mediante un análisis de varianza de dos vías (ANOVA) con un nivel de confianza del 95%. Cuando se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos, se utilizó el análisis *a posteriori* de Tukey.

Los resultados obtenidos carbohidratos totales, clorofila "a", carotenoides, peso seco total, peso seco orgánico y cenizas obtenidos de los dos diferentes tratamientos se analizaron mediante un análisis de varianza de dos vías (ANOVA) con un nivel de confianza del 95%. Cuando se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos, se utilizó el análisis *a posteriori* de Tukey.

Para todos los datos analizados se verificaron los supuestos de normalidad y de homogeneidad de varianzas. Todos los datos fueron analizados con el programa estadístico STATISTICA ® versión 7.0 (Stat Soft Inc. EE.UU., 2004). Las gráficas se realizaron mediante el programa Excel 2013 y Sigma Plot 10.

5.3. Efecto de las condiciones ambientales sobre el crecimiento microalgal y la producción de H₂

5.3.1. Efecto de la irradiancia y temperatura sobre crecimiento microalgal y producción de H₂

Selección de especies

Para esta sección de la experimentación, se tomaron como base los resultados obtenidos en la sección 5.2 sobre de la bioprospección de especies con potencial para la producción de H₂ en cultivos con medio autótrofo y heterótrofo. En función de estos resultados se seleccionaron dos especies de microalgas *C. gloeopara* y *S. obliquus* para estudiar el efecto de la irradiancia y la temperatura sobre el crecimiento y la producción de H₂. Los criterios bajo los cuales se seleccionaron estas especies fueron mayor crecimiento, mayor producción de H₂ y mayor facilidad para la cosecha de la biomasa.

Los cultivos de *C. gloeopara* y *S. obliquus* se mantuvieron por triplicado en sistemas estáticos, monoespecíficos, no axénicos y en matraces Erlenmeyer de 125 mL con 100 mL de medio de cultivo TAP (Harris, 2009). El medio de cultivo se esterilizó y preparó como se describe en la sección 5.1.

Para el cultivo de cada una de las especies, se utilizó un diseño factorial de dos vías tomando irradiancia y temperatura como las variables independientes. Los valores de irradiancia y temperatura empleados en este ensayo estuvieron dentro del intervalo reportado anteriormente por diversos autores.

Las condiciones experimentales fueron provistas por:

- A) Dos irradiancias continuas (100 $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$ y 400 $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$), suministradas por lámparas fluorescentes de luz blanca fría (Silvana F40CW).
- B) Tres temperaturas (20, 25 y 30 °C) proporcionadas por cámaras ambientales.

Se evaluó diariamente el crecimiento de los cultivos hasta llegar al inicio de la fase estacionaria de crecimiento (Etapa I), esto se realizó mediante conteos directos como se describió en la sección 5.2.2.

Al final de la Etapa I, se cuantificó la concentración de pigmentos y el contenido de carbohidratos totales para los cultivos mantenidos en cada condición experimental como se indicó en la sección 5.2.2.

Los cultivos de microalgas se mantuvieron bajo estas condiciones experimentales para lograr la producción de biomasa durante 8 días (Etapa I). Después, la biomasa fue cosechada e inducida a la producción de H₂ durante 8 días mediante la técnica de privación de azufre previamente descrita en la sección 5.2.1 (Etapa II). Para este caso, el paquete de células de cada especie fue transferido a un medio heterótrofo (TAP) sin aporte de azufre (TAP-S).

En Etapa II, se determinó cualitativamente y cuantitativamente el gas H₂ producido en cada condición experimental de acuerdo al protocolo propuesto por Katsuda *et al.* (2006) como se describió previamente en la sección 5.2.2.

Se evaluó el tamaño de las células (largo y ancho) para determinar el posible efecto por las condiciones experimentales. Se tomó una alícuota de 1 mL de cada cultivo y se preservó con lugol. Las mediciones de las células se realizaron con un microscopio confocal invertido LSM 510 (Zeiss), con un láser He-Ne rojo 633 con longitudes de onda de emisión de 692 nm y de excitación de 543 nm, con un pinhole de 1.92 a 2.76 μm . Las imágenes de las células fueron capturadas mediante una cámara Axio CAM HRc, en un tamaño de 512x 512 píxeles y modificadas con el programa de edición de imágenes AxioVert 200 ® versión 4. El tiempo de exposición fue entre 6.29 y 12.58 segundos.

5.3.2. Efecto del aporte de carbono sobre la producción de H₂

Se evaluó el efecto de diferentes aportes de carbono orgánico sobre el crecimiento y la producción de H₂ de *C. gloeopara* y *S. obliquus*.

Los cultivos se mantuvieron por triplicado en sistemas estáticos, monoespecíficos, no axénicos y en matraces Erlenmeyer de 125 mL con 100 mL de heterótrofo TAP (Harris, 2009). Como fuente de carbono se utilizaron tres aportes orgánicos: a) vinagre comercial grado alimenticio marca La Costeña al 5% con acidez expresada como ácido acético (AA 5%); b) sacarosa comercial grado alimenticio sin refinar marca Zulka (Sacarosa); 3) ácido acético glacial grado reactivo (TAP). Los dos aportes orgánicos comerciales sustituyeron al ácido acético grado reactivo del medio heterótrofo TAP (Harris, 2009). Se consideró la concentración atómica del carbono proveniente del ácido acético del medio TAP (17.4 mM) y se sustituyó en cada tratamiento la misma cantidad para cada uno de los aportes de carbono.

Los tratamientos experimentales fueron los siguientes: Control TAP (Harris, 2009) (17.4 mM de ácido acético); Medio TAP + sustitución de ácido acético comercial al 5% (17.4 mM de ácido acético) (TAP / AA 5%); Medio TAP + sustitución de sacarosa 2.3 mM (Sacarosa).

Los cultivos se mantuvieron a 20 ± 1 °C y 100 $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$ con luz continua proporcionada por lámparas fluorescentes de luz blanca fría (Philips F40CW). Los matraces fueron agitados manualmente dos veces al día. Se midió el pH diariamente con un potenciómetro portátil HI 98103 (Hanna).

Los cultivos se mantuvieron bajo estas condiciones de crecimiento durante 8 días para lograr la producción de biomasa (Etapa I). Después, los cultivos fueron inducidos a la producción de H₂ mediante la técnica de privación de azufre al final de la fase estacionaria (Melis *et al.*, 2000). Durante la Etapa II, las células de cada especie y para cada condición experimental, fueron cosechadas y transferidas a biorreactores de vidrio y se cuantificó la producción de H₂, como se describió en la sección 5.2.2. La comprobación de la presencia de H₂ se realizó siguiendo el protocolo propuesto por Katsuda *et al.* (2006), como se describió en la sección 5.2.2.

Durante la Etapa I, que corresponde al crecimiento de los cultivos hasta el inicio de la fase estacionaria de crecimiento (día 8), se evaluó la densidad celular mediante conteos directos como se describió en la sección 5.2.2. Al final de la Etapa I, se cuantificó el contenido de carbohidratos totales en las células de cada condición experimental, así como el peso seco orgánico y el peso de las cenizas como se describió en la sección 5.2.2.

Con base en los valores de los conteos de las células se evaluó la tasa de crecimiento durante la fase exponencial utilizando la ecuación descrita por Fogg y Thake (1987), como ya se describió en la sección 5.2.2.

Se midió el tamaño de las células de cada especie al inicio del cultivo (día 1) y durante la fase estacionaria de crecimiento (día 8) y se siguió el procedimiento descrito en la sección 5.2.2. Las imágenes fueron capturas mediante una cámara Evolution MP COLOR Media Cyberntics. Para las mediciones se empleó el programa Image Pro Discovery versión 4.5.1.32.

5.3.4. Análisis estadístico

Los valores de tasa de crecimiento, así como los valores de producción de H₂ de *C. gloeopara* y *S. obliquus* del ensayo relacionado con el efecto de la irradiancia y temperatura y del ensayo sobre el efecto del aporte de carbono sobre la producción de H₂ se analizaron mediante un análisis de covarianza de dos vías (ANCOVA) con un nivel de confianza del 95%, tomando al tiempo como covariable.

Los datos de carbohidratos totales, clorofila "a" y carotenoides obtenidos en los ensayos relacionados con el efecto de la irradiancia, la temperatura y el aporte de carbono sobre la producción de H₂, se analizaron mediante un análisis de varianza de dos vías (ANOVA) con un nivel de confianza del 95%. Cuando se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos, se utilizó el análisis *a posteriori* de Tukey.

Los datos de peso seco orgánico y peso de las cenizas obtenidos en el ensayo sobre el efecto del aporte de carbono sobre la producción de H₂, se analizaron mediante un diseño completamente aleatorizado. Los datos de peso seco orgánico fueron transformados

mediante logaritmo natural y analizados mediante un análisis de varianza de una vía (ANOVA) con un nivel de confianza del 95%.

En todos los análisis realizados, cuando se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos, se utilizó un análisis *a posteriori* de Tukey (Zar, 1984).

Para todos los datos analizados se verificaron los supuestos de normalidad y de homogeneidad de varianzas. Todos los datos fueron analizados con el programa estadístico STATISTICA® versión 7.0 (Stat Soft Inc. EE.UU., 2004). Las gráficas fueron realizadas mediante el programa Excel 2013 y Sigma Plot 10.

5.4. Producción de H₂ mediante la reducción del O₂ fotosintético en el cultivo de microalgas

5.4.1. Efectos de los agentes reductores sobre el crecimiento y la reducción del O₂ disuelto

En esta sección el objetivo fue reducir o eliminar el O₂ fotosintético del medio de cultivo. Para ello, se utilizaron cuatro compuestos químicos previamente reportados por sus propiedades de reducir el O₂ disuelto: el ácido ascórbico (SIGMA), cisteína (SIGMA), sulfito de sodio (JT Baker), e hidroquinona (Merk Millipore). Cada agente reductor fue ensayado a tres concentraciones: baja (L), media (M) y alta (H) (mmol /L): ácido ascórbico, 0.2, 5.0 y 10.2 (He y Häder, 2002; Irihimovitch y Shapira, 2000); cisteína, 4.1, 6.2 y 8.3 (Hungate 1969; Yokoi *et al.*, 1998); sulfito de sodio, 0.04, 79.3 y 159 (Hartman y Krasna, 1963; Jayaraman *et al.*, 1999; Verma y Kummar, 2013); e hidroquinona, 0.09, 11.4 y 22.7, respectivamente (Shollna *et al.*, 1963, Bähns *et al.*, 2013; Trevors y Basaraba, 1980).

Todas las concentraciones ensayadas se realizaron en medio heterótrofo TAP (Harris, 2009) y se utilizaron dos tratamientos control: a) cultivos de microalgas sin agente reductor; y b) medio heterótrofo TAP sin células de microalgas con cada agente reductor. Todos los tratamientos se realizaron por triplicado en tubos de vidrio de 12 mL con 7 mL de medio de cultivo TAP y 0.5 g de esferas de vidrio (diámetro 1.5 mm) para agitar las células. Los tubos tenían tapón de rosca y un sello de goma que les permitió ser cerrados herméticamente. Los tubos de cultivo se inocularon con 2.55×10^5 cél/mL de *C. gloeopara* y 6.5×10^5 cél/mL de *S. obliquus*. Antes de cerrar los tubos, se realizó un intercambio de la atmósfera de los tubos mediante el burbujeo de nitrógeno durante 1 minuto. Los tubos de ensayo se incubaron a 20 ± 1 °C, la luz se suministró de forma continua provista por lámparas fluorescentes de luz fría (40 watts) a una irradiancia de 100 $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$ y los tubos de ensayo se agitaron manualmente dos veces al día. El crecimiento de las microalgas se midió diariamente por medio de lecturas de la densidad óptica, utilizando un espectrofotómetro con un soporte para tubos (Hach DR/4000 UV-VIS) a 680 nm. Al final del tiempo de incubación (192 h, tiempo en el que se observó el final de la fase

exponencial), se determinaron los niveles de O₂ disuelto en los cultivos de microalgas y en los tratamientos control, usando un electrodo de O₂ alta sensibilidad (YSI 5331, Amarillo Primavera Co., OH, EE.UU.) a 25 °C sobre el nivel del mar. Se estableció el tiempo para medir la producción de O₂, basado en los resultados de la curva de cultivo, tomando en cuenta el final de la fase exponencial como el momento de cosechar las microalgas y de pasar a la etapa de inducción a la producción de H₂.

5.4.2. Inducción anaerobia para la producción de H₂ con un agente reductor

Este ensayo fue realizado, tomando en consideración los resultados del ensayo anterior (sección 5.4.1) y se utilizó el agente reductor que mostró poco o ningún efecto negativo sobre el crecimiento de las microalgas y con la máxima capacidad para reducir el O₂ fotosintético que produjeron las microalgas durante el periodo de incubación.

Los tratamientos fueron: medio heterótrofo TAP (Harris, 2009) (control negativo para la producción de H₂); medio heterótrofo libre de azufre TAP (control positivo para la producción de H₂ según el método descrito por Melis *et al.* (2000), como se indica en la sección 5.2.1); y medio heterótrofo TAP suplementado con el agente reductor (en la concentración requerida para consumir el O₂ fotosintético). Todos los tratamientos se realizaron por triplicado en botellas serológicas de 125 mL con 120 mL de medio, las cuales fueron selladas herméticamente con anillos de metal en una atmósfera anaerobia de CO₂ (Plas Labs™ cámara anaerobia). Los cultivos realizados para cada tratamiento se inocularon monoespecíficamente con cada especie de microalgas a partir de cultivos en crecimiento exponencial, 1.3×10^6 cél/mL para *C. gloeopara* y 3.3×10^6 cél/mL para *S. obliquus*. Los cultivos fueron no axénicos y se incubaron a 28 ± 1 °C, la luz se suministró de forma continua y fue provista por medio de lámparas fluorescentes de 40 watts de luz blanca a una irradiancia de 100 $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$. Las botellas serológicas con los cultivos se agitaron manualmente dos veces al día.

5.4.3. Ensayo confirmatorio de la producción anaerobia de H₂ con la especie control: *Chlamydomonas reinhardtii*

Para este ensayo se utilizó cisteína como agente reductor en cultivos de *C. reinhardtii* y se cultivó con medio heterótrofo TAP (Harris, 2009). Los tratamientos experimentales fueron los mismos que los descritos en la sección previa (5.4.2). Los cultivos realizados para cada tratamiento se inocularon con *C. reinhardtii* a partir de cultivos en crecimiento exponencial, 9.03×10^6 cél/mL. Los cultivos fueron no axénicos y se incubaron en las mismas condiciones experimentales a las descritas en la sección 5.4.2.

5.4.4. Inducción anaerobia para la producción de H₂ en *Scenedesmus obliquus* empleando una especie de bacteria

Una vez que se logró la inducción anaerobia de producción de H₂ con un agente reductor (cisteína), fue de interés sustituir este agente reductor con una bacteria que cumpliera la misma función de consumir el O₂ fotosintético, además de coexistir con las microalgas. Lo anterior, ya que a escala comercial no es factible la utilización de cisteína para el establecimiento de las condiciones anaerobias que inducen la producción de H₂. De esta forma, el objetivo de esta sección fue obtener bacterias que pudieran cultivarse en conjunto con las microalgas, y que consumieran el O₂ tan pronto es liberado por las microalgas.

5.4.4.1. Especies de trabajo

En esta sección de la experimentación se utilizó como microalga productora de H₂ a *S. obliquus* (SCO). La bacteria consumidora de O₂ se obtuvo de cultivos no axénicos de *S. obliquus*. Para ello, se tomaron alícuotas de un cultivo durante la fase de crecimiento lento de *S. obliquus*. Con un asa bacteriológica previamente esterilizada, se sembró por estría cruzada hasta agotar la superficie de una caja de Petri que contenía agar bacteriológico (Bacto TM. Cat. 214010) a una concentración 15 g/L y medio heterótrofo TAP (Harris, 2009).

Las cajas de Petri fueron colocadas en una incubadora orbital (New Brunswick Scientific modelo Innova 42) durante 24 horas. Posterior a esto, se tomaron colonias aisladas y fueron resembradas en cajas de Petri con agar bacteriológico. Este procedimiento se repitió hasta obtener un monocultivo de bacterias de un solo color y con tamaño uniforme verificadas mediante observaciones con un microscopio y en cultivos en placa Petri con agar.

5.4.4.2. Preparación del inóculo de bacterias consumidoras de O₂

Se preparó suero fisiológico al 0.9 % p/v de NaCl y se utilizaron tubos de vidrio con tapón de rosca y un sello de goma de 10 mL con 9 mL de suero. Una vez que la solución se colocó en los tubos de cultivo se esterilizaron como ya se describió en la sección 5.1. Posterior a la esterilización se dejaron enfriar y se reservaron para su uso posterior.

Se vertieron 2 mL de suero fisiológico estéril sobre una caja Petri densamente sembrada con la especie de bacteria aislada. Después de vaciar el suero fisiológico se raspó suavemente la capa de bacterias con un asa de vidrio, evitando raspar la superficie del agar. Una vez que la mayor parte de bacterias fueron removidas de la superficie de la placa, se recolectó la mezcla de bacterias y se regresó al tubo de cultivo (Molina-Cárdenas, 2011). La mezcla se agitó y se dejó reposar por 30 minutos para permitir que los agregados de bacterias se disolvieran. Posterior a los 30 minutos, se tomó otro tubo de cultivo con suero fisiológico estéril y se le adicionaron gotas de la mezcla de bacterias preparada anteriormente hasta alcanzar una densidad óptica de 0.05 a 600 nm medida con un espectrofotómetro (Eppendorf BioSpectrometer), lo cual equivale a una concentración de 1×10^6 UFC/mL (Anguiano-Beltrán, 1996). Se tomó un mL de esta mezcla final con una concentración de 1×10^6 UFC/mL y se colocó en las botellas serológicas donde se llevó a cabo el cocultivo con la microalga.

5.4.4.3. Producción de H₂ de un cultivo mixto bacteria-microalga

Para la Etapa I de producción de biomasa, los cultivos se mantuvieron por triplicado en botellas serológicas de 125 mL con 120 mL de medio de medio TAP y fueron no axénicos,

se incubaron a 28 ± 1 °C y con luz continúa provista por lámparas fluorescentes de luz blanca fría ($100 \mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$) y los cultivos se agitaron manualmente dos veces al día.

Para la Etapa II de producción de H_2 , los cultivos mixtos entre microalgas y bacterias se realizaron por triplicado en botellas serológicas de 125 mL con 120 mL de medio, las cuales fueron inoculadas con la especie de bacteria como se describe en la sección 5.4.4.2. Para este ensayo se emplearon cultivos de microalgas en fase de crecimiento exponencial. Los cultivos mixtos se mantuvieron en botellas serológicas que fueron selladas herméticamente con anillos de metal en una atmósfera anaerobia de CO_2 (Plas LabsTM cámara anaerobia).

Los tratamientos empleados fueron los siguientes: *S. obliquus* en medio TAP (TAP) (tratamiento control negativo para la producción de H_2); *S. obliquus* en medio TAP sin azufre (TAP-S; tratamiento control positivo para la producción de H_2 (Melis *et al.*, 2000)); *S. obliquus* en medio TAP + 1 g/L de cisteína (cisteína); *S. obliquus* en medio TAP + la bacteria (M+bacteria) con una proporción de 37:1; y la especie de bacteria aislada en medio TAP (bacteria).

5.4.4.4. Métodos analíticos

Crecimiento

Se determinó el crecimiento de *S. obliquus* (cél/mL) cada 24 h durante 5 días, tiempo que tomó para que el crecimiento celular llegara a su fase estacionara. Para evaluar la concentración de células, se utilizó el conteo directo usando un microscopio (Carl Zeiss Axio Lab. A1) y una cámara de Neubauer (profundidad 0.10 mm, Hausser Scientific) como se describió en la sección 5.2.2. Los conteos de células de *S. obliquus* se realizaron cada 24 h.

Carbohidratos totales

Los carbohidratos totales se cuantificaron en las células de *S. obliquus* diariamente durante la producción de H_2 (fase anaerobia), como se describió en la sección 5.2.2.

Pigmentos

La clorofila "a" se midió diariamente por la técnica espectrofotométrica de Parsons *et al.* (1984) utilizando un espectrofotómetro (Eppendorf BioSpectrometer).

Producción de H₂

La composición del gas producido en el cultivo y que se obtuvo en el espacio gaseoso (H₂ y O₂) se analizó a diferentes tiempos para cada tratamiento. Para los ensayos: inducción anaerobia para la producción de H₂ con un agente reductor (5.4.2.) las determinaciones de los gases se realizaron cada hora durante las primeras 6 h de iniciado el ensayo y posteriormente cada 24 h durante 5 días; para los ensayo confirmatorio de la producción anaerobia de H₂ con la especie control: *Chlamydomonas reinhardtii* (5.4.3.); y el ensayo inducción anaerobia para la producción de H₂ en *Scenedesmus obliquus* empleando una especie de bacteria (5.4.4.) las determinaciones de los gases se realizaron cada 24 h durante 5 días.

Las mediciones del gas se realizaron usando un cromatógrafo de gases Perkin Elmer® Clarus® 580 (Perkin Elmer Inc., Estados Unidos) equipado con un detector de conductividad térmica (DCT) y una columna Elite-GC GS Molesieve (30 mx 0.53 mm). Las temperaturas del inyector, detector y columna fueron 150, 200, y 50 °C, respectivamente. Se utilizó argón como gas portador.

5.4.5. Análisis estadístico

Para el ensayo relacionado con los efectos de los agentes reductores sobre el crecimiento y la reducción del O₂ disuelto, se utilizó un diseño completamente aleatorizado. Los valores de crecimiento de *C. gloeopara* y *S. obliquus* se analizaron mediante un análisis de covarianza de dos vías (ANCOVA) con un nivel de confianza del 95%, tomando al tiempo como covariable. Al término del ensayo se cuantificó la concentración de O₂ disuelto y los valores fueron comparados mediante un análisis de varianza de una vía (ANOVA) con un nivel de confianza de 95%.

Para el ensayo sobre la inducción anaerobia para la producción de H₂ mediante un agente reductor se cuantificó la concentración de H₂, la concentración de O₂, el crecimiento y la concentración de carbohidratos totales.

Para el ensayo confirmatorio de la producción anaerobia de H₂ con una especie de microalga utilizada como control, *C. reinhardtii*, se determinó la concentración O₂ y la de H₂. Los resultados se analizaron mediante un análisis de covarianza de una vía (ANCOVA) con un nivel de confianza del 95% usando el tiempo como la covariable.

Para el ensayo sobre la inducción anaerobia de la producción de H₂ en *Scenedesmus obliquus* empleando una especie de bacteria se evaluó el crecimiento, la concentración de carbohidratos totales y la concentración de O₂ mediante un ANCOVA.

En todos los análisis realizados, cuando se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos, se utilizó el análisis *a posteriori* de Tukey (Zar, 1984). Para todos los datos analizados se verificaron los supuestos de normalidad y de homogeneidad de varianzas. Todos los datos fueron analizados con el programa estadístico STATISTICA® versión 7.0 (Stat Soft Inc. EE.UU., 2004). Las gráficas fueron realizadas mediante el programa Excel 2013 y Sigma Plot 10.

6. RESULTADOS

6.1. Bioprospección de especies con potencial para la producción de H₂ en cultivos con medio autótrofo y heterótrofo

La figura 5 muestra las curvas de crecimiento en condiciones oxigénicas (Etapa I) y durante la producción de H₂ en condiciones anaerobias (Etapa II) de cinco especies de microalgas. Los cultivos fueron mantenidos en dos distintos medios de cultivo para establecer diferentes metabolismos en células de microalgas: medio autótrofo (medio "f") y medio heterótrofo (TAP).

El crecimiento en la Etapa I de las cinco especies de microalgas evaluadas fue en promedio 75% mayor bajo el metabolismo heterótrofo que bajo el metabolismo autótrofo ($p < 0.05$). En estas condiciones, las especies con mayor densidad celular fueron en orden descendente: *S. obliquus* > *C. reinhardtii* > *C. gloeopara* > *C. mexicana* ($p < 0.05$). *Chlorella vulgaris* presentó un crecimiento diferente al tener 45% mayor densidad celular bajo el metabolismo autótrofo que bajo el heterótrofo ($p > 0.05$). *C. mexicana* mostró el menor crecimiento con ambos tipos de medio de cultivo, no obstante, el mayor crecimiento fue con el medio heterótrofo ($p < 0.05$) (Tabla 3).

La mayor cantidad de peso seco total, peso seco orgánico y peso de las cenizas en las cinco especies de microalgas durante la Etapa I se presentó en los tratamientos con medio heterótrofo (Tabla 3).

Durante la fase de crecimiento exponencial (Etapa I), las células de *S. obliquus* cultivadas bajo ambos tipos de metabolismo se encontraban como células libres y en constante reproducción ya que se observaron células individuales, sin formar cenobios o colonias de células, lo que indicó una continua reproducción celular. Hacia el final de la Etapa I, las células de *S. obliquus* comenzaron a formar grupos de células conocidas como cenobios y su tasa de crecimiento disminuyó significativamente. Para el conteo celular de *S. obliquus* siempre se contabilizaron como células individuales a pesar de formar grupos. En la Etapa II, el incremento de la densidad celular en el medio heterótrofo y medio autótrofo fue del 119% y 139%, respectivamente (Tabla 3).

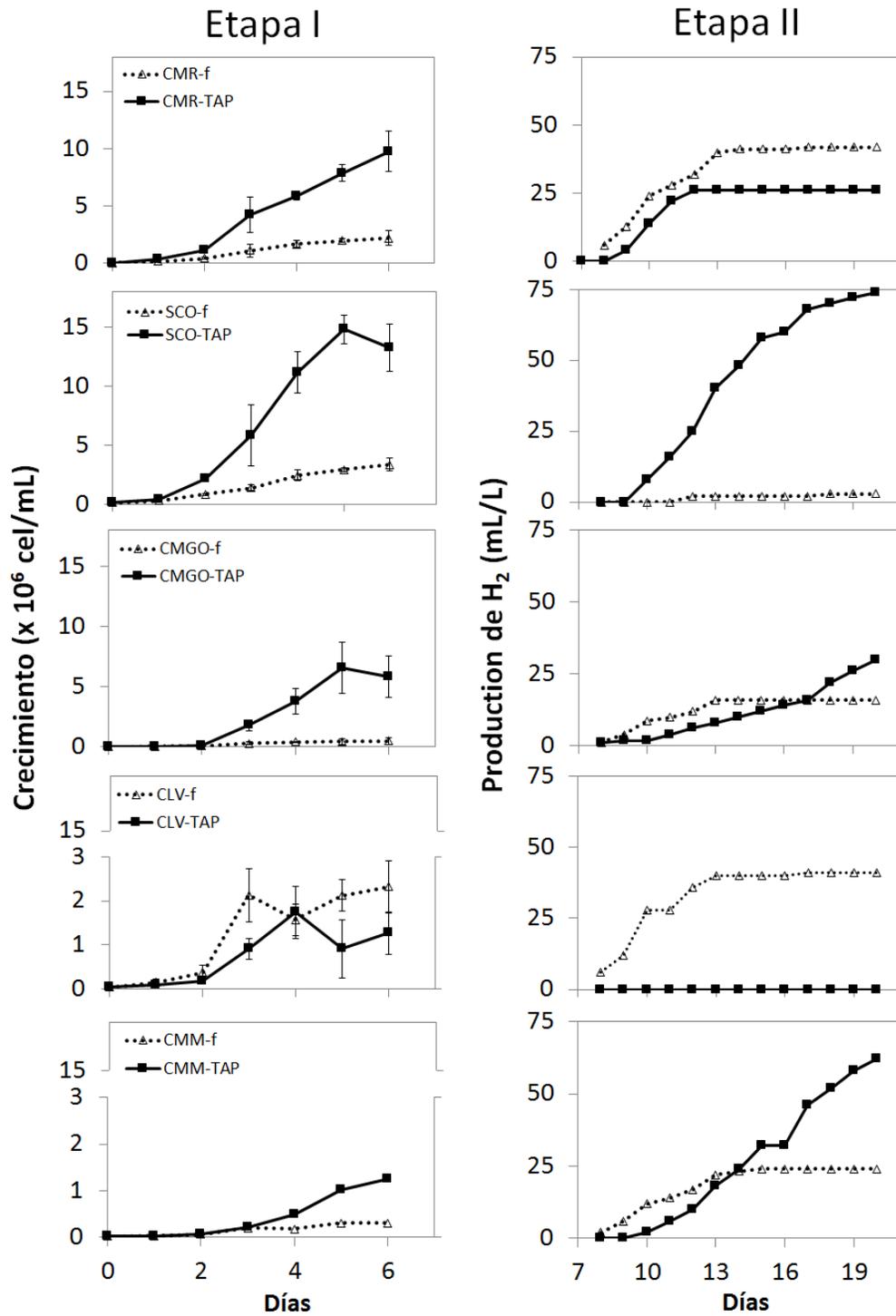


Figura 5. Curvas de crecimiento de las microalgas *Chlamydomonas reinhardtii* (CMR), *Scenedesmus obliquus* (SCO) *Chlamydomonas gloeopara* (CMGO), *Chlorella vulgaris* (CLV) y *Chlamydomonas mexicana* (CMM), durante la producción de biomasa (Etapa I) y la producción de H₂ mediante de la privación de azufre (Etapa II) en cultivos mantenidos en condiciones autotróficas ("f" $\bullet\bullet\Delta\bullet\bullet$) y heterotróficas (TAP $\blacksquare\blacksquare$).

Tabla 2. Tasa de crecimiento, concentración de carbohidratos totales, clorofila "a", "b", carotenoides, peso, producción de H₂, productividad, producción específica de H₂ y tamaño celular en cultivos de *Chlamydomonas reinhardtii* (CMR), *Scenedesmus obliquus* (SCO) *Chlamydomonas gloeopara* (CMGO), *Chlorella vulgaris* (CLV) y *Chlamydomonas mexicana* (CMM), mantenidos en medio de cultivo autótrofo (f) y heterótrofo (TAP) durante la fase de producción de biomasa (Etapa I) y en la fase de la inducción a la producción de H₂ (Etapa II).

ETAPA I	CMR		SCO		CMGO		CLV		CMM	
	"f"	TAP	"f"	TAP	"f"	TAP	"f"	TAP	"f"	TAP
Parámetros										
Tasa de crecimiento (μ : divisiones /día)	0.9	1.4	0.9	1.4	1.2	1.8	1.7	1.1	0.8	1.0
Carbohidratos día 6 ($\mu\text{g}/10^6$ cél)	6.34	1.59	2.36	0.8	16.21	1.29	2.82	11.25	21.2	14.87
Clorofila "a" día 6 ($\mu\text{g}/\text{L}$)	212	3467	38	1025	121	1638	13	924	92	964
Clorofila "b" día 6 ($\mu\text{g}/\text{L}$)	40	1301	0	180	23	489	0	158	17	286
Carotenoides día 6 ($\mu\text{g}/\text{L}$)	154	1453	26	564	64	646	12	369	49	413
Peso seco orgánico día 3 ($\mu\text{g}/10^6$ cél)	125	592	139	690	397	416	90	336	87	293
Peso seco orgánico día 6 ($\mu\text{g}/10^6$ cél)	161	708	165	787	182	488	136	450	114	419
Peso seco día 3 ($\mu\text{g}/10^6$ cél)	266	721	292	852	208	541	208	447	219	439
Peso seco día 6 ($\mu\text{g}/10^6$ cél)	326	912	363	997	338	632	255	595	230	567

ETAPA II	CMR		SCO		CMGO		CLV		CMM	
	"f"	TAP	"f"	TAP	"f"	TAP	"f"	TAP	"f"	TAP
Parámetros										
Tasa de crecimiento (μ : divisiones /día)	0.04	0.13	0.10	0.09	-0.02	0.13	0.03	-0.09	0.06	0.05
Carbohidratos día 20 ($\mu\text{g}/10^6$ cél)	1.0	0.3	0.4	0.4	12.9	0.8	1.6	0.5	8.0	6.9
Disminución carbohidratos entre Etapa I y II (%)	83.7	81.6	80.0	43.9	20.4	33.9	42.0	95.1	62.1	53.5
Clorofila "a" día 20 ($\mu\text{g}/\text{L}$)	346	5283	41	1645	177	5310	16	87	271	4845
Clorofila "b" día 20 ($\mu\text{g}/\text{L}$)	122	4696	2	409	70	4241	14	12	118	2570
Carotenoides al día 20 ($\mu\text{g}/\text{L}$)	126	3018	27	795	169	3193	0	253	108	2185
Peso seco orgánico (PSO) día 20 ($\mu\text{g}/10^6$ cél)	20	17	16	18	86	25	31	193	105	255
Peso seco (PS) día 20 ($\mu\text{g}/10^6$ cél)	38	23	38	23	208	35	68	231	244	345
Producción de H ₂ (mL/L)	42	26	3	74	16	30	41	0	24	62
Productividad de H ₂ (mL/L/h)	0.26	0.31	0.03	0.29	0.11	0.09	0.31	0.00	0.15	0.25
Rendimiento (mL H ₂ /g)	115.8	11.6	3.1	36.4	64.7	14.5	66.2	0.0	64.3	44.5
Tamaño celular (diámetro: μm)	7.4	8.0	7.9	7.9	7.8	8.2	7.8	7.3	8.2	8.8

Las células de *C. reinhardtii* cultivadas con el metabolismo heterótrofo mostraron una mayor tasa de crecimiento. Además, se observó mayor movimiento de los flagelos con el metabolismo heterótrofo, el cual disminuyó hacia el final de la Etapa I. Para la Etapa II, el incremento de la densidad celular con medio heterótrofo y medio autótrofo fue del 225% y 43%, respectivamente.

Para *C. gloeopara* en la Etapa II, el incremento en densidad celular con medio heterótrofo fue del 234% y una disminución del 19% con medio autótrofo.

C. mexicana presentó células más grandes en la Etapa I, en ambas condiciones de cultivo, la fase de crecimiento exponencial fue más corta y la tasa de crecimiento fue más baja (Tabla 3). Después que las células de *C. mexicana* fueron transferidas al medio de cultivo libre de azufre (Etapa II), se observó un aumento significativo en crecimiento ($p < 0.05$) con medio heterótrofo y medio autótrofo, 57% y 66%, respectivamente

Para la Etapa II, la densidad celular de *Chlorella vulgaris* con medio autótrofo aumentó un 32%, mientras que con medio heterótrofo se observó una disminución del 55% (Tabla 3). Además, las células cambiaron de color verde a color rojo, perdieron sus flagelos y detuvieron su crecimiento. Para este caso, también se observó un aumento significativo en la cantidad de bacterias en el medio heterótrofo al hacer observaciones de las muestras con un microscopio compuesto. Todas estas características descritas para las células para el cultivo de *Chlorella vulgaris* con medio heterótrofo, no se presentaron con el metabolismo autótrofo.

Después de 3 días de incubación en condiciones anaerobias (Etapa II), se registró acumulación de biogás en *C. reinhardtii*, *C. gloeopara* y *C. mexicana* en ambas condiciones de cultivo, autotróficas y heterotróficas (Figura 5). El metabolismo heterótrofo promovió mayor acumulación de biogás en *S. obliquus*, *C. gloeopara* y *C. mexicana*. En *Chlorella vulgaris* bajo el metabolismo heterótrofo y en *S. obliquus* bajo el metabolismo autótrofo la acumulación de biogás fue prácticamente igual a cero.

La presencia de H₂ en el gas acumulado fue confirmada para las cinco especies, primero de forma cualitativa mediante la reacción de hidrogenación catalítica entre el azul de Coomassie y el H₂ en presencia del catalizador de Wilkinson (Tris (trifenilfosfina) cloruro de rodio) (Figura 6). La reacción del H₂ con el catalizador de Wilkinson causó un cambio

de color del azul de Coomassie a un tono azul translúcido debido al mecanismo de ruptura de los dobles enlaces de los cromóforos y auxocromos del colorante (Katsuda *et al.*, 2006). La reacción con aire y/o O₂ da un resultado negativo de esta reacción. Después, la presencia de H₂ en el gas acumulado por las especies de microalgas evaluadas fue corroborada mediante cromatografía de gases.

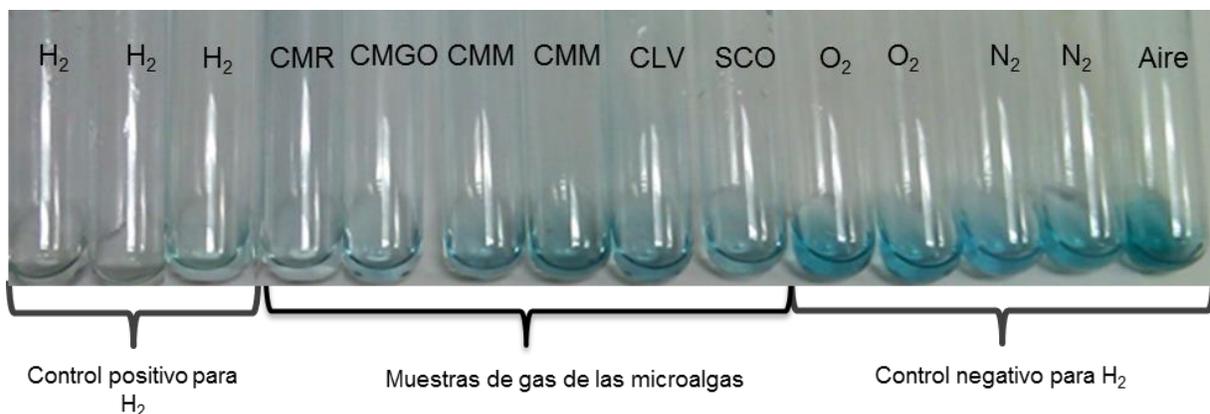


Figura 6. Cambios de color inducidos por hidrogenación catalítica del reactivo de Wilkinson con el colorante azul brillante de Coomassie en solución acuosa mezclado con las muestras de gas de Hidrógeno (H₂), *Chlamydomonas reinhardtii* (CMR), *Chlamydomonas gloeopara* (CMGO), *Chlamydomonas mexicana* (CMM), *Chlorella vulgaris* (CLV), *Scenedesmus obliquus* (SCO), Oxígeno (O₂) y Nitrógeno (N₂).

En general, la producción de H₂ en las distintas especies de microalgas fue mayor en condiciones heterotróficas y sólo *Chlorella vulgaris* presentó un resultado diferente al tener valores menores (Tabla 3).

La mayor diferencia de producción de H₂ debido al tipo medio de cultivo se presentó en *S. obliquus*, donde la producción total acumulada bajo un metabolismo heterótrofo fue de 74 mL/L, siendo 25 veces mayor en comparación al metabolismo autótrofo. Para *C. reinhardtii*, se encontró un patrón similar de producción de H₂ en ambos tipos de metabolismo, con una fase exponencial de 3 días que terminó el día 6. Con el medio autótrofo la producción de H₂ para *C. reinhardtii* fue 1.6 veces más que con el medio heterótrofo.

C. gloeopara con el medio heterótrofo mostró producción constante de H₂ a lo largo de 12 días de la Etapa II, mientras con el medio autótrofo la producción de H₂ se detuvo el día 7. En cambio, *Chlorella vulgaris* y *C. reinhardtii* acumularon mayor cantidad de H₂ con el medio autótrofo. Sin embargo, en general, en este estudio la adición de una fuente de carbono orgánico, tal como el acetato para el medio heterótrofo produjo mayores cantidades de H₂ (Figura 6).

Los resultados de este estudio indican que solo en *C. reinhardtii* con medio “f” se presentó una relación positiva entre la concentración de carbohidratos totales de la Etapa I y la producción de H₂ en la Etapa II (Tabla 2).

Las especies *S. obliquus*, *C. gloeopara* y *C. mexicana* produjeron mayor cantidad de H₂ con menor cantidad de carbohidratos acumulados al final de la Etapa I con medio heterótrofo. El mejor rendimiento de producción de H₂ respecto al peso seco orgánico (H₂ mL/L/PSO) en la Etapa II se obtuvo con *S. obliquus* (4.11 H₂ mL/L / (μg/10⁶ cél) y la disminución de carbohidratos totales entre la Etapa I y la Etapa II fue del 44%, seguido de lo obtenido con *C. gloeopara* (1.77 H₂ mL/L / μg/10⁶ cél) (Tabla 2).

En la Etapa I con el medio de cultivo heterótrofo se promovió mayor concentración de clorofila “a”, clorofila “b” y carotenoides en las cinco especies de microalgas (Tabla 2). La mayor concentración de los tres pigmentos evaluados se presentó en *C. reinhardtii*, seguido de *C. gloeopara* y *S. obliquus* cultivadas en medio heterótrofo. La concentración de los pigmentos evaluados (μg/L) se incrementó al final de la Etapa II en las 5 especies de microalgas con ambos medios de cultivo, excepto en *Chlorella vulgaris* que mostró la cantidad más alta con el medio heterótrofo el día 6 de la Etapa I (Tabla 2).

El pH inicial de los cultivos de las especies *C. gloeopara*, *C. mexicana*, *C. reinhardtii*, *Chlorella vulgaris* y *S. obliquus* en la Etapa I fue 7.25 para el medio heterótrofo y 8.2 para el medio autótrofo. A lo largo del ensayo, se presentó un incremento paulatino en los valores de pH de ambos medios de cultivo, siendo mayor en los cultivos con medio “f” ($p < 0.05$), donde se alcanzaron valores de pH 10. Por otro lado, en el medio heterótrofo el pH se incrementó hasta valores superiores a 8.5. Para la Etapa II, los valores iniciales de pH fueron 7.3 y 8.1 para los cultivos autótrofos y heterótrofos, respectivamente. Estos

valores se incrementaron paulatinamente hacia el final de la Etapa II, hasta llegar a valores de pH de 9.1 y 8.4 para los cultivos autótrofos y heterótrofos, respectivamente. La Tabla 3 muestra la eficiencia fotosintética (α), la fotosíntesis máxima ($P_{\text{máx}}$) y el índice de saturación lumínica (I_k) y el valor de correlación (R^2) de las cinco especies de microalgas cultivadas bajo dos diferentes metabolismos, autótrofo y heterótrofo en la Etapa I y Etapa II.

El análisis estadístico mostró diferencias significativas en la eficiencia fotosintética (α) por efecto del medio de cultivo ($p < 0.05$). La mayor eficiencia fotosintética (α) en la Etapa I, se presentó en *Chlorella vulgaris*, *C. gloeopara*, *S. obliquus* y *C. reinhardtii* en medio autótrofo. Mientras en el medio heterótrofo los mayores valores de eficiencia fotosintética se obtuvieron para *S. obliquus* (0.03 fmol O₂/cél/h), para las demás especies se obtuvieron valores de eficiencia fotosintética menores.

Los valores de la fotosíntesis máxima ($P_{\text{máx}}$) en la Etapa I, fueron afectados por el tipo de medio de cultivo ($p < 0.05$). Los mayores valores se presentaron en medio autótrofo. *Chlorella vulgaris* cultivada en medio autótrofo presentó el valor máximo de la tasa fotosintética con 3131 fmol O₂/cél/h (Tabla 3).

Los valores del índice de saturación lumínica presentaron diferencias significativas debido al medio de cultivo ($p < 0.05$). El valor máximo del índice de saturación lumínica se presentó en *C. reinhardtii* (9195 $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$) en medio heterótrofo seguido por lo obtenido en *C. gloeopara* (9031 $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$) en medio autótrofo (Tabla 3).

Para la Etapa II, los valores de la eficiencia fotosintética (α) fueron significativamente menores ($p < 0.05$) para todas las especies en ambos tipos de medios de cultivo, respecto a lo obtenido en la Etapa I. Para *C. reinhardtii* en ambos tipos de medios la eficiencia fotosintética fue igual a 0 y no se presentó producción de O₂ ($p < 0.05$).

Los valores de la fotosíntesis máxima ($P_{\text{máx}}$) en la Etapa II, fueron afectados por el tipo de medio de cultivo ($p < 0.05$) y los mayores valores se presentaron en el medio autótrofo para *Chlorella vulgaris* y *S. obliquus*. Para *C. reinhardtii* no se determinó la $P_{\text{máx}}$ en ambos medios de cultivo. Para *C. gloeopara* y *Chlorella vulgaris* en medio heterótrofo no se determinó la $P_{\text{máx}}$.

Existieron diferencias en el índice de saturación lumínico en la Etapa II y el valor máximo se presentó en *C. mexicana* (22055 $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$), seguido por lo obtenido en *Chlorella vulgaris* ambos en medio autótrofo ($p < 0.05$) (Tabla 4).

Tabla 3. Valores promedio y desviación estándar de la tasa fotosintética máxima ($P_{\text{máx}}$), la eficiencia fotosintética (α) y el índice de saturación lumínica (I_k) de *Chlamydomonas reinhardtii* (CMR), *Scenedesmus obliquus* (SCO), *Chlamydomonas gloeopara* (CMGO), *Chlorella vulgaris* (CLV) y *Chlamydomonas mexicana* (CMM), mantenidas en medio de cultivo autótrofo ("f", Guillard y Ryther, 1962) y heterótrofo (TAP, Harris, 2009) durante la fase de producción de biomasa (Etapa I) y en la fase de la inducción a la producción de H_2 (Etapa II). N.D.: No determinado. N.E.: No evaluado.

Etapa I: inducción a la producción de H_2 (día 6)				
	α	$P_{\text{máx}}$	I_k	R^2
	($\text{fmol O}_2/\text{cél/h}$)/ ($\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$)	($\text{fmol O}_2 \text{cél/h}$)	($\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$)	
CMR-f	0.05 \pm 0.02	217 \pm 49	4426 \pm 786	0.97
CMR-TAP	0.01 \pm 0.00	27 \pm 32	9195 \pm 124	0.78
SCO-f	0.40 \pm 0.21	2118 \pm 293	7696 \pm 2901	0.88
SCO-TAP	0.03 \pm 0.02	124 \pm 88	2866 \pm 1031	0.90
CMGO-f	0.07 \pm 0.04	534 \pm 386	9031 \pm 4326	0.87
CMGO-TAP	0.02 \pm 0.02	48 \pm 34	2366 \pm 1851	0.83
CLV-f	0.75 \pm 0.35	3131 \pm 1113	5703 \pm 1393	0.66
CLV-TAP	0.02 \pm 0.01	91 \pm 60	5552 \pm 253	0.66
CMM-f	0.33 \pm 0.41	471 \pm 89	4986 \pm 3945	0.92
CMM-TAP	0.02 \pm 0.01	108 \pm 51	6424 \pm 3916	0.55
Etapa II: inducción a la producción de H_2 (día 20)				
	α	$P_{\text{máx}}$	I_k	R^2
	($\text{fmol O}_2/\text{cél/h}$)/ ($\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$)	($\text{fmol O}_2 \text{cél/h}$)	($\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$)	
CMR-f	N.D.	N.D.	N.D.	N.E.
CMR-TAP	N.D.	N.D.	N.D.	N.E.
SCO-f	0.60	4506	9176	0.91
SCO-TAP	0.02	164	12689	0.96
CMGO-f	0.40	928	1571	0.51
CMGO-TAP	N.D.	N.D.	N.D.	N.E.
CLV-f	0.50	8900	17400	0.11
CLV-TAP	N.D.	N.D.	N.D.	N.E.
CMM-f	0.03	572	22055	0.80
CMM-TAP	0.01	32	8665	0.94

6.2. Efecto de las condiciones ambientales sobre el crecimiento microalgal

6.2.1. Efecto de la irradiancia y temperatura sobre el crecimiento y producción de H₂

La figura 7 muestra la curva de crecimiento de *C. gloeopara* cultivada a tres diferentes temperaturas y tres irradiancias en la etapa de producción de biomasa (Etapa I), así como la acumulación de H₂ durante la privación de azufre en la Etapa II. Sólo el factor de la irradiancia tuvo un efecto significativo sobre el crecimiento de *C. gloeopara* ($p < 0.05$), contrario a la temperatura ($p > 0.05$) o la interacción de los factores ($p > 0.05$). La mayor irradiancia (400 $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$) afectó negativamente el crecimiento microalgal de *C. gloeopara* y ocasionó que fuera 10 veces menor a lo obtenido con 100 $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$ ($p < 0.05$). La mayor densidad celular de *C. gloeopara* se presentó en los cultivos mantenidos en 25 °C con 100 $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$. Después de 2 días de incubación para la producción de H₂ de *C. gloeopara* (Etapa II), se comenzó a registrar la producción de H₂ en los diferentes tratamientos. Sólo el factor de la irradiancia tuvo un efecto significativo sobre la producción de H₂ ($p < 0.05$) pero no la temperatura ($p > 0.05$) ni la interacción de ambas variables ($p > 0.05$). La mayor producción de H₂ se obtuvo en el tratamiento con 25 °C con irradiancia de 100 $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$ (Figura 7).

La figura 8 muestra la curva de crecimiento de *S. obliquus* durante la producción de biomasa (Etapa I), así como la producción de H₂ durante la privación de azufre en el medio (Etapa II). Sólo el factor de la irradiancia tuvo un efecto significativo sobre el crecimiento de *S. obliquus* ($p < 0.05$), contrario a la temperatura ($p > 0.05$) o la interacción de los factores ($p > 0.05$). La mayor densidad celular se presentó en los cultivos mantenidos a 25 °C y 100 $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$ y también para 20 °C y 100 $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$, los cuales fueron significativamente superiores al resto de los tratamientos. Durante la Etapa II sólo el factor de la irradiancia tuvo un efecto significativo sobre la producción de H₂ para *S. obliquus* ($p < 0.05$), contrario al efecto de la temperatura ($p > 0.05$) o la interacción de los factores ($p > 0.05$). La mayor producción de H₂ se presentó en el tratamiento con 25 °C y 100 $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$ con 54 mL de H₂/L, lo cual fue significativamente superior al resto de los tratamientos ($p < 0.05$) (Figura 8).

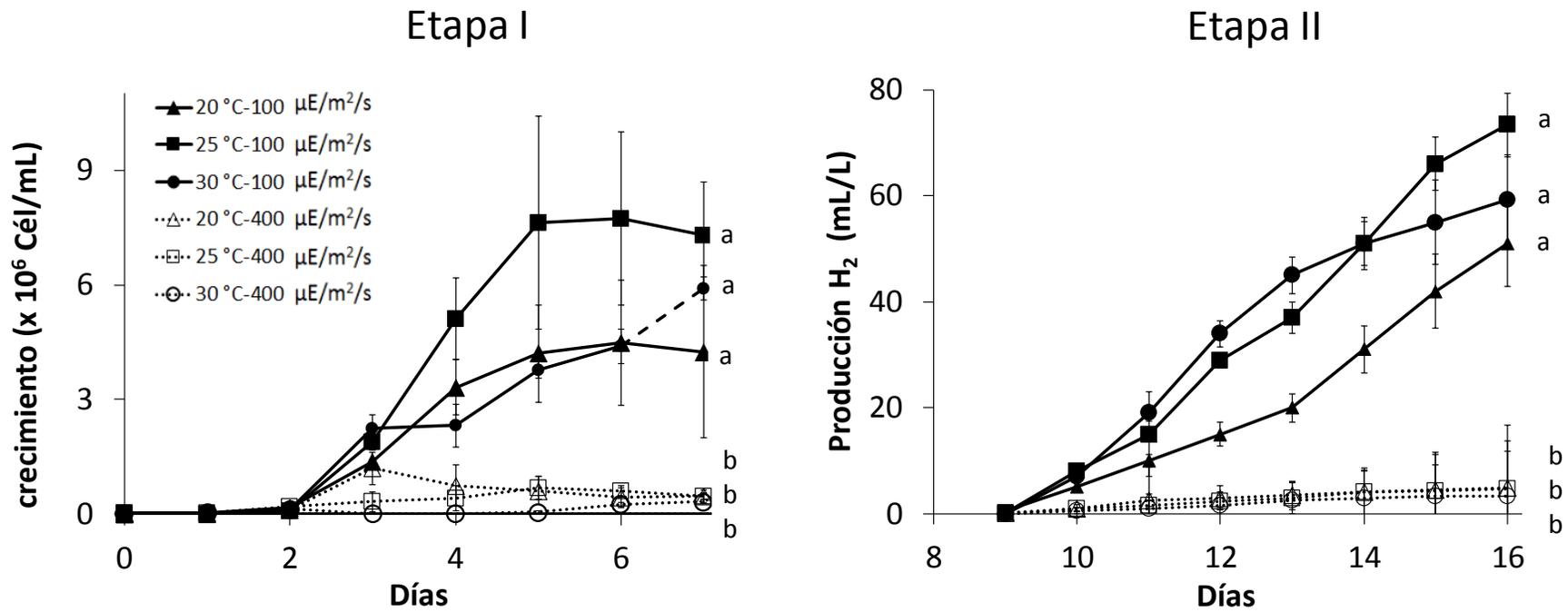


Figura 7. Curvas de crecimiento durante la producción de biomasa (Etapa I) y la producción de H₂ mediante de la privación de azufre (Etapa II) de *Chlamydomonas gloeopara* cultivada a tres temperaturas (20 °C, 25 °C y 30 °C) y dos irradiancias (100 y 400 μE/m²/s). Las letras distintas indican diferencias significativas (a > b) obtenidas por una prueba de ANCOVA de dos vías con un α = 0.05.

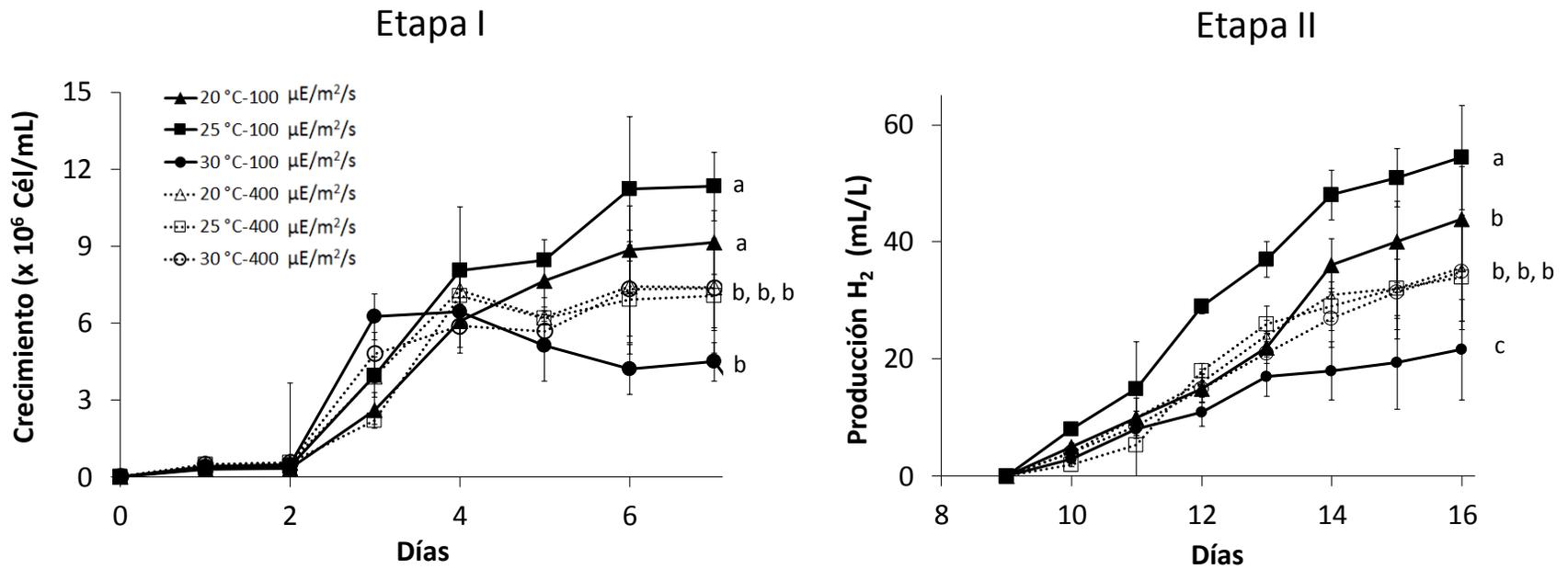


Figura 8. Curvas de crecimiento durante la producción de biomasa (Etapa I) y la producción de H₂ mediante de la privación de azufre (Etapa II) de *Scenedesmus obliquus* cultivadas a tres temperaturas (20 °C, 25 °C y 30 °C) y dos irradiancias (100 y 400 μE/m²/s). Las letras distintas indican diferencias significativas (a > b > c) obtenidas por una prueba de ANCOVA de dos vías con un α = 0.05.

La concentración de carbohidratos totales en *C. gloeopara* se modificó por efecto de la irradiancia ($p < 0.05$), pero no por efecto de la temperatura ($p > 0.05$) o por efecto de la interacción de los factores ($p > 0.05$). La mayor concentración de carbohidratos se presentó en los tratamientos con 400 $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$ y fueron aproximadamente 6 veces mayor a la cantidad de carbohidratos presentes en los tratamientos con 100 $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$ (Figura 9). La mayor concentración de carbohidratos se presentó en el tratamiento con 20 °C y 400 $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$ (13.9 $\mu\text{g}/10^6$ cél).

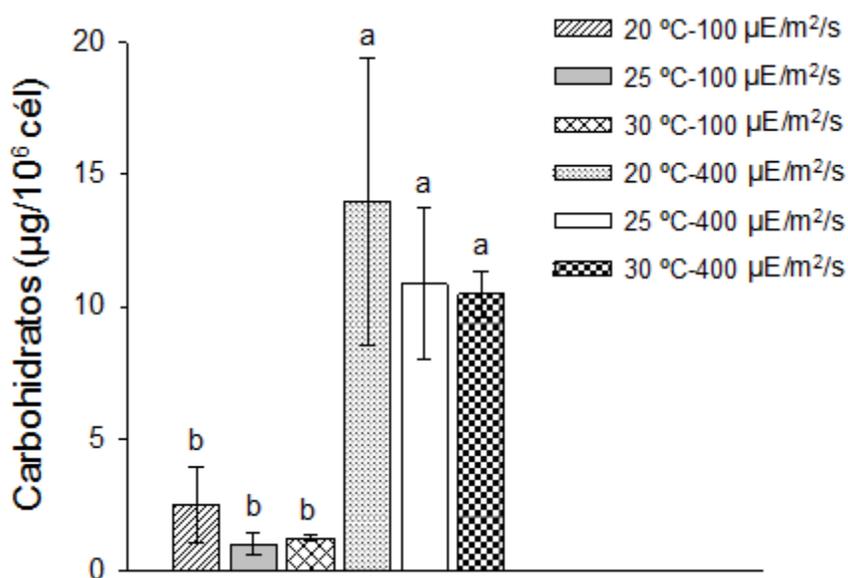


Figura 9. Concentración de carbohidratos totales ($\mu\text{g}/10^6$ cél) el día 7 del cultivo durante la etapa de producción de biomasa (Etapa I) de *Chlamydomonas gloeopara* cultivada a tres temperaturas (20 °C, 25 °C y 30 °C) y dos irradiancias (100 y 400 $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$). Las letras distintas indican diferencias significativas ($a > b$) obtenidas por una prueba de ANOVA de dos vías con un $\alpha = 0.05$.

Los factores de irradiancia y temperatura no tuvieron efecto sobre la concentración de carbohidratos totales en *S. obliquus* ($p > 0.05$) (Figura 10). La mayor concentración de carbohidratos se presentó en el tratamiento a 30 °C y 400 $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$ (2.02 $\mu\text{g}/10^6$ cél).

El factor de la irradiancia tuvo un efecto significativo sobre la concentración de clorofila "a" de *C. gloeopara* ($p < 0.05$), contrario a la respuesta por efecto de la temperatura ($p > 0.05$) o la interacción de los factores ($p > 0.05$). La mayor concentración de clorofila "a"

(Figura 11) en *C. gloeopara* se presentó en el tratamiento con 20 °C y 400 $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$ con 186 $\text{pg}/10^6$ cél/mL. Por otro lado, no se encontraron diferencias significativas en la concentración de carotenoides entre los tratamientos ($p > 0.05$) por efecto de los factores de irradiancia y temperatura. Se observó una tendencia a incrementar la concentración de carotenoides en 400 $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$ a medida que se aumentó la temperatura (Figura 11).

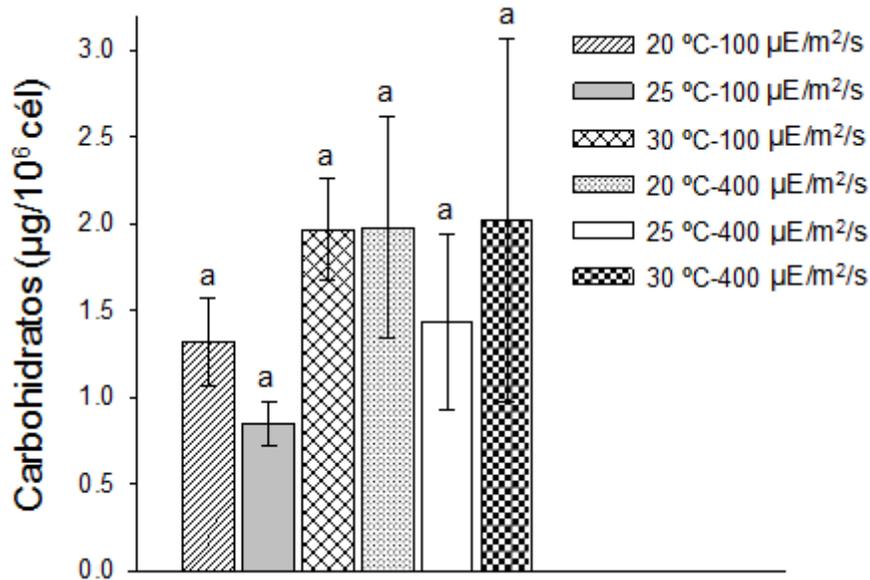


Figura 10. Concentración de carbohidratos totales ($\mu\text{g}/10^6$ cél) el día 7 del cultivo durante la etapa de producción de biomasa (Etapa I) de *Scenedesmus obliquus* cultivadas a tres temperaturas (20 °C, 25 °C y 30 °C) y dos irradiancias (100 y 400 $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$). Las letras distintas indican diferencias significativas ($a > b$) obtenidas mediante una prueba de ANOVA de dos vías con un $\alpha = 0.05$.

El factor de la irradiancia tuvo un efecto significativo sobre la concentración de clorofila “a” de *S. obliquus* ($p < 0.05$), contrario a lo obtenido para la temperatura ($p > 0.05$) o la interacción de los factores ($p > 0.05$). La mayor concentración de clorofila “a” en *S. obliquus* se presentó en 20 °C y 100 $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$ con 26.2 $\text{pg}/10^6$ cél/mL (Figura 12).

El factor de la irradiancia tuvo un efecto significativo sobre la concentración de carotenoides de *S. obliquus* ($p < 0.05$), contrario a la respuesta por efecto de la temperatura ($p > 0.05$) o la interacción de los factores ($p > 0.05$). En los tratamientos con

400 $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$ se observó una tendencia a disminuir la concentración de carotenoides a medida que se incrementó a temperatura (Figura 12).

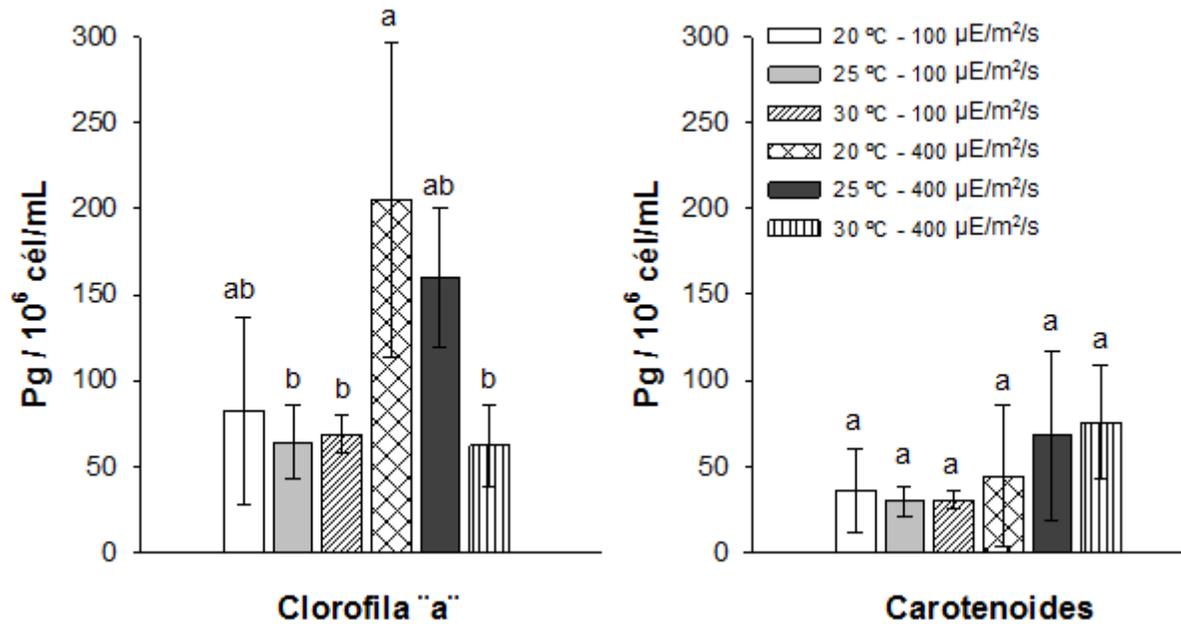


Figura 11. Concentración de clorofila "a" y carotenoides (pg/10⁶ células/mL) de *Chlamydomonas gloeopara* durante la etapa de producción de biomasa (Etapa I) cultivada a tres temperaturas (20 °C, 25 °C y 30 °C) y dos irradiancias (100 y 400 $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$). Las letras distintas indican diferencias significativas ($a > b$) obtenidas mediante una prueba de ANOVA de dos vías con un $\alpha = 0.05$.

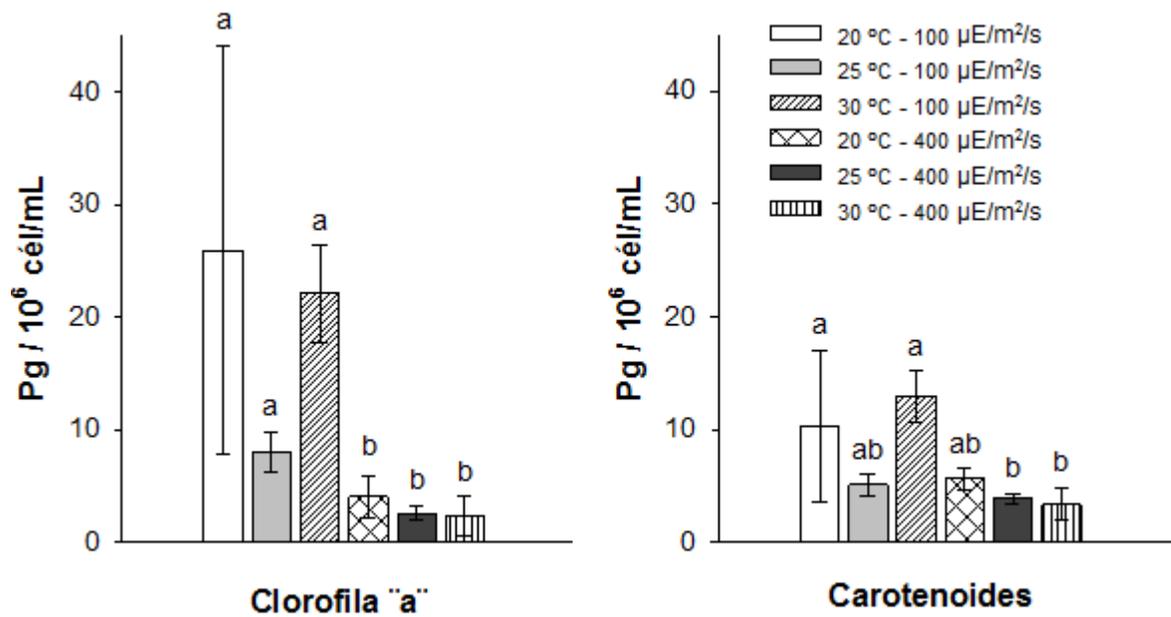


Figura 12. Concentración de clorofila "a" y carotenoides (pg/10⁶ células/mL) de *Scenedesmus obliquus* durante la etapa de producción de biomasa (Etapa I) cultivadas a tres temperaturas (20 °C, 25 °C y 30 °C) y dos irradiancias (100 y 400 μE/m²/s). Las letras distintas indican diferencias significativas (a > b) obtenidas mediante una prueba de ANOVA de dos vías con un $\alpha = 0.05$.

6.2.2. Efecto del aporte de carbono sobre la producción de H₂

Se evaluó el efecto de diferentes aportes de carbono orgánico sobre el crecimiento y producción de H₂ en cultivos de *C. gloeopara* y *S. obliquus*. El crecimiento de *C. gloeopara* fue afectado por los aportes de carbono ($p < 0.05$). El mayor crecimiento fue obtenido con el tratamiento TAP / AA 5% (9.7×10^6 cél/mL), seguido del tratamiento TAP (8.1×10^6 cél/mL), en estos dos tratamientos el crecimiento fue constante hasta el final de la Etapa I (Figura 13). El tratamiento sacarosa presentó una densidad máxima de 0.08×10^6 cél/mL, siendo hasta 110 veces menor que lo encontrado con el tratamiento TAP / AA 5% y significativamente menor al tratamiento TAP ($p < 0.05$).

La producción de H₂ en la Etapa II con *C. gloeopara* sólo se logró con el tratamiento TAP. La producción de H₂ se comenzó a registrar a partir del primer día después de la incubación. La fase exponencial de producción de H₂ se presentó en el tratamiento TAP a partir del día 6 y se mantuvo constante hasta el final de la Etapa II. La mayor producción de H₂ fue en el tratamiento TAP con 49 mL/L (Figura 13).

La figura 14 muestra la curva de crecimiento y producción de H₂ de *S. obliquus* con diferentes aportes de carbono. De acuerdo a la prueba de ancova el crecimiento de *S. obliquus* fue afectado por los diferentes aportes de carbono empleados en el medio de cultivo ($p < 0.05$). En *S. obliquus* la mayor densidad celular se presentó en medio TAP y correspondió a 11.8×10^6 cél/mL, seguido de TAP / AA 5% con 11.4×10^6 cél/mL, los cuales fueron superiores al tratamiento sacarosa ($p < 0.05$). El tratamiento con sacarosa presentó una fase de acondicionamiento de tres días y después un crecimiento exponencial hacia el final del ensayo llegando a una densidad de 6.7×10^6 cél/mL.

La producción de H₂ en la Etapa II con *S. obliquus* sólo se logró con el TAP. La producción se comenzó a registrar el día 3 después de la incubación y se mantuvo constante hasta el final de la Etapa II. La mayor producción de H₂ fue de 46 mL/L (Figura 14).

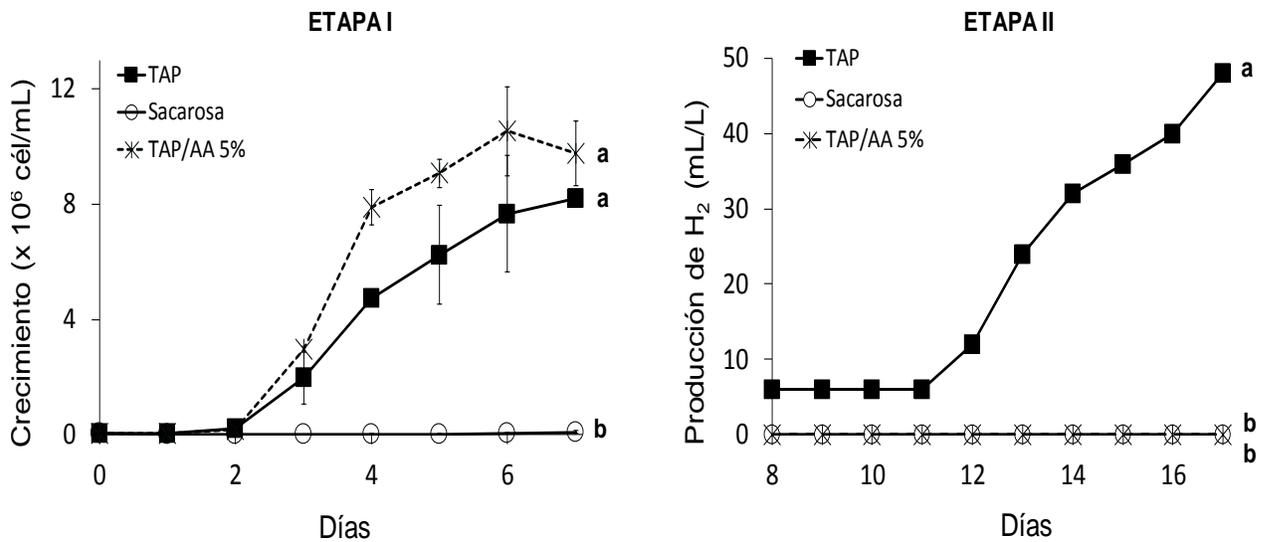


Figura 13. Curvas de crecimiento durante la producción de biomasa (Etapa I) y la producción de H₂ mediante la privación de azufre (Etapa II) de *Chlamydomonas gloeopara* cultivada con diferentes aportes de carbono: Control (medio TAP) (Harris, 2009) (17.4 mM de ácido acético); Medio TAP + sustitución de ácido acético comercial al 5% (17.4 mM de ácido acético) (TAP / AA 5%); Medio TAP + sustitución de sacarosa 2.3 mM (Sacarosa). Las letras distintas en el crecimiento indican diferencias significativas (a > b) obtenidas mediante una prueba de ANCOVA, con un $\alpha = 0.05$.

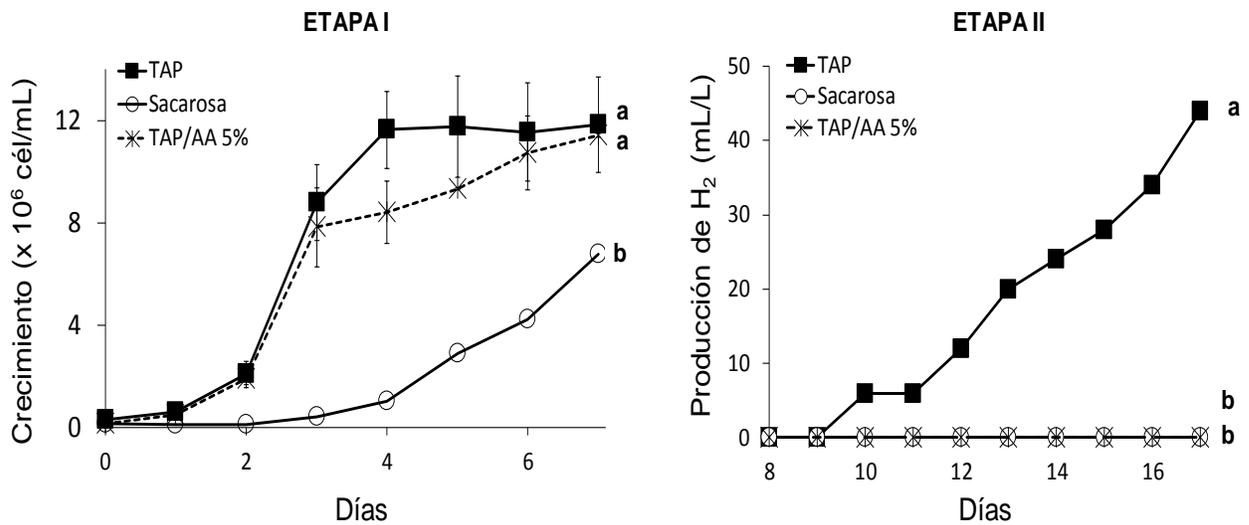


Figura 14. Curvas de crecimiento durante la producción de biomasa (Etapa I) y la producción de H₂ mediante la privación de azufre (Etapa II) de *Scenedesmus obliquus* cultivada con diferentes aportes de carbono. Control (medio TAP) (Harris, 2009) (17.4 mM de ácido acético); Medio TAP + sustitución de ácido acético comercial al 5% (17.4 mM de ácido acético) (TAP / AA 5%); Medio TAP + sustitución de sacarosa 2.3 mM (Sacarosa). Las letras distintas en el crecimiento indican diferencias significativas (a > b) obtenidas mediante una prueba de ANCOVA, con un $\alpha = 0.05$.

La tasa de crecimiento en la fase exponencial (μ) de *C. gloeopara* y *S. obliquus* durante en la Etapa I no presentaron diferencias significativas ($p > 0.05$) por efecto de los diferentes aportes de carbono en el medio. Para la especie *C. gloeopara* la mayor tasa de crecimiento se presentó en el medio TAP/AA 5%, seguida del medio TAP. Para *S. obliquus* la mayor tasa de crecimiento se encontró con medio TAP, seguida de TAP/AA 5% y sacarosa (Tabla 4).

Tabla 4. Tasa de crecimiento en fase exponencial (μ) de *Chlamydomonas gloeopara* y *Scenedesmus obliquus* cultivadas con diferentes aportes de carbono. Control (medio TAP) (Harris, 2009) (17.4 mM de ácido acético); Medio TAP + sustitución de ácido acético comercial al 5% (17.4 mM de ácido acético) (TAP / AA 5%); Medio TAP + sustitución de sacarosa 2.3 mM (Sacarosa). Las letras distintas en el crecimiento indican diferencias significativas ($a > b$) obtenidas mediante una prueba de ANOVA de una vía, con un $\alpha = 0.05$.

Tratamiento	<i>C. gloeopara</i>	<i>S. obliquus</i>
Medio TAP	1.57 \pm 0.31 ^a	1.34 \pm 0.75 ^a
TAP / AA 5%	1.66 \pm 0.28 ^a	0.89 \pm 0.82 ^a
Sacarosa	1.32 \pm 0.16 ^a	0.98 \pm 0.66 ^a

La concentración de carbohidratos totales en *C. gloeopara* al final de la Etapa I mostró diferencias significativas ($p < 0.05$). El mayor contenido de carbohidratos fue en el tratamiento con medio TAP (32.2 $\mu\text{g}/10^6$ cél), seguido de sacarosa (24.7 $\mu\text{g}/10^6$ cél). La menor concentración de carbohidratos se presentó en TAP/AA 5% donde se obtuvo 2.56 $\mu\text{g}/10^6$ cél y fue 92% menor respecto al tratamiento TAP (Figura 15A).

La concentración de carbohidratos totales al final de la Etapa I en *S. obliquus* mostró diferencias significativas por efecto de los tratamientos ($p < 0.05$). La mayor concentración de carbohidratos en *S. obliquus* se presentó en el medio TAP (10 $\mu\text{g}/10^6$ cél), seguido del tratamiento sacarosa ($p < 0.05$). La menor concentración de carbohidratos se presentó en el tratamiento TAP/AA 5% donde solo se logró obtener 1.61 $\mu\text{g}/10^6$ cél y fue 6 veces menores a lo encontrado en el medio TAP (Figura 15B).

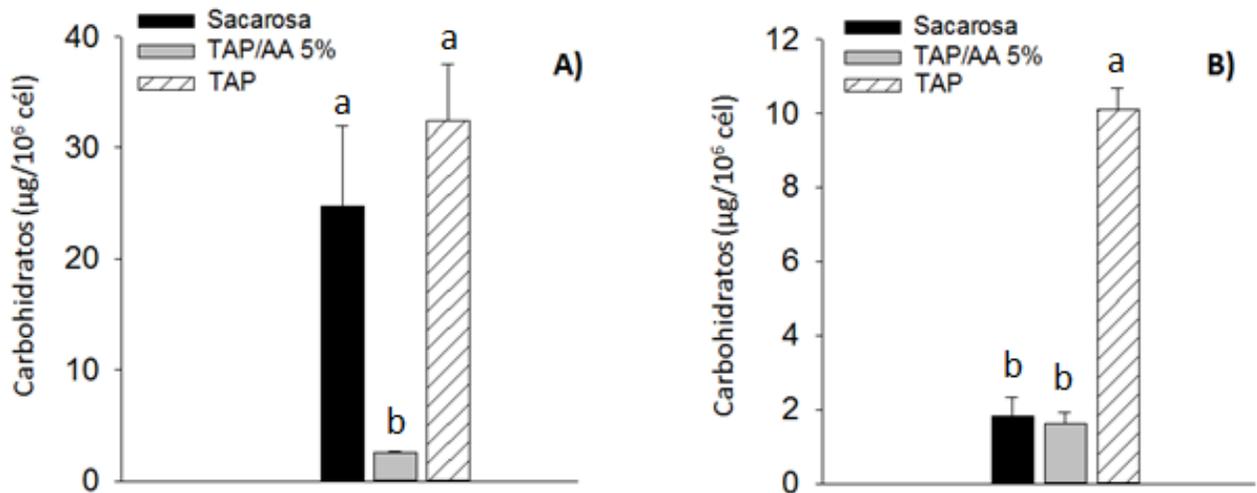


Figura 15. Concentración de carbohidratos totales ($\mu\text{g}/10^6$ cél) de *Chlamydomonas gloeopara* (A) y *Scenedesmus obliquus* (B) cultivadas en medio TAP con diferentes aportes de carbono durante la etapa de producción de biomasa (Etapa I). Control (medio TAP (Harris, 2009) (17.4 mM de ácido acético); Medio TAP + sustitución de ácido acético comercial al 5% (17.4 mM de ácido acético) (TAP / AA 5%); Medio TAP + sustitución de sacarosa 2.3 mM (Sacarosa). Las letras distintas indican diferencias significativas ($a > b$) obtenidas mediante una prueba de ANOVA de una vía con un $\alpha = 0.05$.

Los valores iniciales promedio de pH para *C. gloeopara* oscilaron entre 8.7 (sacarosa) y 7.3 (TAP), dependiendo del medio de cultivo y no se encontró un cambio significativo hacia el final del ensayo ($p > 0.05$). El valor de pH de los cultivos con medio TAP en la Etapa I se incrementó con el paso del tiempo, con excepción del tratamiento con sacarosa donde disminuyó 0.3 unidades de pH.

Los cultivos de *S. obliquus* presentaron valores iniciales entre 8.2 (sacarosa) y 7.3 (TAP) y no se encontró un cambio significativo hacia el final del ensayo ($p > 0.05$).

El tamaño promedio de *C. gloeopara* al día uno de la Etapa I presentó diferencias significativas ($p < 0.05$) como resultado del aporte de carbono. En la Etapa I las células del tratamiento AA 5% fueron de mayor tamaño con 11.4 μm . Sin embargo, hacia el final de la Etapa I, las células del tratamiento AA 5% perdieron un 30% de su volumen (7.99 μm). En el medio con TAP sin metales/AA 5% se presentaron las células más pequeñas (7.43 μm) y su reducción de tamaño al final de la Etapa I fué sólo de 5% (Tabla 6).

Para *S. obliquus* el día uno de la Etapa I, no hubo diferencias significativas en el tamaño de las microalgas ($p > 0.05$) entre los tratamientos. En el tratamiento con sacarosa se

presentaron las células de menor tamaño (7.80 μm). El tamaño de las células de *S. obliquus* al final la Etapa I disminuyó significativamente ($p < 0.05$) principalmente en los tratamientos sacarosa y TAP (Tabla 5).

Tabla 5. Tamaño celular (μm) de *Chlamydomonas gloeopara* y *Scenedesmus obliquus* mantenidas en tratamientos con diferentes aportes de carbono durante la Etapa I. Control (medio TAP) (Harris, 2009) (17.4 mM de ácido acético); Medio TAP + sustitución de ácido acético comercial al 5% (17.4 mM de ácido acético) (TAP / AA 5%); Medio TAP + sustitución de sacarosa 2.3 mM (Sacarosa). ANOVA de dos vías con un $\alpha=0.05$, donde las letras distintas indican diferencias significativas ($a > b$) producidas por los diferentes aportes de carbono. Los números indican diferencias significativas ($1 > 2$) producidas por el día de cultivo.

Tratamiento	<i>Chlamydomonas gloeopara</i>	<i>Scenedesmus obliquus</i>
	Día 1 (μm)	Día 1 (μm)
Medio TAP	9.1 \pm 2.12 ^{a1}	9.7 \pm 4.22 ^a
TAP / AA 5%	10.9 \pm 0.8 ^{a1}	10.6 \pm 0.9 ^{a1}
Sacarosa	7.4 \pm 1.56 ^{a2}	7.8 \pm 1.1 ^{a1}
	Día 8 (μm)	Día 8 (μm)
Medio TAP	7.7 \pm 1.6 ^{b1}	8.28 \pm 2.78 ^{a2}
TAP / AA 5%	7.9 \pm 0.6 ^{b1}	11.10 \pm 1.4 ^{a1}
Sacarosa	7.3 \pm 1.26 ^{b2}	7.37 \pm 1.42 ^{b2}

Para *C. gloeopara* se observó un mayor peso seco total y peso seco orgánico en el tratamiento TAP/AA 5% y TAP ($p < 0.05$). En los tratamientos 2 AA 5% / 2 Tris y AA 5%/Tris se presentó el menor peso seco total, peso seco orgánico y peso de ceniza.

En *S. obliquus* el mayor peso seco total y peso seco orgánico se presentaron en el tratamiento TAP/AA 5%, AA 5% y sacarosa ($p < 0.05$) (Tabla 6).

Tabla 6. Valores promedio y desviación estándar del peso seco total, el peso de ceniza y el peso seco orgánico ($\mu\text{g/mL}$) de dos especies de microalgas cultivadas con diferentes aportes de carbono. Control (medio TAP) (Harris, 2009) (17.4 mM de ácido acético); Medio TAP + sustitución de ácido acético comercial al 5% (17.4 mM de ácido acético) (TAP / AA 5%); Medio TAP + sustitución de sacarosa 2.3 mM (Sacarosa). ANOVA de una vía con un $\alpha=0.05$, donde las letras distintas indican diferencias significativas ($a > b$) producidas por los diferentes aportes de carbono.

<i>Chlamydomonas gloeopara</i>			
	Peso seco total	Peso cenizas	Peso seco orgánico
TAP	1496 \pm 160 ^a	239 \pm 23 ^a	1257 \pm 183 ^a
TAP/ AA 5%	1678 \pm 202 ^a	249 \pm 27 ^a	1429 \pm 281 ^a
Sacarosa	1119 \pm 149 ^a	239 \pm 38 ^a	879 \pm 112 ^{ab}

<i>Scenedesmus obliquus</i>			
	Peso seco total	Peso cenizas	Peso seco orgánico
TAP	957 \pm 110 ^b	223 \pm 11 ^a	734 \pm 110 ^b
TAP/ AA 5%	1255 \pm 76 ^a	241 \pm 29 ^a	1014 \pm 109 ^a
Sacarosa	1147 \pm 80 ^{ab}	213 \pm 22 ^a	934 \pm 58 ^a

6.3. Producción de H₂ mediante la reducción de O₂ fotosintético en el cultivo de las microalgas *Chlamydomonas gloeopara* y *Scenedesmus obliquus*

6.3.1 Efectos de los agentes reductores sobre el crecimiento y O₂ disuelto

En esta sección fue de interés reducir o eliminar el O₂ fotosintético del medio de cultivo de las microalgas mediante el uso de diferentes agentes reductores y evaluar su efecto sobre el crecimiento de las microalgas. La figura 16 y figura 17 muestran las curvas de crecimiento de *C. gloeopara* y *S. obliquus*, respectivamente, en presencia de diversos agentes reductores. En general, la mayoría de los agentes reductores inhibieron el crecimiento de ambas especies de microalgas, pero en diferentes grados. En orden descendente, los principales inhibidores del crecimiento de ambas especies de microalgas fueron hidroquinona, ácido ascórbico y sulfito de sodio ($p < 0.05$).

En contraste, en los cultivos de *C. gloeopara* y *S. obliquus* con cisteína, las densidades celulares fueron similares a las densidades presentadas en el tratamiento control sin agente reductor. De hecho, la densidad celular aumentó en aquellos cultivos con la concentración más alta de cisteína (8.3 mmol/L).

En este estudio, el sulfito de sodio inhibió el crecimiento de *C. gloeopara*, en todas las concentraciones estudiadas, entre el 17% y 83% en comparación con los cultivos control sin agente reductor ($p < 0.05$). Por el contrario, el sulfito de sodio inhibió el crecimiento de *S. obliquus* sólo a la concentración más alta (95%) y no a las concentraciones baja o media ($p > 0.05$) (Figura 16-1 y 17-1).

El ácido ascórbico (Figura 16-1 y 17-1) inhibió el crecimiento de *C. gloeopara* y *S. obliquus* en las concentraciones media (5.0 mmol / l) y alta (10.2 mmol/L) ($p < 0.001$).

La hidroquinona inhibió el crecimiento de *C. gloeopara* a todas las concentraciones evaluadas ($p < 0.001$) (Figura 16-4).

Después de 192 h de incubación, se cuantificaron las concentraciones de O₂ disuelto en los tratamientos y en el tratamiento control. En los cultivos control de *C. gloeopara* y *S. obliquus* sin agentes reductores, la concentración de O₂ disuelto fue de $90 \pm 4.2\%$ y $96 \pm 5.6\%$, respectivamente. En los tratamientos control sin células de algas, esta concentración se redujo a razón del incremento de la concentración de agente reductor.

En cultivos de *C. gloeopara*, la cisteína fue el agente reductor más eficiente en eliminar completamente el O₂ fotosintético por 192 h, resultando en concentraciones de O₂ disuelto < 4% en todas las concentraciones evaluadas (Figura 18-2). Con la hidroquinona, la concentración de O₂ disuelto fue < 2.3% en la concentración más alta y 40% y 75% en las concentraciones baja y media, respectivamente (Figura 18-4).

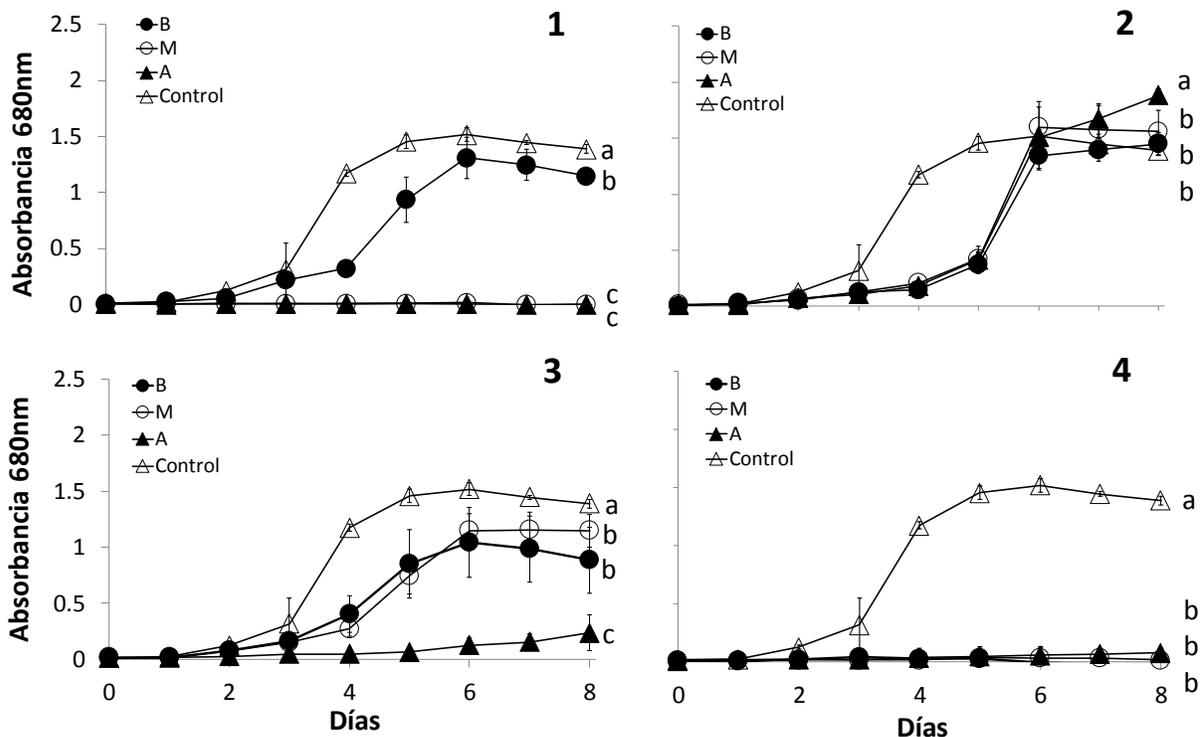


Figura 16. Curva de crecimiento de *Chlamydomonas gloeopara* cultivada en medio heterótrofo (TAP) a 100 $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$ con cuatro tipos de agentes reductores y tres concentraciones (mmol/L): 1) ácido ascórbico (0.227, 5.0 y 10.2); 2) cisteína (4.13, 6.19 y 8.25); 3) sulfito de sodio (0.04, 1.75 y 159); 4) hidroquinona (0.09, 4.54 y 22.7). Las concentraciones utilizadas: B: bajo, M: media y A: alta. Las letras distintas indican diferencias significativas ($a > b > c$) obtenidas por una prueba de ANCOVA con un $\alpha = 0.05$.

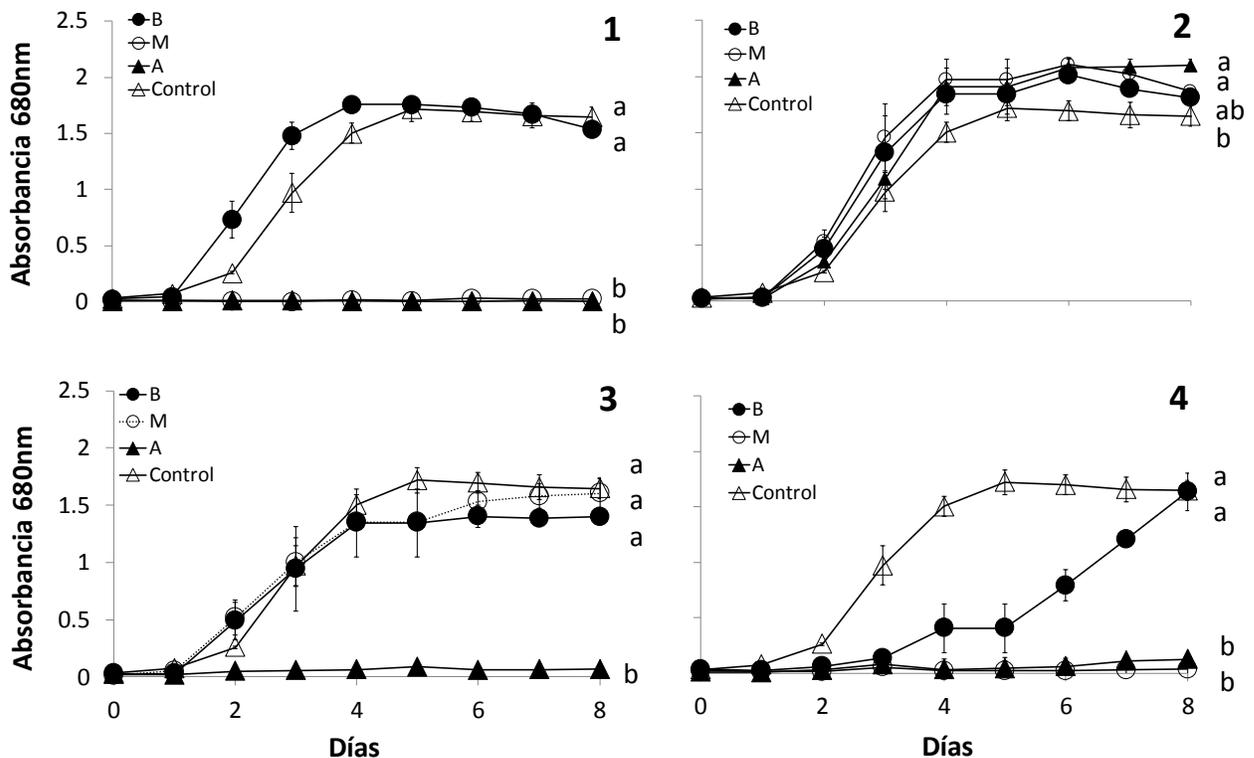


Figura 17. Curva de crecimiento *Scenedesmus obliquus* cultivada en medio heterótrofo (TAP) a $100 \mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$ con cuatro tipos de agentes reductores y tres concentraciones (mmol/L): 1) ácido ascórbico (0.227, 5.0 y 10.2); 2) cisteína (4.13, 6.19 y 8.25); 3) sulfito de sodio (0.04, 1.75 y 159); 4) hidroquinona (0.09, 4.54 y 22.7). Las concentraciones utilizadas: B: bajo, M: media y A: alta. Las letras distintas indican diferencias significativas ($a > b$) obtenidas por una prueba de ANCOVA con un $\alpha = 0.05$.

A las concentraciones más altas de ácido ascórbico y de sulfito de sodio, las concentraciones de O_2 disuelto fueron igual a 0, esto coincidió con sus efectos inhibitorios sobre el crecimiento de *C. gloeopara* ($p < 0.05$). A las concentraciones más bajas y medias de agente reductor, la concentración de O_2 disuelto osciló entre 59% a 97% (Figura 18-1, 18-3), y el crecimiento se inhibió entre 17% y 100% ($p < 0.05$). Por lo tanto, los bajos niveles de O_2 disuelto en los tratamientos con hidroquinona, ácido ascórbico y sulfito de sodio estuvieron relacionados con la inhibición del crecimiento microalgal y por lo tanto la inhibición de la fotosíntesis en cultivos de *C. gloeopara*.

En los cultivos de *S. obliquus*, el sulfito de sodio fue el agente reductor más eficiente en disminuir la concentración O_2 fotosintético disuelto a medida que la concentración del agente reductor se incrementó (Figura 19-3) ($p < 0.05$). El ácido ascórbico e hidroquinona

mostraron los niveles más bajos de O₂ disuelto en las concentraciones medias y altas, pero esto estuvo relacionado con la inhibición del crecimiento de las microalgas. Mientras que en los tratamientos con cisteína se alcanzaron valores del 70% de O₂ disuelto, cercanos a los registrados en el tratamiento control sin cisteína ($p < 0.05$). Las concentraciones de O₂ disuelto más altas se observaron en el tratamiento con cisteína, debido a las altas densidades de células (Figura 19-2). Por lo tanto, la saturación de cisteína podría haber ocurrido antes de 192 h.

De los resultados obtenidos se observó, que la cisteína no inhibió el crecimiento de *C. gloeopara* ni *S. obliquus* y aun así el O₂ fotosintético fue eliminado de manera eficiente por 192 h (al menos para *C. gloeopara*). Basándose en estos hallazgos, se usó cisteína (en la concentración más alta) para inducir la producción de H₂ en un medio heterótrofo anaerobio conteniendo sales de azufre con las dos especies de microalgas.

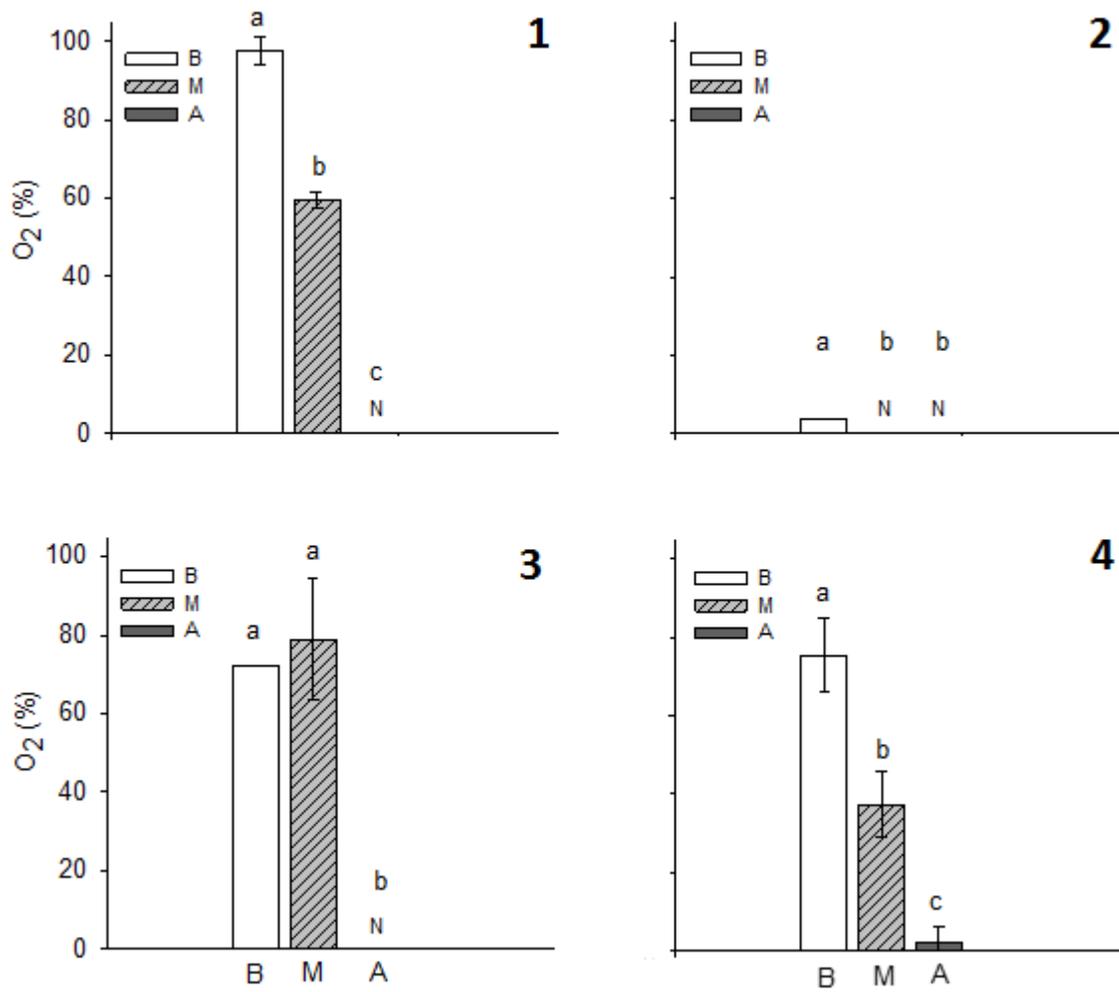


Figura 18. Porcentaje de O₂ disuelto en un cultivo de *Chlamydomonas gloeopara* a los 8 días de incubación cultivada con cuatro tipos de agentes reductores y tres concentraciones (mmol/L): 1) ácido ascórbico (0.227, 5.0 y 10.2); 2) cisteína (4.13, 6.19 y 8.25); 3) sulfito de sodio (0.04, 1.75 y 159); 4) hidroquinona (0.09, 4.54 y 22.7). Las concentraciones utilizadas: B: bajo, M: media y A: alta. N= 0 mg de O₂/L. Las letras distintas indican diferencias significativas (a > b > c) obtenidas por una prueba de ANOVA de una vía con un $\alpha = 0.05$.

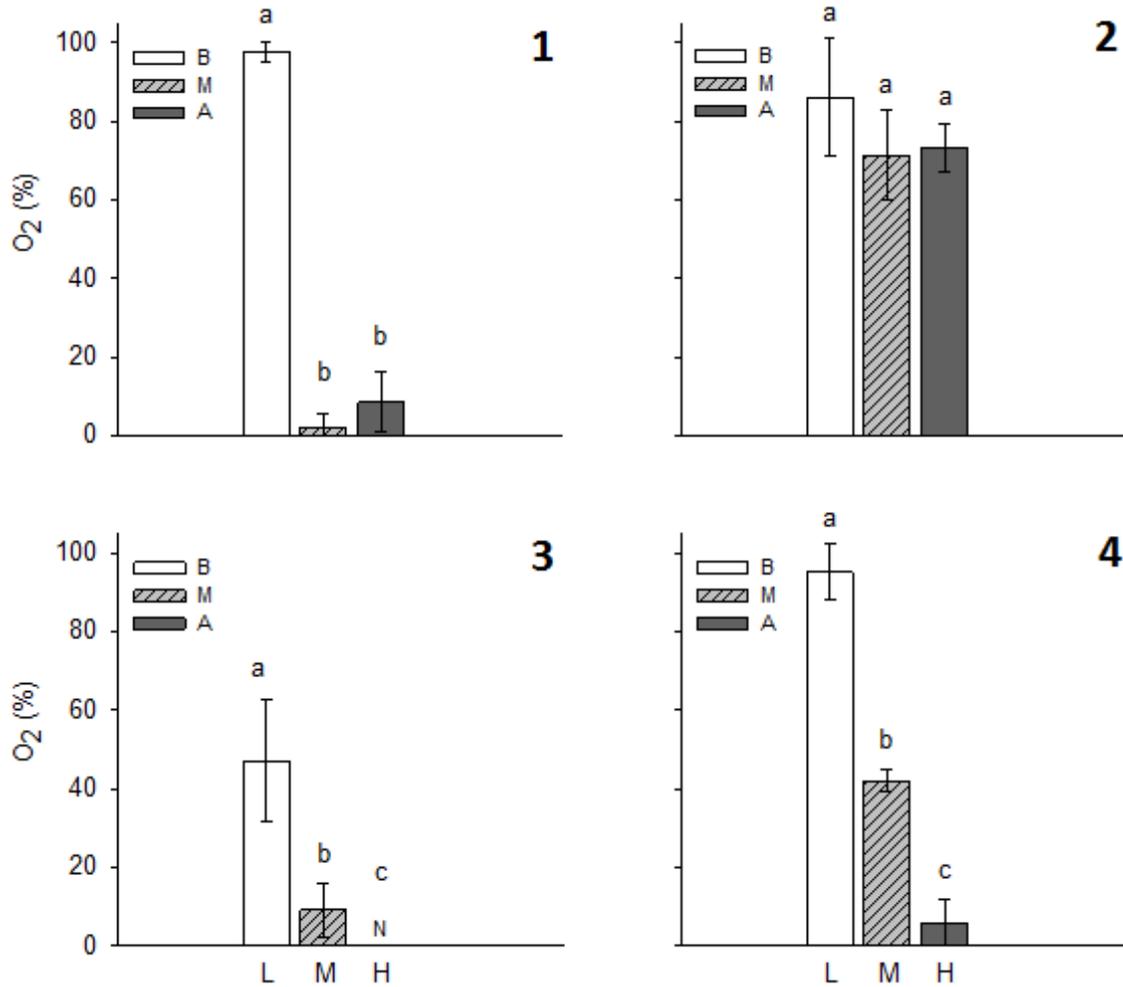


Figura 19. Porcentaje de O₂ disuelto en un cultivo de *Scenedesmus obliquus* a los 8 días de incubación cultivada con cuatro tipos de agentes reductores y tres concentraciones (mmol/L): 1) ácido ascórbico (0.227, 5.0 y 10.2); 2) cisteína (4.13, 6.19 y 8.25); 3) sulfito de sodio (0.04, 1.75 y 159); 4) hidroquinona (0.09, 4.54 y 22.7). Las concentraciones utilizadas: B: bajo, M: media y A: alta. N= 0 mg de O₂/L. Las letras distintas indican diferencias significativas (a > b > c) obtenidas por una prueba de ANOVA de una vía con un $\alpha = 0.05$.

6.3.2. Inducción para la producción de H₂ mediante un agente reductor

En esta sección se utilizó cisteína, ya que mostró poco o ningún efecto negativo sobre el crecimiento de las microalgas a concentraciones baja y media, y con la máxima capacidad para reducir el O₂ fotosintético que produjo *C. gloeopara* durante el periodo de incubación. La acumulación de H₂ en cultivos de *C. gloeopara* y *S. obliquus* con los tratamientos con cisteína, el control negativo y el control positivo se muestran en la Figura 20 y Figura 21, respectivamente.

Para los cultivos de *C. gloeopara* y *S. obliquus* en medio heterótrofo con sales de azufre (control negativo para la producción de H₂), la concentración de O₂ fotosintético en el espacio gaseoso aumentó durante la incubación (Figura 20A y Figura 21A). Además, se detectaron pequeñas cantidades de H₂, lo que indica la presencia de zonas anaerobias en el cultivo.

C. gloeopara y *S. obliquus* tuvieron una mayor densidad celular en el medio heterótrofo. Además presentaron una disminución significativa de la concentración de carbohidratos totales en la Etapa II con respecto a la concentración inicial en la Etapa I con 91.6% y 84.5%, respectivamente (Figura 20B, Figura 21B).

Para los cultivos de microalgas con medio TAP sin azufre (control positivo para la producción de H₂), las condiciones anaerobias se establecieron rápidamente después de 24 h de incubación, en los que la acumulación H₂ alcanzó su punto máximo (Figura 20C, Figura 21C). Fisiológicamente, en medio heterótrofo sin azufre, *C. gloeopara* y *S. obliquus* crecieron lentamente y las células de *S. obliquus* comenzaron a morir al final del ensayo, lo cual fue confirmado por la disminución en la densidad celular. En medio heterótrofo libre de azufre, los carbohidratos no se consumieron por completo (Figura 20D, Figura 21D), pero que potencialmente podrían utilizar como fuente de electrones para la producción de H₂ por fotólisis indirecta.

En los cultivos de *C. gloeopara* y *S. obliquus* en medio heterótrofo con azufre y adicionados con cisteína (Figura 20E, Figura 21E), se establecieron las condiciones anaerobias, las cuales se mantuvieron durante las primeras 48 h de incubación, tiempo en el que la acumulación H₂ alcanzó su punto máximo. En estas condiciones, la

acumulación H₂ en ambas especies, fue de 3 a 5 veces mayor que en medio heterótrofo sin azufre. El crecimiento y el catabolismo de los carbohidratos de *C. gloeopara* y *S. obliquus* en el tratamiento con cisteína fueron similares a los resultados obtenidos con el tratamiento control (Figura 26F, Figura 261F). La tasa de crecimiento (μ) para *C. gloeopara* y *S. obliquus*, con medio heterótrofo y cisteína, fue de 0.16/día y 0.13/día, respectivamente. El metabolismo de los carbohidratos confirma que la cisteína no afectó a los cultivos de microalgas de ambas especies como lo hizo el tratamiento heterótrofo sin azufre ($\mu = 0.08/\text{día}$ y $\mu = 0.02/\text{día}$). Además, la densidad celular aumentó significativamente (Figura 20F, Figura 21F). Por lo tanto, la evolución de O₂ aumentó, saturando el agente reductor después de 72 h, lo que detuvo la acumulación de H₂.

La concentración de clorofila "a" tuvo una relación directa con el crecimiento. En los cultivos de *C. gloeopara* la concentración más alta de clorofila "a" se produjo en el medio heterótrofo con cisteína (209 ± 73 mg clorofila/10⁶ células), seguido por el medio heterótrofo con sales de azufre (128 ± 95 mg clorofila/10⁶ células) y por el medio heterótrofo sin azufre (59 ± 30 mg clorofila/10⁶ células) ($p < 0.05$). Para *S. obliquus*, el mayor contenido de clorofila "a" se presentó en el tratamiento heterótrofo con sales de azufre (98.3 ± 13 mg clorofila/10⁶ células), seguido del heterótrofo con cisteína (61.5 ± 21 mg clorofila/10⁶ células) y heterótrofo sin azufre (40.7 ± 12 mg clorofila/10⁶ células) ($p < 0.05$). La concentración de clorofila "a" tuvo una relación directa con el crecimiento.

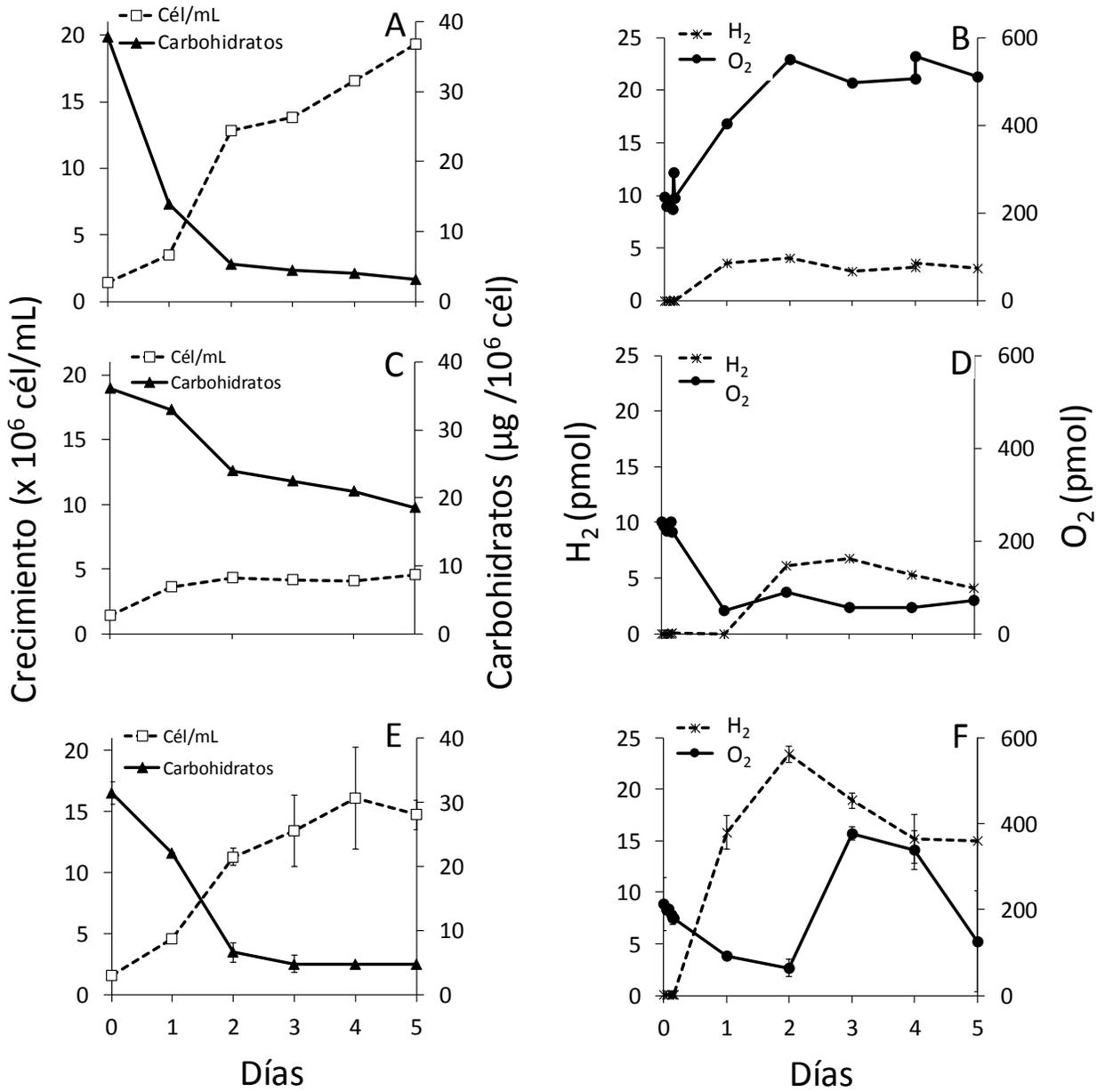


Figura 20. Curvas de crecimiento (—□—), concentración de carbohidratos totales (—▲—), producción de hidrógeno (H₂, -*-*) y producción oxígeno (O₂, —●—) de *Chlamydomonas gloeopara* cultivada en medio heterótrofo (TAP) (A y B), heterótrofo TAP sin azufre (C y D) y TAP con 1 g/L de cisteína (E y F).

En este bioensayo el consumo de O₂ mediante un agente reductor mejoró significativamente la acumulación de H₂, el crecimiento y el consumo de carbohidratos en *C. gloeopara* y *S. obliquus*. Para *C. gloeopara*, la acumulación H₂ mediante fotólisis indirecta fue de 6.7 pmol, y se consumieron un total de 17.5 g de carbohidratos/10⁶ células (cultivo heterótrofo con sales de azufre). Con el tratamiento con cisteína, fueron consumidos 26.7 g de carbohidratos/10⁶ cél, por lo tanto, se esperaría una acumulación de H₂ de 10.2 pmol a través de la fotólisis indirecta. En contraste, la cantidad de H₂ que se acumuló fue de 23.4 pmol. Debido a que la fotosíntesis no se vio afectada en los tratamientos con el uso de cisteína, la ruptura de la molécula del agua vía fotólisis directa pudo haber suministrado los electrones adicionales a la Fe-H₂asa.

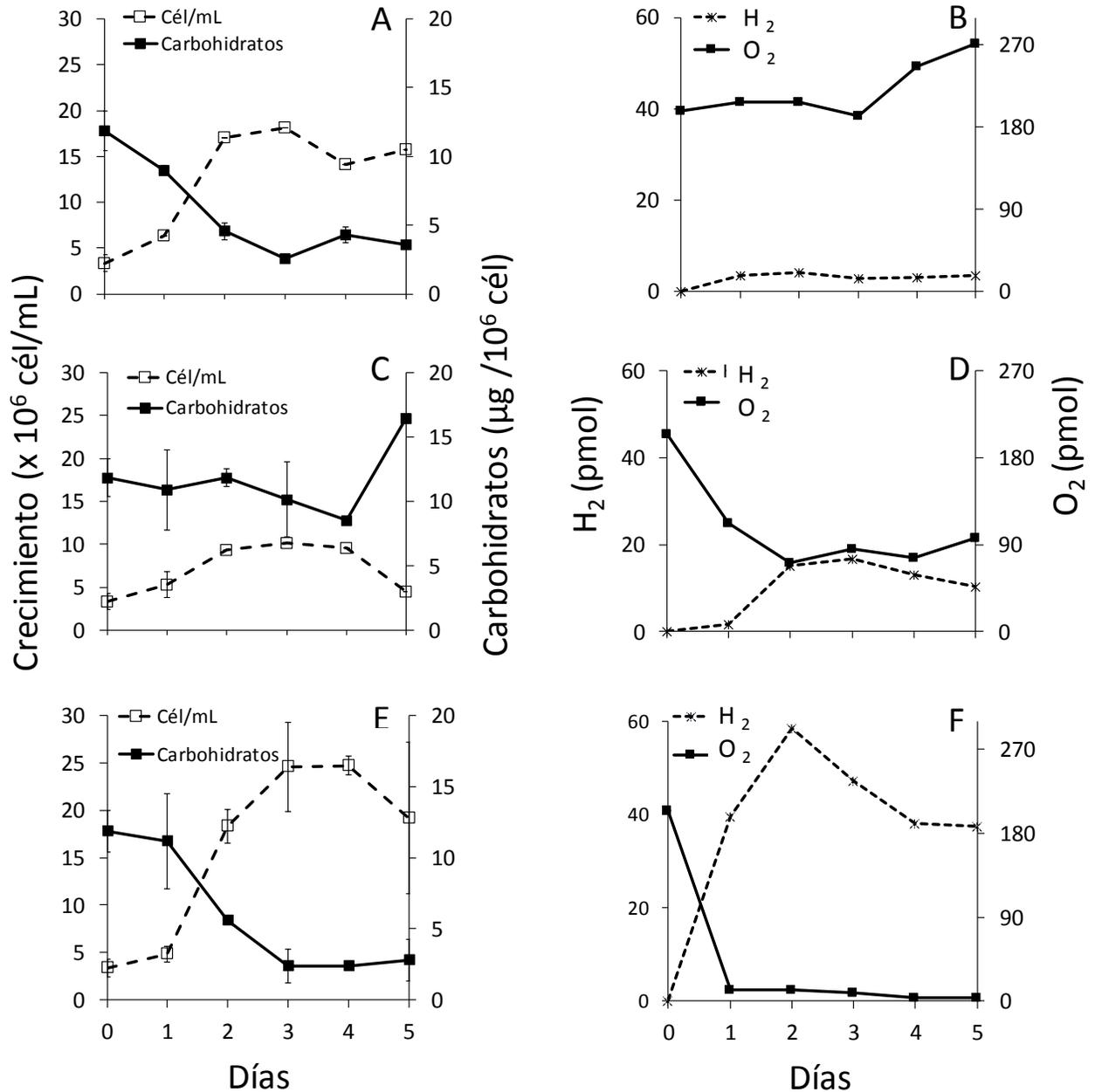


Figura 21. Curvas de crecimiento (—□—), concentración de carbohidratos totales (—■—), producción de hidrógeno (H₂, -*-*) y producción oxígeno (O₂, —●—) de *Scenedesmus obliquus* cultivada en medio heterótrofo (TAP) (A y B), heterótrofo TAP sin azufre (C y D) y TAP con 1 g/L de cisteína (E y F).

6.3.3. Ensayo confirmatorio de la producción anaerobia de H₂ con una especie control: *Chlamydomonas reinhardtii*

Como un ensayo confirmatorio del efecto de la cisteína para reducir el O₂ disuelto del medio e inducir la producción de H₂ en un cultivo de *C. reinhardtii* mantenido en un medio heterótrofo.

Los resultados obtenidos por cromatografía de gases de las muestras obtenidas al evaluar tres concentraciones de cisteína en un cultivo de *C. reinhardtii*, mostraron una mayor producción de H₂ en los tratamientos donde se agregó cisteína y una disminución significativa de la concentración de O₂. El tratamiento de 1 g/L de cisteína, fue capaz de mantener los niveles de O₂ por debajo de 2% v/v en el espacio gaseoso. Además, en esta concentración fue donde se encontró la mayor cantidad de H₂ (Figura 22).

Por tanto, se concluye: A) La adición de cisteína en el cultivo de *C. reinhardtii* fue capaz de reducir la concentración de O₂ de 17% a 3.6%; B) Bajo estas condiciones se logró incrementar el porcentaje de H₂ a 13% y; la concentración de 1 g/L de cisteína fue la más eficaz para mantener la concentración de O₂ por debajo del 5% por más de 100 h (Figura 22).

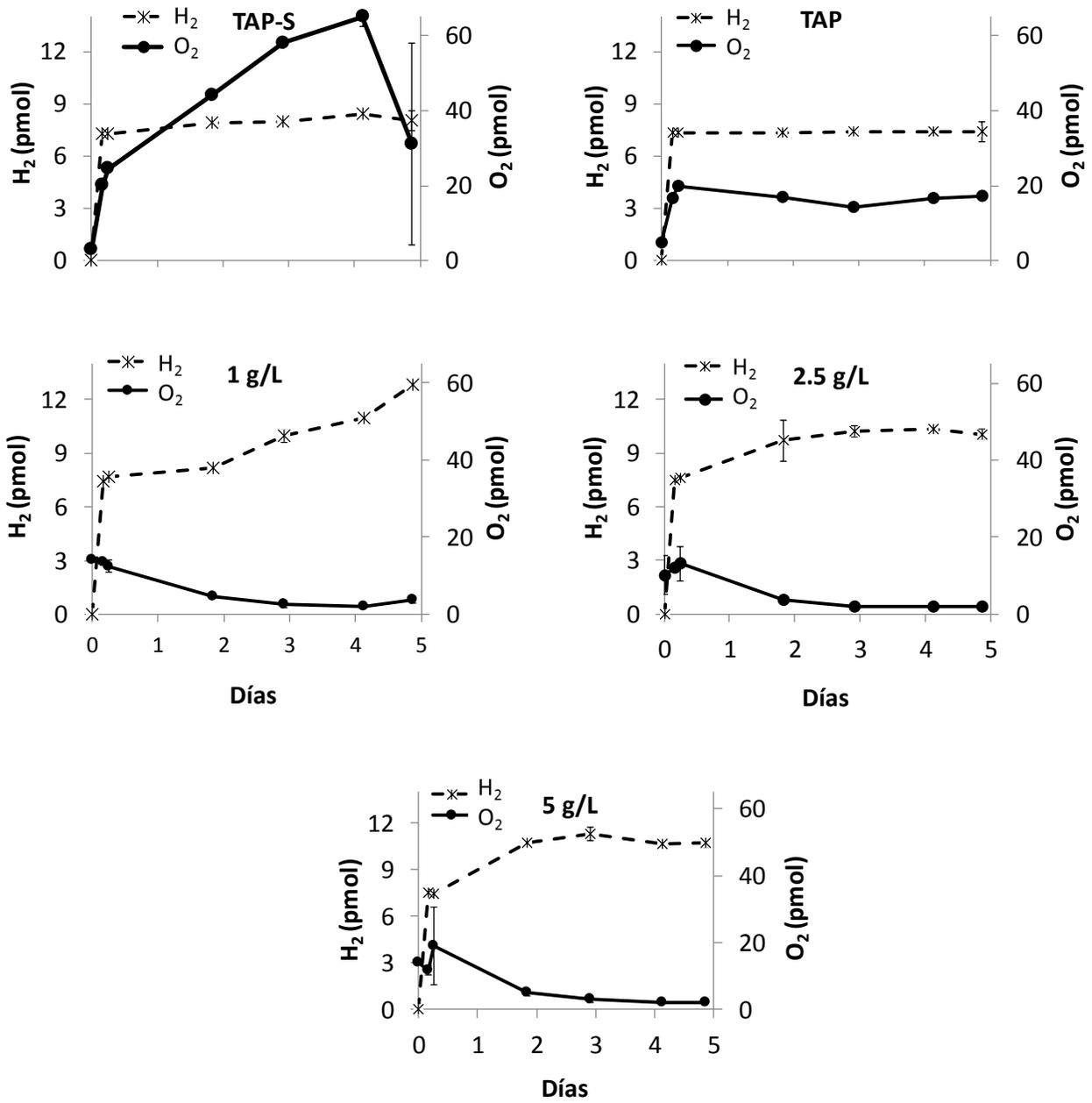


Figura 22. Porcentaje de O₂ en la fase gaseosa y producción de H₂ en un cultivo de *Chlamydomonas reinhardtii* con la adición de tres concentraciones de cisteína (1, 2.5 y 5 g/L) y utilizando dos controles medio TAP y TAP sin azufre (TAP-S).

Durante la inducción a la producción de H₂ se observó un aumento en la intensidad del color de los cultivos, lo cual estuvo relacionado con la cantidad de cisteína utilizada. A mayor cantidad de cisteína la coloración verde fue más intensa. A pesar de no haber realizado un conteo de la densidad celular de los cultivos, fue evidente en las observaciones de las muestras en el microscopio mayor densidad celular en los tratamientos con mayor concentración de cisteína (Figura 23).



Medio TAP-S

1 g/L cisteína

Medio TAP

Figura 23. Coloración de los cultivos de *Chlamydomonas reinhardtii* con la adición de cisteína (1 g/L) y utilizando dos controles medio TAP y TAP-S (TAP sin azufre).

6.3.4. Inducción anaerobia de la producción de H₂ en *Scenedesmus obliquus* empleando una especie de bacteria

El objetivo de esta sección fue utilizar un agente biológico en el medio de cultivo (especie de bacteria), que cumpliera la función de consumir el O₂ fotosintético, además de coexistir con las microalgas durante la Etapa II.

En la figura 24 se muestra la concentración de carbohidratos totales y la curva de crecimiento de *S. obliquus* cultivada en conjunto con una especie de bacteria durante la inducción a la producción de H₂ (Etapa II). El crecimiento de *S. obliquus* con el tratamiento de 1 g/L de cisteína registró el mayor crecimiento con 36×10^6 cél/mL después de 96 h, lo cual fue significativamente superior a lo obtenido con el resto de los tratamientos ($p < 0.05$). El segundo mayor crecimiento de *S. obliquus* se presentó en el tratamiento M+bacteria, el cual alcanzó una densidad de 34.2×10^6 cél/mL a las 72 h. Sin embargo, después de 72 h de cultivo se presentó un descenso en la densidad celular del 43%. El menor crecimiento de *S. obliquus* se encontró en el tratamiento TAP-S.

En el tratamiento M+bacteria, el número inicial de bacterias en el cultivo fue en promedio de 1.5×10^4 UFC/mL y al paso de los días se registró un incremento continuo hasta llegar a 4.2×10^5 UFC/mL. La bacteria utilizada en este ensayo fue caracterizada de acuerdo a la tinción de Gram como: gram-positivos y con un fenotipo de cocos.

La concentración final de carbohidratos totales en *S. obliquus* durante la inducción a la producción de H₂ (Etapa II), disminuyó aproximadamente 40% en los diferentes tratamientos ($p < 0.05$), excepto en el tratamiento TAP-S, donde se presentó un incremento significativo del 85% después de 24 h.

En los tratamientos de *S. obliquus* con medio TAP, TAP-S, TAP-cisteína y M+bacteria, no se determinaron diferencias significativas en la concentración de O₂ durante 120 horas ($p > 0.05$). La menor concentración de O₂ en el cultivo de *S. obliquus* se determinó en el tratamiento M+bacteria después de 24 h con 94.7 pmol (Figura 24), seguido del tratamiento con cisteína. Estos resultados fueron menores a lo encontrado con el tratamiento control sin azufre (TAP-S). Sin embargo, en el tratamiento M+bacteria después de las 24 h, la concentración de O₂ comenzó a incrementarse hasta llegar a 230 pmol.

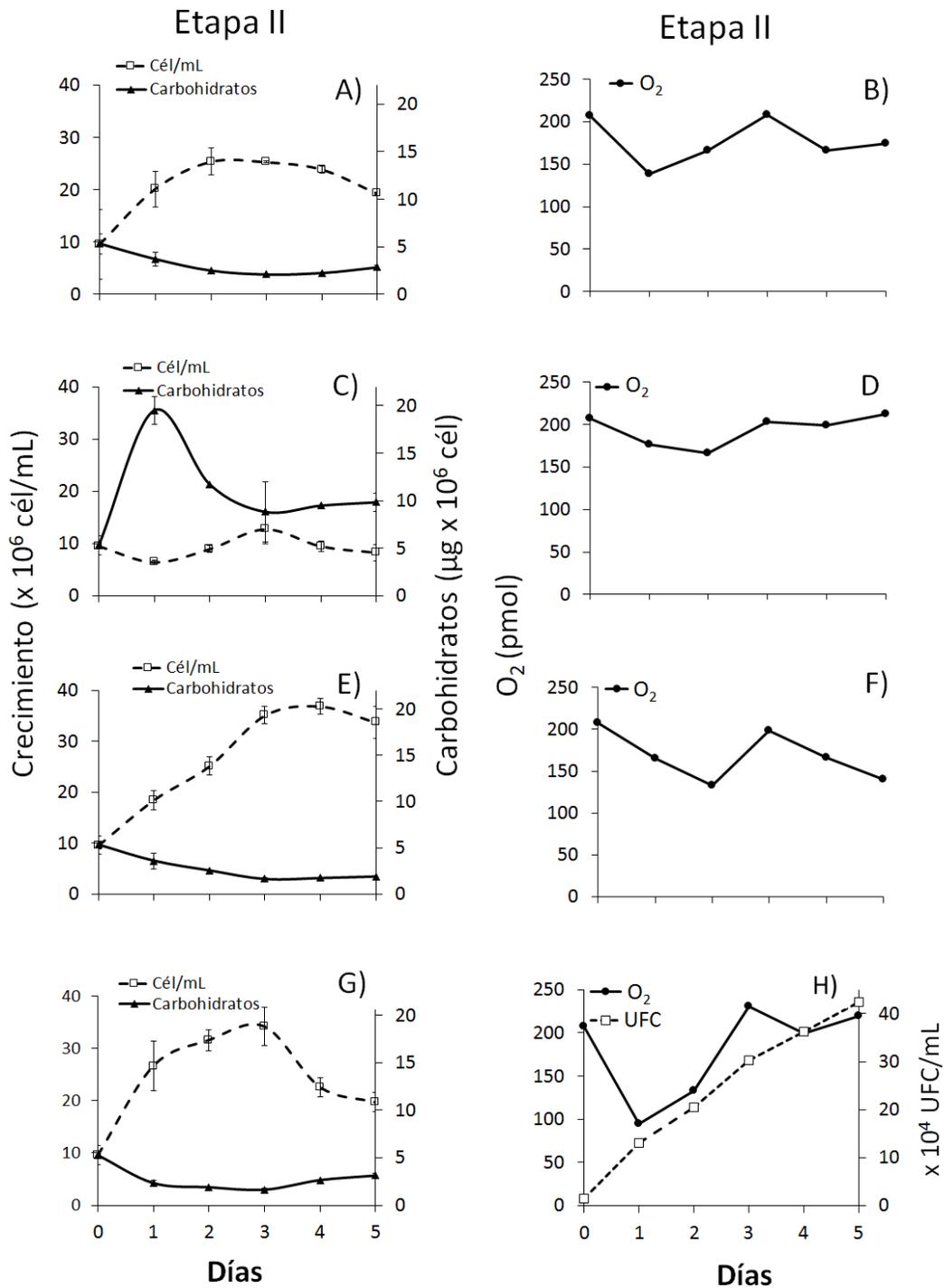


Figura 24. Curva de crecimiento de *Scenedesmus obliquus* (10^6 cél/mL, \square), concentración de carbohidratos totales (\blacktriangle) y la concentración de O₂ (pmol, \bullet) en la etapa de inducción de la producción de H₂ mediante anaerobiosis (Etapa II) en cultivos con (A, B) medio TAP (TAP, control negativo de la producción de H₂); (C, D) cultivos en TAP en privación de azufre (TAP-S, control positivo de producción de H₂); (E, F) cultivos en medio TAP + 1 g/L de cisteína (TAP-cisteína, control positivo de la producción de H₂); y (G, H) cultivos en medio TAP + la especie de bacteria aislada (M+bacteria).

El crecimiento bacteriano monoespecífico del tratamiento bacteria fue constante durante el ensayo y no presentó diferencias significativas con respecto al crecimiento bacteriano del tratamiento *S. obliquus* y bacterias (M+bacteria) ($p > 0.05$) (Figura 26). La concentración de O_2 en el tratamiento bacteriano monoespecífico mostró variaciones durante el ensayo, pero no se presentaron diferencias significativas respecto a los demás tratamientos (Figura 24).

Durante la inducción a la producción de H_2 se observó un aumento en la intensidad del color verde de los cultivos de microalgas. La coloración verde más intensa se presentó en el tratamiento con cisteína, lo cual estuvo relacionado con la mayor densidad celular (Figura 25). La menor coloración se observó en el tratamiento con el medio heterótrofo sin azufre (TAP-S).

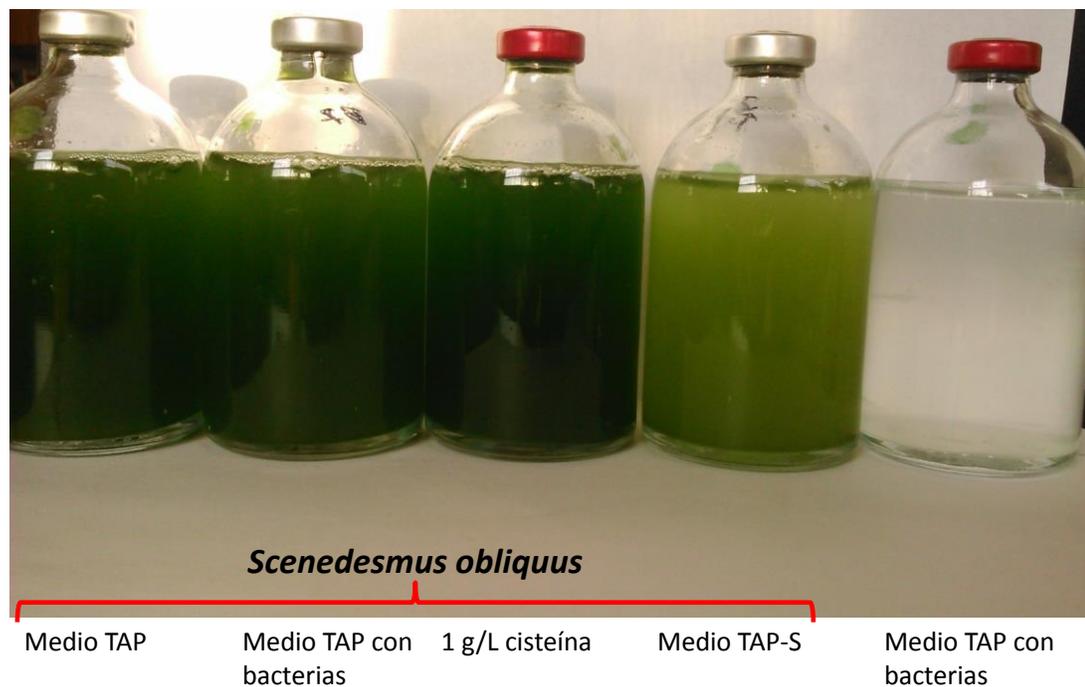


Figura 25. Coloración de los cultivos de *Scenedesmus obliquus* cultivadas en: medio TAP; TAP y la especie de bacteria aislada; TAP + 1 g/L de cisteína; TAP sin azufre (TAP-S); y medio TAP sólo con la especie de bacteria aislada.

En la figura 26 se observa la curva de crecimiento bacteriana y la cantidad del O₂ disuelto del tratamiento bacteriano. Se observó un incremento constante en la cantidad de UFC a partir de las primeras 24 h y al final del ensayo la densidad fue de 2.8 x 10⁵ UFC/mL. La concentración de O₂ mostró una disminución después de 72 h de cultivo. Sin embargo, hacia el final del ensayo la concentración de O₂ se incrementó nuevamente. Finalmente, la cantidad de bacterias en el medio de cultivo no fue suficiente para consumir todo el O₂ disuelto del medio.

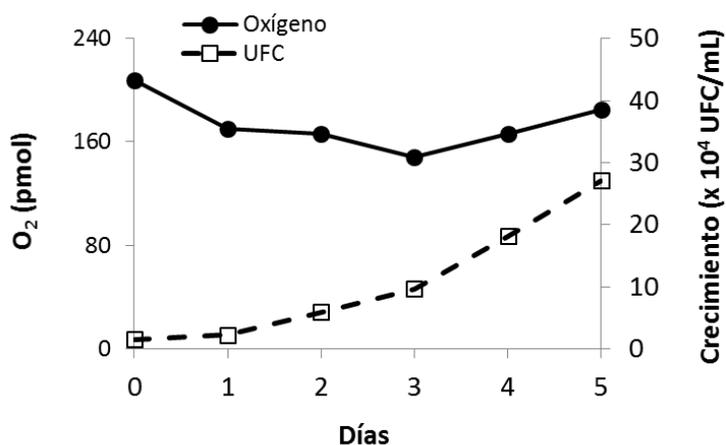


Figura 26. Curva de crecimiento de las bacterias aerobias facultativas (x 10⁵ UFC/mL) en medio TAP y consumo de O₂.

7. DISCUSIÓN

7.1. Bioprospección de especies con potencial para la producción de H₂ en cultivos con medio autótrofo y heterótrofo

El H₂ es considerado como una fuente de energía para ser usada en el futuro. Por su parte, las microalgas son capaces de transformar la energía solar directamente en energía química en forma de H₂, lo cual resulta una alternativa muy atractiva para la generación de biocombustibles. El objetivo de esta sección fue realizar la bioprospección de cinco especies de microalgas del grupo de las Clorofíceas, y evaluar su potencial para la producción anaerobia de H₂ utilizando el protocolo de privación de azufre propuesto por Melis *et al.* (2000) bajo dos condiciones de cultivo: heterotrófica (medio TAP) y autótrofica (medio "f").

Durante la Etapa de producción de biomasa (Etapa I), el crecimiento de cuatro de las cinco especies de microalgas, *C. gloeopara*, *C. mexicana*, *C. reinhardtii* y *S. obliquus*, fue mayor en la condición de cultivo heterotrófica que en autótrofica. Para su crecimiento las microalgas utilizan como fuente principal de carbono el CO₂. Sin embargo, algunas especies de Clorofíceas, son capaces de utilizar diferentes fuentes de carbono, como: azúcares, ácidos orgánicos, alcoholes, aminoácidos y extractos de levaduras, por lo que se les considera organismos con un metabolismo heterótrofo (Bermúdez *et al.*, 2003). La condición de cultivo heterotrófica en este ensayo, favoreció el crecimiento de las distintas especies de microalgas debido a la mayor diversidad y concentración de nutrientes disponibles en el medio TAP, además del aporte de carbono adicional en forma de ácido acético, el cual al disolverse en el medio de cultivo se convierte en ion acetato y puede ser incorporado fácilmente al metabolismo de las microalgas para sintetizar macromoléculas, como carbohidratos (Harris, 2009). En las microalgas el acetato es metabolizado a acetyl CoA y convertido a succinato a través de ciclo del glioxilato (Schmidt y Zetsche, 1990) y a continuación, el succinato es utilizado como precursor para la síntesis de carbohidratos (Pérez-García *et al.*, 2011). De esta forma, las microalgas cultivadas en la condición heterotrófica consiguen energía adicional para su crecimiento y reproducción.

En esta investigación, el crecimiento heterótrofo de las especies se realizó con suministro de luz, lo cual se reflejó en mayor densidad celular, mayor cantidad de carbohidratos totales y mayor peso seco orgánico. Cuando las microalgas utilizan simultáneamente luz, CO₂ como fuente de carbono y sustratos orgánicos (como el ácido acético) se considera que están ejerciendo una capacidad mixotrófica (Prosperi *et al.*, 1992; Ortega *et al.*, 2004) y es posible lograr una mayor densidad celular (Lee *et al.*, 1989).

En este sentido se han reportado resultados similares utilizando acetato en cultivos de *Chlamydomonas humicola* y *S. obliquus*, observándose una mayor densidad celular (Laliberte y de la Noue, 1993; Combres *et al.*, 1994). De igual forma, se han empleado otras fuentes de carbono orgánicas (glucosa y citrato) e inorgánicas (bicarbonato) con el propósito de incrementar la densidad celular de las microalgas con resultados contrastantes, tanto positivos como negativos (Chu *et al.*, 1994).

En el presente ensayo, sólo la especie *Chlorella vulgaris* presentó un mayor crecimiento en el medio autótrofo "f" durante la Etapa I. Esto puede indicar, que *Chlorella vulgaris* está mejor adaptada a los cultivos fotoautótrofos y es capaz de utilizar de forma eficiente el CO₂ disuelto en el medio y convertirlo en material de reserva mediante el Ciclo de Calvin (Acién-Fernández *et al.*, 2012). Además del uso de NH₃Cl como fuente de nitrógeno del medio "f" modificado, el cual puede ser más fácilmente sintetizado por algunas microalgas que el ácido acético del medio TAP (Xin y Hong-yin, 2010), con lo que es posible lograr efectos positivos sobre el crecimiento (Arumugam *et al.*, 2013).

En la Etapa II la tasa de crecimiento fue menor que en la Etapa I en la mayoría de las especies evaluadas, sólo *S. obliquus* en medio "f" presentó una tasa de crecimiento mayor en la Etapa II. Sin embargo, las microalgas mantuvieron el crecimiento en las condiciones heterótrofas y autotróficas ensayadas, con excepción de *C. gloeopara* y *Chlorella vulgaris* con el medio autótrofo "f", donde su densidad celular disminuyó significativamente con respecto al inicio de la Etapa II. Se ha reportado que en cultivos bajo una condición fotoautótrofa, la deficiencia de CO₂ en el medio de cultivo es capaz de reducir el transporte de electrones en los cloroplastos y provoca la inhibición del ciclo

de Calvin y por ende la generación y almacenamiento de carbohidratos (Demeter *et al.*, 1995) y en consecuencia disminuye o se detiene el crecimiento.

En la Etapa II, el mayor crecimiento se observó en las especies *C. gloeopara*, *C. reinhardtii*, *C. mexicana* y *S. obliquus* bajo la condición heterótrofa. La disminución en la tasa de crecimiento fue por efecto de la privación de azufre durante la producción de H₂. Este protocolo de producción de H₂ mediante la privación de azufre limita el crecimiento (Melis *et al.*, 2000) sin afectar la respiración celular de las microalgas cultivadas bajo condiciones fotoautotróficas, heterotróficas y mixotróficas (Kosourov *et al.*, 2007; Heifetz *et al.*, 2000). Además, causa afectaciones en el resto del metabolismo celular por la inactividad en la producción de proteínas, hace que disminuya la capacidad fisiológica de las células para reproducirse (Chisti, 2007) lo que conlleva a la muerte del cultivo después de unos días.

En el metabolismo de las microalgas el azufre es un componente esencial para la síntesis de amino ácidos, proteínas, ácidos nucleicos, vitaminas, clorofilas, cromóforos y ficobilina y para el control osmótico (Giordano y Raven, 2014; Giordano *et al.*, 2005). El azufre es absorbido como sulfato (Saito, 2004) y transportado activamente al interior celular con la ayuda de proteínas transportadoras de membrana en contra de un gradiente, mediante un mecanismo de simporte con protones de H⁺ (3H⁺/SO₄²⁻) en un proceso dependiente de energía catalizado por permeasas específicas de membrana plasmática (Mera, 2016). Este gradiente electroquímico de H⁺ es mantenido por una H⁺ATPasa del plasmalema que transporta unidireccionalmente H⁺ hacia el exterior. Una vez transportado al interior celular, el sulfato es transportado al interior de los cloroplastos mediante transportadores de sulfato asociados con los orgánulos, donde tiene lugar el proceso de asimilación (Hawkesford, 2003). En *C. reinhardtii* y en otras microalgas verdes unicelulares, se conoce la existencia de dos sistemas de transporte de sulfato localizados en la membrana plasmática (SULTR) (Pootakham *et al.*, 2010) y en la envoltura del cloroplasto (SulP) (Melis y Chen, 2005).

La asimilación del sulfato se produce exclusivamente en el cloroplasto de las algas verdes, siendo un proceso dependiente de la luz y en donde se emplean reductores fotosintéticos y el ATP para la reducción de sulfato y la biosíntesis de cisteína y metionina

esenciales para la síntesis de gran cantidad de proteínas utilizadas para el crecimiento y para el resto del metabolismo (Leustek *et al.*, 2000). Estas circunstancias son las principales limitantes del protocolo de producción de H₂ mediante la privación de azufre, ya que afecta el crecimiento y el resto del metabolismo celular.

Como caso especial se presentó *Chlorella vulgaris* cultivada en medio TAP durante la Etapa II, ya que presentó un cambio en la coloración habitual del cultivo, pasando de una tonalidad verde clara característica a una coloración roja inusual, con un efecto negativo sobre el crecimiento. Este cambio dramático en la coloración y en la densidad celular de *Chlorella vulgaris* se pudo deber a la privación de azufre, que tuvo un efecto negativo sobre el estado fisiológico de las células y una disminución en la cantidad de clorofila (Siaut *et al.*, 2011). Hasta donde se conoce, en la literatura del área no ha sido descrito este cambio en la coloración de *Chlorella vulgaris* cuando es sometida a estas condiciones de cultivo. Las células color rojo después de ser mantenidas en medio TAP con azufre regresaron a su coloración verde característica después de un par de días. El daño a las células de *Chlorella vulgaris* aparentemente estuvo relacionado con la síntesis de pigmentos y no afectó su tamaño celular.

La principal afectación de la privación de azufre ocurre en los centros de reacción del PSII encargados de captar la luz (Grewe *et al.*, 2014), ya que no es posible reparar su sistema fotosintético. De acuerdo a Rashid *et al.* (2011), la privación de azufre en las algas verdes provoca una inhibición reversible de la fotosíntesis oxigénica. Esto se debe al impedimento de la biosíntesis de la proteína D1, que requiere de amino ácidos azufrados (metionina y cisteína) y que constituye el centro de reacción del PSII de las microalgas. La biosíntesis de la proteína D1 debe hacerse constantemente debido al fotodaño ocasionado por la luz y su biosíntesis consume la mayor parte de la cisteína y la metionina de las microalgas (Hell, 1997). Por tal motivo, el estrés causado a *Chlorella vulgaris* con el medio TAP sin azufre originó, que su PSII quedara inactivo y expuesta a la intensidad de la irradiancia ensayada (100 $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$). Esto dio como resultado el cambio de color en el cultivo y la sobreproducción de carotenoides en el interior de la célula como un mecanismo de protección. Los carotenoides tienen la función específica de proteger las clorofilas y las membranas de los tilacoides del daño foto-oxidativo (Hagen *et al.*,

1993) y existe una relación directa sobre la adición de acetato de sodio al medio de cultivo y la concentración de carotenoides (Ortega *et al.*, 2004), como lo que ocurrió en este ensayo con *Chlorella vulgaris*. La concentración de carotenoides en el tratamiento *Chlorella vulgaris* fue aproximadamente 5 veces menor a las concentraciones de producción de otras especies de microalgas. Actualmente, la producción de carotenoides con microalgas se realiza principalmente con, *Dunaliella tertiolecta* y *Dunaliella salina*, utilizando medios de cultivo con limitación de nitrógeno alcanzando producciones entre 0.03 mg/L y 1.25 mg/L (García-González *et al.*, 2005; López-Elías *et al.*, 2013; Yang *et al.*, 2013).

Por tanto, la transferencia de *Chlorella vulgaris* al medio libre de azufre y la adición de acetato aparentemente inducen la producción de carotenoides, con lo cual se abre la alternativa de producir carotenoides, los cuales tienen un alto precio en la industria y son usados en gran cantidad de productos para consumo humano (Pulz y Gross, 2004).

Durante la inducción a la producción de H₂ (Etapa II), fue posible producir H₂ con las cinco especies de microalgas *C. gloeopara*, *C. mexicana*, *C. reinhardtii*, *Chlorella vulgaris* y *S. obliquus* bajo la condición autótrofa, lo que coinciden con lo reportado por Tsygankov *et al.* (2006) quienes demostraron la producción de H₂ con *C. reinhardtii* bajo condiciones autotróficas, al eliminar el azufre del medio con una producción de 56 mL/L. Por otro lado, Laurinavichene *et al.* (2004), reportan con *C. reinhardtii* una producción de H₂ entre 30 y 130 mL/L al utilizar diferentes concentraciones de acetato (12, 17 y 34 mM) y diferentes irradiancias entre 15 $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$ y 80 $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$. Los resultados obtenidos en la presente investigación son comparables con los obtenidos en los trabajos antes mencionados.

En general la adición de la fuente de carbono orgánica como el acetato por efecto del medio TAP produjo una mayor cantidad de H₂. Excepto en *C. reinhardtii* donde los resultados bajo un metabolismo autótrofo (medio "f") fueron 41% respecto a los encontrados con el medio TAP.

El protocolo de producción de H₂ mediante la privación de azufre inhibe el PSII y provoca que la tasa de respiración celular sobrepase la tasa de fotosíntesis. Esto causa que las microalgas consuman el O₂ disuelto restante del medio y se origina la transición hacia un ambiente anaerobio estimulando la inducción a la producción de la enzima Fe-H₂asa y la

producción de H₂ (Zhang *et al.*, 2002; Forestier *et al.*, 2003; Guan *et al.*, 2004; Kosourov *et al.*, 2007).

Solo con *Chlorella vulgaris* no fue posible la producción de H₂ bajo la condición heterótrofa, lo cual contrasta con lo reportado por Rashid *et al.* (2011) y Amutha y Murugesan (2011) quienes usaron la fuente de carbono orgánica del medio TAP (ácido acético glacial) y tuvieron una producción de H₂ de 530 mL/L y 13 mL/L, respectivamente. La nula producción de H₂ por parte de *Chlorella vulgaris* estuvo relacionado con el cambio en el metabolismo debido a la privación de azufre que afectó la síntesis de pigmentos y la regeneración de los centros de reacción del PSII encargados de captar la luz (Grewe *et al.*, 2014).

Se ha reportado que el incremento en la producción de H₂ en cultivos de microalgas coincide con la oxidación de sustratos orgánicos, como los carbohidratos (Tsygankov *et al.*, 2002; Laurinavichene *et al.*, 2004). En este sentido, la acumulación de carbohidratos es potenciada por la disponibilidad del acetato en el medio de cultivo (Tsygankov *et al.* 2006), lo que origina una relación directa entre la concentración de acetato y la actividad enzimática (Combres *et al.*, 1994). Este proceso catabólico se ha reportado en *S. obliquus* (Combres *et al.*, 1994) y en *Chlorella pyrenoidosa*, *Chlorella autotrophica* y *C. reinhardtii* (Ortega *et al.*, 2004).

Resultados de producción de H₂ realizados anteriormente en esta misma investigación (ver apéndice 11.3) en *C. gloeopara*, *C. mexicana* y *S. obliquus* también originaron una mayor producción de H₂ con medio heterótrofo TAP. Esto se debió a la actividad catabólica del acetato en el interior de la microalgas lo cual aportó un flujo adicional de electrones para la enzima Fe-H₂asa. Los electrones requeridos para la producción de H₂ provienen de dos fuentes, la fotólisis del agua y de la hidrólisis del material de reserva, los carbohidratos (Zhang *et al.*, 2002; Kosourov *et al.*, 2007; Melis, 2007), de este manera fue posible que las microalgas *C. gloeopara*, *C. mexicana* y *S. obliquus* mantenidas en la condición heterótrofa produjeran una mayor cantidad de H₂, los cuales se encuentran dentro del rango medio reportado por otros autores (*C. reinhardtii* y *Chlorella vulgaris* utilizando el medio de cultivo autótrofo con temperatura inferiores a las reportadas para estas especies (Tabla 7).

Tabla 7).

En esta investigación, es el primer reporte de producción de H₂ por parte de *C. gloeopara* y *C. mexicana* y sus resultados son comparables a los obtenidos por Tsygankov *et al.* (2006) y Oncel y Vardar-Sukan (2011) con *C. reinhardtii*. También se produjo H₂ con *C. reinhardtii* y *Chlorella vulgaris* utilizando el medio de cultivo autótrofo con temperatura inferiores a las reportadas para estas especies (Tabla 7).

Tabla 7. Resultados de producción de H₂ por diferentes especies de microalgas bajo condiciones heterótrofas y autótrofas.

Especie	pH	Temperatura (°C)	Irradiancia (μE/m ² /s)	Fuente de carbono	Agitación constante	Producción (mL H ₂ /L)	Referencia
<i>Chlorella vulgaris</i>	8.6	27	120	Acetato-TAP	Si	530	Rashid <i>et al.</i> , 2011
<i>Chlorella vulgaris</i>		30		Maíz molido	Si	13	Amutha y Murugesan, 2011
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	7.2	25	60-200	Acetato-TAP	Si	225	Kim <i>et al.</i> , 2006
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i> Dang C137+	6.9	28	100	Acetato-TAP	Si	140	Laurinavichene <i>et al.</i> , 2002
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i> Dang 137c+	7.0	29	100	Acetato-TAP	Si	120	Laurinavichene <i>et al.</i> , 2004
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i> Dang 137Cmt+	7.0	28	20-120	2% CO ₂	-	56	Tsygankov <i>et al.</i> , 2006
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i> CC124	7.2	27	50-100	Acetato-TAP	Si	27	Oncel y Vardar-Sukan, 2011
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i> CC-124				Acetato-TAP	Si	3	Tamburic <i>et al.</i> , 2011
<i>Scenedesmus obliquus</i>	7.2	20	100	Acetato-TAP	No	74	En este trabajo
<i>Chlamydomonas mexicana</i>	7.2	20	100	Acetato-TAP	No	62	En este trabajo
<i>Chlamydomonas gloeopara</i>	7.2	20	100	Acetato-TAP	No	30	En este trabajo
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	7.2	20	100	Medio "f"	No	42	En este trabajo
<i>Chlorella vulgaris</i>	7.3	20	100	Medio "f"	No	41	En este trabajo

En el caso contrario, en un cultivo autótrofo el CO₂ es fundamental para una rápida inactivación del PSII y para la producción de H₂. La adición de acetato al medio no es crítica y es posible producir H₂ en cultivos autótrofos. Sin embargo, lo que si resulta importante es la cantidad de carbohidratos que pueden almacenar las microalgas durante la transición de producir O₂ a consumir O₂ justo después de eliminar el azufre del medio (Kosourov *et al.*, 2007). El material de reserva (almidón principalmente) es utilizado como sustrato endógeno durante el metabolismo anaerobio y los electrones liberados por el catabolismo de los carbohidratos se transfieren al complejo de la plastoquinona que se reduce y cede los electrones a la Fe-H₂asa. Así, el sustrato sirve como fuente donadora de electrones para la Fe-H₂asa soportando parte del proceso de producción de H₂ (Jorquera *et al.*, 2008).

Se ha reportado que, cada especie de microalga tiene una capacidad diferente para acumular carbohidratos de reserva y después utilizarlos como fuentes de electrones para la enzima Fe-H₂asa (Guan *et al.*, 2004; Fouchard *et al.*, 2005). Melis *et al.* (2000), reportaron un incremento de hasta 10 veces en la concentración de carbohidratos, principalmente de almidón, durante las primeras 24 horas de transición hacia el metabolismo anaerobio de las microalgas después de eliminar el azufre del medio (Melis, 2007). Estos cambios en el metabolismo de acumulación de carbohidratos, provocaron un incremento en el volumen celular cercano al 400% en *C. reinhardtii* (Zhang *et al.*, 2002). En presente trabajo se determinó el diámetro de las microalgas el día 20 y a pesar de que no se encontraron diferencias significativas, el medio heterótrofo promovió células de mayor tamaño en todas las especies estudiadas.

En este ensayo durante la Etapa I la mayor acumulación de carbohidratos se originó con el medio heterótrofo en *C. reinhardtii*, *S. obliquus*, *C. gloeopara* y *C. mexicana*, donde en promedio la acumulación fue 66% superior. No obstante, en *C. reinhardtii* (TAP) la producción de H₂ fue menor que en medio "F" y en *Chlorella vulgaris* no se logró producir H₂. Estos resultados pueden indicar que la mayor cantidad de electrones utilizados en *C. reinhardtii* para la producción de H₂ provenían de la fotólisis del agua y no de la glucólisis del material de reserva.

Una opción para estimular la acumulación de carbohidratos en las microalgas es la disminución en la disponibilidad de los nutrientes, con lo cual se podría favorecer la producción de H₂. La disminución en la disponibilidad del nitrógeno, fósforo (Hsieh y Wu, 2009; Moellering y Benning, 2010) y de algunos iones como el sulfato (SO₄²⁻) (Dragone *et al.*, 2011) favorecen la fijación del CO₂ y su almacenamiento en forma de carbohidratos y lípidos (Rodolfi *et al.*, 2009).

Esta condición es ventajosa para la producción de H₂, ya que una mayor cantidad de material de reserva almacenado puede ser ventajosa para la biofotólisis indirecta, y proporcionar los electrones adicionales a la Fe-H₂asa para una mayor producción de H₂. Esto coincide con los resultados observados al final de la Etapa I, donde se acumuló la mayor cantidad de carbohidratos en las cinco especies estudiadas.

7.2. Efecto de las condiciones ambientales sobre el crecimiento microalgal y la producción de hidrógeno

7.2.1. Efecto de la irradiancia y la temperatura sobre el crecimiento y la producción de H₂

Para este ensayo se estudió el efecto de la irradiancia (100 y 400 $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$) y la temperatura (20 °C, 25 °C y 30 °C) sobre el crecimiento y la producción de H₂ de dos especies de microalgas, *C. gloeopara* y *S. obliquus*. En la Etapa I, el crecimiento microalgal de ambas especies fue afectado sólo por las irradiancias evaluadas. En las microalgas, la cantidad (irradiancia) y calidad de la luz (el espectro) determinan la velocidad a la cual se realiza la fotosíntesis y la generación de compuestos orgánicos a partir de agua y CO₂, la composición de los componentes celulares y su metabolismo (Muller-Feuga *et al.*, 2003; Dubinsky y Stambler, 2009). Como consecuencia se influye sobre la velocidad de crecimiento (Taylor *et al.*, 2005; Wahidina *et al.*, 2013; Singh y Singh, 2015), la composición bioquímica de las microalgas y el metabolismo celular. Por este motivo, la irradiancia es un factor importante a controlar en un cultivo (Contreras-Flores *et al.*, 2003).

Cada especie presenta un intervalo óptimo para la captación de la irradiancia, en el cual es posible optimizar su crecimiento y su composición bioquímica (Abalde y Herrero, 2004). En el presente ensayo, los mayores crecimientos de *C. gloeopara* y *S. obliquus* se obtuvieron con la menor irradiancia, 100 $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$, dando como resultado una relación inversa entre la irradiancia con respecto al crecimiento microalgal. Esta relación inversa fue causada por la fotoinhibición y/o fotodaño debido a la exposición a irradiancias elevadas (Matsuda *et al.*, 2002). En este ensayo, es posible que la irradiancia de 400 $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$ fuera una cantidad excesiva de irradiancia para *C. gloeopara* y *S. obliquus*, lo que provocó la disminución de la fotosíntesis e incluso fotodaño en el aparato fotosintético, lo que culminó en una reacción de fotoprotección y en menor crecimiento, como fue previamente descrito en cultivos de macroalgas *Laminaria abyssalis* y *Laminaria digitata* al ser expuestas a irradiancias elevadas (Powles, 1984; Rodrigues *et al.*, 2000).

Las altas irradiancias al inicio del cultivo afectan el crecimiento de las microalgas, ya que el exceso de irradiancia, aunado a la baja cantidad de células del inóculo produce foto-inhibición, la disminución de la producción de biomasa y fijación de CO₂ disminuye (Ho *et al.*, 2012). Es posible que en la presente investigación la fotoinhibición sea la clave del bajo crecimiento de los tratamientos de *C. gloeopara* mantenidos a 400 $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$, ya que la densidad final fue 13 veces menor en promedio a lo encontrado en el tratamiento a 100 $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$. Para evitar la susceptibilidad al fotoinhibición y/o fotodaño el fitoplancton ha desarrollado estrategias para optimizar la captación de luz, el proceso metabólico de la fotosíntesis y el crecimiento (Havelková-Dousová *et al.*, 2004). Sin embargo, en el presente estudio a pesar de que no se observó en el microscopio un fotodaño evidente en las células de las microalgas expuestas a 400 $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$, es probable que *C. gloeopara* sean más sensibles a la fotoinhibición y no tengan desarrolladas estrategias para protegerse de irradiancias elevadas a diferencia de *S. obliquus*.

La concentración de carbohidratos totales en *C. gloeopara* fue afectada positivamente por la mayor irradiancia, como se ha reportado en otras especies de algas verdes como *Scenedesmus obliquus* (Ho *et al.*, 2012). Donde, la irradiancia facilitó o mejoró la absorción de luz y estimuló la generación de carbohidratos a través del ciclo de Calvin (Kumar *et al.*, 2015). Para el presente ensayo, la mayor intensidad luminosa estimuló la acumulación de carbohidratos totales en *C. gloeopara* y se desarrolló una relación inversa entre la irradiancia con respecto al crecimiento microalgal y la concentración de carbohidratos, lo cual difiere de lo reportado por Xia *et al.* (2013), que indican que no existe alteración negativa en el metabolismo de *Scenedesmus obtusus*.

En los tratamientos de *S. obliquus* la mayor irradiancia no afectó la concentración de carbohidratos totales en las células. Carvalho *et al.* (2009) concluyeron que no hay una evidencia de una relación positiva entre la irradiancia y la concentración de carbohidratos totales y al parecer esta respuesta es especie específico. Por el contrario, para *S. obliquus* CNW-N, se ha reportado una relación directa entre la irradiancia y la concentración de carbohidratos (Ho *et al.*, 2012). De acuerdo a Carvalho *et al.* (2009), en *Pavlova lutheri* a 14°C y 105 $\mu\text{mol foton}/\text{m}^2/\text{s}$ (1 foton = 1 Einstein), la limitación de luz induce a la deficiencia en la asimilación de carbono. Consecuentemente, esta deficiencia

afecta la biosíntesis de clorofila “a”, que es estimulada para compensar el descenso en la capacidad fotosintética. De esta forma las microalgas fijan suficiente cantidad de carbono para generar los carbohidratos y las proteínas requeridas para el metabolismo celular. Esto ocurrió en los cultivos de *S. obliquus* de la presente investigación, con la menor irradiancia (100 $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$), donde se presentó la mayor cantidad de clorofila “a” y una cantidad carbohidratos totales comparables a los del tratamiento con la mayor irradiancia (400 $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$).

La producción de pigmentos (clorofila “a” y carotenoides) fue mayor en los tratamientos a 400 $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$ con *C. gloeopara*. El incremento de carotenoides sucedió como respuesta de las células a la mayor irradiancia con la finalidad de proteger su sistema fotosintético y mostró una relación directa entre la irradiancia y la concentración de pigmentos como ha sido descrita anteriormente por Carvalho *et al.* (2009) y Erickson *et al.* (2015). En este sentido Powles (1984), indica que altas irradiancias producen la inhibición en el transporte de electrones desde el PSII al PSI, lo que provoca que se active la producción de los carotenoides, que tienen una acción protectora al disipar la energía capturada por la clorofila (Celekli y Dönmez, 2006). Después la clorofila entrega su exceso de energía a los carotenoides que forman un estado de triplete oxidado, el cual puede perder su energía por calor sin causar daño en las células. A pesar de que el tamaño celular no fue afectado, es posible que, mediante un análisis de microscopía electrónica, se pudiera observar el aumento en el tamaño de los cloroplastos debido al aumento de sus pigmentos, en respuesta al fotodaño producido por la mayor irradiancia. Por tanto, es de vital importancia optimizar la irradiancia en los cultivos de microalgas para lograr la mayor producción de H_2 .

Para los tratamientos de *S. obliquus* de la presente investigación, la mayor irradiancia no causó un incremento en la concentración de pigmentos. Por el contrario, la menor irradiancia promovió una mayor concentración de pigmentos. Este incremento permitió que las microalgas lograran captar una mayor cantidad de luz, la cual disminuyó como resultado del incremento en la densidad celular y del fotosombreado causado por las mismas microalgas. De acuerdo a De Marsac y Houmard (1993), las células al encontrarse en un medio con poca iluminación aumentan la cantidad de membranas de

los tilacoides, con el fin para captar la mayor cantidad de energía radiante posible y así mantener la producción de moléculas orgánicas para su metabolismo (Richardson *et al.*, 1983; Combe *et al.*, 2015). Aunque para *S. obliquus* la mayor irradiancia no tuvo efectos sobre la concentración de pigmentos, si causó que el crecimiento fuera sólo el 50 % con respecto a los tratamientos con 100 $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$. Este efecto negativo pudo deberse a que el nitrógeno asimilado fue empleado para la síntesis de proteínas para el proceso de reparación del aparato fotosintético a causa de un exceso en la irradiancia, lo que limitó la disponibilidad de nitrógeno en las células para el crecimiento (Merzlyak *et al.*, 2008). Por tanto, en el presente ensayo el tratamiento con 400 $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$ no logró generar la cantidad de suficiente de proteínas para un crecimiento y concentración de pigmentos comparable con el tratamiento con 100 $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$.

La producción de H_2 con *C. gloeopara* y *S. obliquus* fue afectada sólo por la irradiancia y no por la temperatura. La mayor producción de H_2 fue estimulada por la menor irradiancia, principalmente en *C. gloeopara*, donde los resultados con 100 $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$ fueron 10 veces más a lo producido con 400 $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$. Se ha reportado que irradiancias superiores a 50 $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$ son capaces de afectar de forma negativa la producción de H_2 , ya que se relaciona con el aumento de la actividad del PSII y la evolución O_2 durante un corto periodo después de la privación de azufre, hasta que se consume el azufre de reserva y se detiene el ciclo de reparación del PSII frenando la producción del O_2 (Laurinavichene *et al.*, 2004).

Por otro lado, se ha reportado que la máxima producción H_2 con *C. rehinhartii* se obtiene con una irradiancia de 200 $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$, como resultado de la rápida producción de H_2 durante las primeras 24 h después de la privación de azufre (Kim *et al.*, 2006). Por el contrario, Markov *et al.* (2006) reportan la mejor producción de H_2 con una irradiancia de 2000 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$, la cual fotoinhibió el PSII y estimuló la producción de H_2 . Esta fotoinhibición y producción de H_2 se puede lograr con sólo 30 min de exposición a una alta irradiancia. Sin embargo, en la presente investigación la producción de H_2 se inhibió con una intensidad de 400 $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$, debido al fotodaño en el PSII por el exceso de irradiancia (Kim

et al., 2006; Oncel y Vardar, 2011) y a la baja acumulación de carbohidratos totales en la Etapa I, principalmente en *C. gloeopara*.

Existe una relación directa entre la acumulación celular de carbohidratos en las microalgas y la producción de H₂. Esta relación se evidencia cuando los cultivos de microalgas son privados azufre, ya que se detiene la fotosíntesis y se inicia con el proceso de producción de H₂ (Zhang *et al.*, 2002; Bayro-Kaiser y Nelson, 2016). Para que se dé la producción de H₂ se requiere de un flujo de electrones proveniente del catabolismo de los carbohidratos almacenados en el interior de las microalgas hacia la enzima hidrogenasa, que es la encargada de producir el H₂ (Hallenbeck y Benemann, 2002; Ni *et al.*, 2006). Sin embargo, esto no fue evidente en la presente investigación ya que se la menor producción de H₂ se obtuvo con la mayor irradiancia.

7.2.2. Efecto del aporte de carbono sobre la producción de H₂

Existe un reto cuando se trata de maximizar la producción de H₂ con microalgas. El primer paso para ello, es lograr el crecimiento microalgal, el cual se ve afectado por muchos factores tales como nutrientes, intensidad de la luz, salinidad, pH y temperatura. El principal macronutriente para el crecimiento de las microalgas es el carbono, que influye en la tasa de crecimiento, la composición química y puede limitar la absorción de otros nutrientes (Chen *et al.*, 2012). Se ha estudiado el efecto de diversos sustratos orgánicos en el medio de cultivo: glucosa, citrato, bicarbonato, acetato, fructosa y amino ácidos. Sin embargo, los resultados reportados no presentan una tendencia clara, ya que se han encontrado tanto efectos positivos como negativos en el crecimiento de las microalgas, que resulta en una respuesta especie-específica (Chu *et al.*, 1994).

El crecimiento y la concentración de carbohidratos totales en las microalgas se incrementan cuando son cultivadas con un aporte orgánico de carbono a base de ácido acético (Behrens, 2005; Pérez-García *et al.*, 2010; Cheirsilp y Torpee, 2012; Moon *et al.*, 2013). Además, las microalgas son capaces de producir una mayor cantidad de energía en forma de ATP (Qiao *et al.*, 2009). Sin embargo, a pesar de las investigaciones realizadas por otros autores (Tabla 8), donde han utilizado glucosa, glicerol, acetato, citrato y bicarbonato como fuente de carbono, aún falta por determinar cuál es la mejor fuente orgánica de carbono para lograr el mayor crecimiento y la mayor producción de H₂.

En la presente investigación todos los tratamientos con *S. obliquus* y *C. gloeopara* tuvieron la misma concentración de carbono en diferentes formas químicas, tales como: vinagre comercial (TAP/AA 5%), sacarosa y ácido acético glacial (TAP), mostrando un metabolismo heterótrofo. No obstante, en *C. gloeopara* el mayor crecimiento se presentó en el tratamiento TAP/AA 5% debido a la biodisponibilidad del carbono en forma de ácido acético comercial, a otros nutrientes no identificados remanentes de la fabricación del ácido acético comercial y a la mezcla de nutrientes que contiene el medio TAP.

Tabla 8. Fuentes de carbono utilizada en los cultivos de microalgas.

Especie	Fuente de carbono y concentración	
<i>Chlorella vulgaris</i>	Glucosa (1 g/L)	Droop, 1974
<i>C. vulgaris</i>	Glucosa (5 g/L) sin luz	Martínez y Orús, 1991
<i>C. vulgaris</i>	Acetato (0.12g/L)	Endo <i>et al.</i> , 1977
<i>Chlorella protothecoides</i>	Glucosa (35 g/L)	Zhang <i>et al.</i> , 1999
<i>C. protothecoides</i>	Glucosa (40 g/L + NH ₄ , NO ₂ ⁻ o urea)	Shi <i>et al.</i> , 2000
<i>C. protothecoides</i>	Glucosa (10 g/L)	Xu <i>et al.</i> , 2006
<i>C. protothecoides</i>	Glucosa (200 g/L)	Li <i>et al.</i> , 2007
<i>C. protothecoides</i>	Glucosa (10 y 20 g/L)	Armendáriz-Galván, 2011
<i>Chlorella pyrenoidosa</i>	Glucosa y fructosa (0.1, 0.5, 1, 2 y 5 g/L)	Camacho-Rubio <i>et al.</i> , 1989
<i>C. pyrenoidosa</i>	Glucosa (35 g/L)	Ogbonna <i>et al.</i> , 1997
<i>C. pyrenoidosa</i>	Acetato (1 g/L)	Droop, 1974
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	Acetato (3.4 g/L)	Chen y Silflow, 1996
<i>C. reinhardtii</i>	Acetato (1.1 g/L)	Melis <i>et al.</i> , 2000
<i>Scenedesmus obtusus</i>	Acetato y bicarbonato	Chandrea <i>et al.</i> , 2016
<i>Ankistrodesmus convolutus</i>	Acetato, citrato y bicarbonato	Chu <i>et al.</i> , 1994
<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	Glucosa, glicerol y acetato	Liu <i>et al.</i> , 2009

Los resultados de crecimiento de *C. gloeopara* con el tratamiento TAP/AA 5% fue 19% superior al tratamiento TAP, siendo una alternativa en la sustitución del ácido acético más económica en el medio TAP.

Por otro lado, el crecimiento de *C. gloeopara* con la adición de sacarosa representó sólo el 1 % de lo obtenido con el tratamiento TAP. Aunado a esto, los altos costos de los diferentes azúcares limitan la viabilidad comercial de un cultivo empleando este tipo de fuentes de carbono. Otros autores reportan el uso de azúcares como la glucosa en cultivos de *Chlorella protothecoides* con resultados de crecimiento poco satisfactorios (Armendáriz-Galván, 2011). Este efecto negativo de la glucosa sobre el crecimiento de las microalgas se debe a su capacidad de reducir la fijación del CO₂ en especies como *Chlorella* sp. VJ79 (Lalucat *et al.*, 1984) y en *Chlorella vulgaris* (Martínez y Orús, 1991). Además, la glucosa reprime la producción de O₂, mediante la degradación de la proteína del centro de reacción (D1) del PSII y provoca la disminución de la enzima ribulosa-1,5-

bisfosfato carboxilasa / oxigenasa (Rubisco) en el Ciclo de Calvin (Steinmüller y Zetsche 1984; Oesterhelt *et al.*, 2007).

Por tanto, para *C. gloeopara* las fuentes orgánicas como glucosa, fructosa, maltosa y glicerol pueden tener un efecto negativo sobre la maquinaria fotosintética, limitar el crecimiento y no son adecuadas para el propósito de la presente investigación.

Por otro lado, los resultados obtenidos en el presente ensayo con *S. obliquus* en el tratamiento con sacarosa fueron positivos y contrastante con los obtenidos en *C. gloeopara*. Chu *et al.* (1994), reportaron en *Ankistrodesmus convolutus* resultados tanto positivos como negativos en el crecimiento de microalgas empleando glucosa, citrato y bicarbonato como fuente de carbono. En el presente ensayo, aunque los resultados de crecimiento de *S. obliquus* en el tratamiento con sacarosa no fueron similares a los del tratamiento control TAP, se observó una tendencia de crecimiento comparable a lo obtenido con el medio TAP. Contrario a la mayoría de las investigaciones, se ha reportado que la adición de glucosa (10 g/L) al medio de cultivo de *Chlorella protothecoides* resulta en una alta producción de biomasa y una mayor acumulación de lípidos en las células para la obtención de biodiesel en un fermentador (Miao y Wu, 2004). Este resultado pudo ser debido a la capacidad de *Chlorella protothecoides* para utilizar sustratos orgánicos para su crecimiento.

La producción de H₂ (Etapa II) en este bioensayo con *C. gloeopara* y *S. obliquus* sólo se logró en el tratamiento TAP desde el día 1. Durante la inducción a la producción de H₂, el catabolismo anaerobio de los sustratos orgánicos derivados de los carbohidratos almacenados durante el crecimiento, proporcionan electrones a la ruta de la Fe-H₂asa (Gibbs *et al.*, 1986). En *Chlamydomonas* se ha reportado que la producción de H₂ se estimula y aumenta por la presencia de acetato en el medio de cultivo (Happe *et al.*, 1994), lo cual coincide con lo encontrado en la presente investigación.

Por el contrario, con el resto de los tratamientos Sacarosa y TAP / AA 5% no se logró producir H₂. Es posible que estos medios de cultivo no fueran adecuados para el crecimiento y la acumulación de carbohidratos totales en *C. gloeopara* y *S. obliquus* o no se logró la inactivación de PSII y la transición a la anaerobiosis para activar la expresión de la enzima Fe-H₂asa y la producción de H₂ (Timmins *et al.*, 2009).

La producción de H₂ está relacionada con la acumulación de carbohidratos totales y su catabolismo (Melis *et al.*, 2000). En la presente investigación, la mayor concentración de carbohidratos totales en *C. gloeopara* y *S. obliquus* se presentó en el tratamiento TAP y a pesar de haber utilizado sacarosa como fuente de carbono, está no apporto beneficios al crecimiento, almacenaje de carbohidratos y producción de H₂. Por tanto, la adición de sacarosa o ácido acético comercial no son aportes indicados para la producción de H₂. No obstante, la fisiología de cada especie es particular y es fundamental investigar las diferentes variables ambientales, las fuentes de carbono y las combinaciones con la finalidad de incrementar la biomasa y la producción de H₂.

7.3. Producción de H₂ mediante la reducción del O₂ fotosintético en el cultivo de las microalgas *Chlamydomonas gloeopara* y *Scenedesmus obliquus*

La cinética de crecimiento de *C. gloeopara* y *S. obliquus* en presencia de los cuatro agentes reductores (ácido ascórbico, cisteína, sulfito de sodio e hidroquinona) se vio afectada en diferentes grados. En orden descendente, los principales inhibidores para *C. gloeopara* y *S. obliquus* fueron hidroquinona, ácido ascórbico y sulfito de sodio. En contraste, en los cultivos de microalgas con cisteína las densidades celulares fueron similares a las densidades presentadas en el tratamiento control sin agente reductor (medio TAP). Cabe señalar que la densidad celular de *C. gloeopara* y *S. obliquus* aumentó en los cultivos con la concentración más alta de cisteína (8.3 mmol/L). La cinética de crecimiento de las microalgas se vio influenciada positivamente por la adición de cisteína, que puede ser utilizada por las microalgas como un antioxidante, capaz de secuestrar las especies reactivas de oxígeno (reactive oxygen species, ROS) o como una fuente de nutrientes (nitrógeno y azufre). Se ha reportado el uso de 1 mmol/L de cisteína presentó un efecto protector sobre el estrés oxidativo en las células de las cianobacterias y las protegió del fotoblanqueamiento y de daños en el aparato fotosintético a causa de las ROS producto de la sobre exposición a la radiación UV-B, con lo cual se logró de esta forma que el cultivo fuera capaz de mantener su crecimiento (He y Häder, 2002).

Además del uso de la cisteína en cultivos de microalgas, se ha estudiado la adición de otros aminoácidos, tales como glicina y triptófano en cultivos de microalgas con efectos positivos sobre el crecimiento (Cucchiari *et al.*, 2008). Estos aminoácidos sirven como una fuente de nitrógeno para la síntesis de proteínas y ácidos nucleicos, con un efecto positivo sobre el crecimiento. En la presente investigación se observó este efecto positivo sobre la densidad celular de *C. gloeopara* y *S. obliquus* con la mayor concentración de cisteína (8.3 mmol/L). Este mismo efecto positivo de la cisteína sobre el crecimiento fue reportado por Gumiński *et al.* (1983) en 3 especies de Chlorophyceae: *Scenedesmus quadricauda*, *Chlorella pyrenoidosa* y *Ankistrodesmus acicularis*, donde la cisteína fue usada como agente reductor. También la cisteína es utilizada por las microalgas como fuente de azufre para cofactores enzimáticos con efecto positivo en el crecimiento (South

y Whittick, 1987). La cisteína, es fundamental en el metabolismo de las microalgas, es la primera molécula con azufre comprometida en el metabolismo de las plantas y es el donante de sulfuro en la síntesis de metionina, glutatión, fitoquelatinas, en las agrupaciones de hierro-azufre, vitaminas, cofactores enzimáticos y diversos metabolitos secundarios. La cisteína también regula la expresión y síntesis de muchas proteínas (Carfagna *et al.*, 2011). Por lo tanto, la cisteína tuvo varias funciones en el cultivo de *C. gloeopara* y *S. obliquus* debido a su composición química y proporcionó una fuente adicional de nitrógeno, azufre y carbono que aumentó el crecimiento.

En este estudio, el sulfito de sodio inhibió el crecimiento de *C. gloeopara* y de *S. obliquus* sólo a la concentración más alta (95%). Una concentración similar de sulfito de sodio (~ 8 mmol/L) redujo el contenido de O₂ disuelto en cultivos de *S. obliquus*, pero pudo afectar la formación de la Fe-H₂asa (Hartman y Krasna, 1963). El sulfito de sodio es ampliamente utilizado para inhibir el crecimiento de bacterias, hongos y levaduras en los alimentos, debido a que inhibe las actividades de varias enzimas y vitaminas. Se ha reportado que el uso de sulfito en cultivos de microalgas, es capaz de inhibir o promover el crecimiento dependiendo de la especie y la concentración evaluada. En los cultivos de *S. obliquus* con tiosulfato de sodio, el crecimiento disminuyó a concentraciones que oscilaron entre 2 a 9.5 mmol/L (Mandal y Mallick, 2009). Estos resultados son similares a los encontrados en el presente estudio con *C. gloeopara*, en donde concentraciones tan bajas como 0.04 mmol/L suprimieron el crecimiento (17%). Por otro lado, el tiosulfato de sodio no inhibió el crecimiento de cultivos de *Chlorella* sp. en concentraciones de 2.5 y 5.0 mmol/L, *Chlorella sorokiniana* en 63 mmol/L (Feng *et al.*, 2005; Ngangkham *et al.*, 2012) y la diatomea *Phaeodactylum tricornutum* a una alta concentración de 2,500 mmol/L (Acién-Fernández *et al.*, 2003).

En la presente investigación, el ácido ascórbico inhibió el crecimiento de *C. gloeopara* y de *S. obliquus* en las concentraciones media y alta, 5.0 mmol/L y 10.2 mmol/L, respectivamente. En los cultivos de *Anabaena* sp., 1 mmol/L de ácido ascórbico revirtió el estrés oxidativo, protegió a los lípidos de la oxidación y evito el fotoblanqueamiento de las clorofilas y sin inhibición del crecimiento (He y Häder, 2002). La inhibición del crecimiento en el presente estudio de *C. gloeopara* y *S. obliquus* por el ácido ascórbico

en concentraciones medias y altas podría atribuirse a cambios en el pH del medio de cultivo (pH de 6.9 y 6.8, respectivamente). La concentración baja de ácido ascórbico originó un pH por encima de 7 en los cultivos de microalgas sin afectar negativamente el crecimiento ni disminuir la concentración de O₂ disuelto en los cultivos de *C. gloeopara* y *S. obliquus*. La mayoría de las especies de microalgas crecen a pH de neutro a básico (6.5-11.0) y el pH afecta a muchos procesos, tales como la fotosíntesis, la permeabilidad de la membrana plasmática, el equilibrio de las especies de carbono (CO₂, HCO₃⁻ y CO₃⁼) y en consecuencia el crecimiento de las microalgas (Bartley *et al.*, 2013). El crecimiento de *S. obliquus* es dependiente del pH y mostró que es un microorganismo neutrófilo con tolerancia similar a valores de pH ácidos y básicos (Hodaifa *et al.*, 2009). Las células de *Chlamydomonas* son tolerantes a pH de 3.4 a 8.4, con un crecimiento óptimo en pH 7.4, similares a los encontrados en este ensayo.

La hidroquinona inhibió completamente el crecimiento de *C. gloeopara* en todas las concentraciones. Las especies de cianobacterias (*Synechocystis* sp., *Mycrocystis aeruginosa* y *Nostoc* sp.) son mucho más sensibles a la hidroquinona (0.55 a 6.5 mmol/L) que las especies eucariotas (*Monoraphidium braunii*, *Scenedesmus armatus*, *Scenedesmus quadricauda* y *Pseudokirchneriella subcapitata*) en concentraciones de 17 a 167 mmol/L. El crecimiento de *S. obliquus* sólo se observó en la concentración baja (0.09 mmol/L), experimentando un retraso en el crecimiento exponencial (de 50 a 120 h; Figura 22). Sin embargo, el cultivo de *S. obliquus* llegó a la misma densidad celular que el tratamiento control sin hidroquinona después de 120 h. La resistencia de *S. obliquus* a la menor concentración de hidroquinona podría ser debida a su tolerancia y a su capacidad para degradar grupos fenólicos (Klekner y Kosaric, 1992). La inhibición del crecimiento en la concentración media y alta podría ser debido a la auto-oxidación de los polifenoles y a la producción resultante de radicales libres (Nakai *et al.*, 2001). Además, los cultivos con hidroquinona se tornaron de un color oscuro que impidió el paso de la luz a través del medio de cultivo, creando condiciones desfavorables para el crecimiento de las microalgas. El color oscuro ocasionado por la hidroquinona tuvo una relación directamente con la concentración en los medios de cultivo para ambas especies. El uso de hidroquinona en este estudio estaba relacionado con su capacidad para eliminar el O₂

disuelto en el agua. La hidroquinona puede eliminar en tan sólo unas horas el 97% del O₂ disuelto en sistemas de calefacción mecánicos (Kerst, 1981). Sin embargo, la hidroquinona afectó adversamente el crecimiento de ambas especies, principalmente *C. gloeopara*, posiblemente debido a su alta concentración y el color oscuro que proporcionó al medio de cultivo. Aunque se ha reportado que la hidroquinona es capaz de secuestrar O₂ en el agua (Muccitelli, 1985), no redujo el O₂ disuelto en el medio de cultivo de las microalgas a los niveles deseados para obtener la expresión de la Fe-H₂asa y la producción de H₂.

7.3.1. Inducción anaerobia para la producción de H₂

Diversos mecanismos inducen la producción de H₂ en cultivos de microalgas, el más exitoso ha sido separar la fotosíntesis oxigénica de la producción de H₂ anaerobia bajo la privación de azufre en el medio. El objetivo principal de esta sección, es el consumo rápido de O₂ en los cultivos, resultando en la mejora de la actividad de la Fe-H₂asa y la inducción anaerobia de la enzima, lo que conduce a la mejora de la producción de H₂. Durante la inducción anaerobia para la producción de H₂ en los cultivos de *C. gloeopara* y *S. obliquus* con el medio TAP, la concentración de O₂ fotosintético en el espacio gaseoso aumentó durante la incubación. Además, se detectaron pequeñas cantidades de H₂, lo que indica la presencia de zonas anaerobias en el cultivo, similar a la reportada en las especies de algas verdes marinas y dulceacuícolas (Skjånes *et al.*, 2008). Los resultados obtenidos en medio TAP sin azufre con *C. gloeopara* y *S. obliquus*, se atribuyen a la exposición de las microalgas al estrés nutricional, causando una disminución gradual en su metabolismo y la falta de producción de energía (ATP), que culminó en la muerte celular después de varios días como ha sido descrito por otros autores para *C. reinhardtii* (Tamburic *et al.*, 2011; Tamburic *et al.*, 2012).

Además de las funciones metabólicas esenciales que se pierden debido al agotamiento del azufre y el cambio en el metabolismo, las microalgas acumulan productos tóxicos de fermentación en el medio de cultivo, tales como formiato y etanol, que son derivados de la glucólisis (Kosourov *et al.*, 2005). También, en el medio TAP libre de azufre, los

carbohidratos no se consumieron por completo, a pesar de que se esperaba que se utilizaran como fuente de electrones para la producción de H₂ por fotólisis indirecta, ya que son parte esencial para la biofotólisis indirecta (Prince y Kheshgi, 2005).

Cuando el O₂ fotosintética se agotó, el consumo de carbohidratos totales en los cultivos de *S. obliquus* fue 4 veces mayor que en el medio sin azufre. Este valor coincide con una mayor producción de H₂. Por el contrario, la privación de azufre inhibe de forma reversible el PSII y la fotosíntesis oxigénica, debido a la falta de regeneración de la proteína D1 (Kosourov *et al.*, 2005), mientras que la respiración mitocondrial se mantiene sin cambios. Por lo tanto, el O₂ se consume y se establece el metabolismo fotosintético anaerobio (Melis *et al.*, 2000), en él que Fe-H₂asa sensible al O₂ se expresa. La privación de azufre mantuvo la producción de H₂ en los cultivos de *C. reinhardtii* durante 120 h (Timmins *et al.*, 2009), después de lo cual hay efectos negativos sobre el metabolismo de las microalgas, porque ya no se produce ATP, lo que provoca la muerte celular a menos que se añada nuevamente azufre (Laurinavichene *et al.*, 2002). Bajo estas condiciones, el almidón y las proteínas endógenas almacenadas se consumen y los electrones que se liberan son utilizados por Fe-H₂asa para formar H₂ (fotólisis indirecta) (Melis *et al.*, 2000; Zhang *et al.*, 2002). En el presente bioensayo la disminución del O₂ por medio de la adición de cisteína mejoró significativamente la acumulación de H₂, el crecimiento y el consumo de carbohidratos en *C. gloeopara* y *S. obliquus*. Para *C. gloeopara*, la acumulación de H₂ mediante fotólisis indirecta fue de 6.7 pmol, y se consumieron un total de 17.5 g de carbohidratos/10⁶ células. Con el tratamiento con cisteína, fueron consumidos 26.7 g de carbohidratos/10⁶ células; por lo tanto, se esperaría una acumulación de H₂ de 10.2 pmol a través de la fotólisis indirecta. En contraste, la cantidad de H₂ que se acumuló fue de 23.4 pmol y que representa un mayor rendimiento en 229%. Debido a que la fotosíntesis no fue inhibida en los tratamientos con cisteína, la fotólisis del agua pudo suministrar electrones a la Fe-H₂asa. Parece que la fotólisis directa e indirecta estuvieron activas en los tratamientos con cisteína, lo que originó un incremento en la producción de H₂.

En este estudio, las tasas de producción de H₂ con *S. obliquus* cuando el O₂ fotosintético disminuyó fueron mayores que los reportados para *C. reinhardtii* y *S. obliquus* por Winkler

et al. (2002), quienes encontraron que *S. obliquus* no tenía actividad de la Fe-H₂asa en un medio libre de azufre; además no detectaron H₂ en la fase gaseosa de los cultivos sellados.

El uso de agentes reductores químicos que eliminen el O₂ del medio de cultivo demostró que es posible lograr la anaerobiosis y por lo tanto la expresión y actividad de la Fe-H₂asa reconciliando ambos procesos (la producción de H₂ y la generación de O₂ fotosintética) sin privar a las células de azufre, lo que causa la muerte de las células por el estrés nutricional. En esta sección de la investigación, se extendió la vida productiva de los cultivos de microalgas y la fotosíntesis oxigénica. El catabolismo de carbohidratos endógenos proporcionó los electrones suficientes a la Fe-H₂asa para así mejorar la producción de H₂. Este es un resultado relevante en el área y la publicación de estos resultados mostró por primera vez que el proceso puede conciliarse con la adición de un agente reductor químico y/o biológico.

Sin embargo, el uso de cisteína como agente reductor en cultivos de mayor volumen no es económicamente viable, debido a su alto costo (Das y Veziroglu, 2008). El consumo de O₂ en una escala mayor se podría lograr con cocultivos de bacterias y microalgas que mejoren la producción de H₂, tales como: *C. reinhardtii* con *Stenotrophomonas*, *Microbacterium* y *Pseudomonas* (Li *et al.*, 2013), *Chlamydomonas* sp. MACC-549 y cc124 *C. reinhardtii* con *Brevundimonas*, *Rhodococcus* y *Leifsonia* (Lakatos *et al.*, 2014), y *C. reinhardtii* y *Bradyrhizobium japonicum* (Wu *et al.*, 2012).

Sin embargo, estos cocultivos deben caracterizarse para seleccionar los organismos con interacciones biológicas positivas que garanticen una simbiosis. En un cocultivo ideal entre bacterias y microalgas: se debe esperar que las bacterias consuman el O₂ producido por microalgas y los metabolitos producidos en su metabolismo anaerobio, mientras que las microalgas podrían utilizar el CO₂ producido por bacterias como fuente de carbono. Actualmente, las relaciones entre las bacterias y microalgas para la producción de H₂ no son claras, por ejemplo, hace falta estudiar: como afectara al cultivo la densidad de cada microorganismo; el tipo y la dinámica de los metabolitos producidos por ambos organismos; la excreción de los desechos tóxicos de ambos organismos; la competencia por los nutrientes y las interacciones en el largo plazo de ambos

organismos. La comprensión de estas interacciones permitirá el control y la optimización de la producción de H₂. El uso de un agente reductor químico evita la interferencia de variables presentes en un cocultivo, demostrando que es posible producir H₂ utilizando secuestradores de O₂. Este trabajo proporciona la base para nuevas investigaciones sobre bacterias consumidoras de O₂, que no inhiban el crecimiento de las microalgas y que aumenten la producción H₂ a través del consumo de O₂ fotosintético.

7.3.2. Inducción anaerobia para la producción de H₂ en *Scenedesmus obliquus* empleando una especie de bacteria

El uso de cultivos con dos o más especies también llamados cocultivos, son utilizados para la producción de H₂ ofrecen la ventaja de una mayor producción H₂ en comparación con un monocultivo. El concepto de un cocultivo es la mezcla de diferentes cepas microbianas para mejorar las propiedades individuales de que carece la otra cepa (Pachapur *et al.*, 2015a). Los cocultivos para la producción de H₂ se realizan con bacterias principalmente y ofrecen varias ventajas, como: reducción de la fase de acondicionamiento; resistencia a las fluctuaciones ambientales; y estabilidad en la tasa de producción de H₂, que puede llegar a ser hasta ocho veces mayor en comparación con lo obtenido en un monocultivo (Pachapur *et al.*, 2015b; Bao *et al.*, 2016).

En la presente investigación, en el ensayo “inducción anaerobia de la producción de H₂ en *S. obliquus* empleando una especie de bacteria”, utilizada como agente reductor, el crecimiento en el tratamiento de *S. obliquus* + la bacteria aislada no se vio afectado al principio del ensayo por la interacción entre ambas especies. El tratamiento de *S. obliquus* + la bacteria aislada, presentó una tasa de crecimiento exponencial con *S. obliquus* más rápida que el resto de los tratamientos, pero con una fase de muerte a partir del día tres. Por su parte, el crecimiento bacteriano mantuvo su crecimiento exponencial hasta el final del ensayo, lo que coincidió con el descenso en crecimiento de *S. obliquus*. A pesar que la especie de bacteria utilizada en este ensayo fue aislada de un cultivo de *S. obliquus*, es posible que estas bacterias compitieran por los nutrientes del medio y/o

produjeran algún metabolito capaz de inhibir el crecimiento de *S. obliquus* después del día tres mediante inhibidores bacterianos (Hibbing *et al.*, 2010; Dobretsov *et al.*, 2011).

Se han realizado estudios donde se ha utilizado un cocultivo entre especies de microalgas y bacterias con el objetivo de optimizar la fijación de carbono y la producción de lípidos (Zhao *et al.*, 2014), floculantes, producción de biogás (Wieczorek *et al.*, 2015), producción de metano bacteria (Frigon *et al.*, 2013; Hernández *et al.*, 2013).

Sin embargo, sólo existe un trabajo de cocultivos donde se involucren microalgas enfocadas en la producción de H₂ y bacterias como agentes reductores. Li *et al.* (2013), fueron capaces de aislar tres especies de bacterias de los géneros *Stenotrophomonas*, *Microbacterium* y *Pseudomona* a partir de cultivos de *C. reinhardtii* contaminados, demostrando que la concentración bacteriana no afectó el crecimiento de la microalga y mejoró significativamente la producción de H₂ a través del aumento de la tasa de respiración y el consumo de O₂.

A pesar que, en la presente investigación no se logró determinar H₂ en el tratamiento de *S. obliquus* + la bacteria aislada, si fue evidente un descenso en la concentración de O₂ el día uno a pesar que *S. obliquus* se encontraba en crecimiento exponencial produciendo O₂. Este descenso en el O₂ abre la posibilidad que al utilizar un mayor inóculo de bacteria se pueda tener una concentración < 100 pmol de O₂, que induzca la expresión de la Fe-H₂asa y la fotoproducción anaerobia de H₂. Sin embargo, hace falta aún investigación para determinar el inóculo inicial adecuado de microalga-bacteria, la especie bacteriana para cada especie de microalga y las condiciones ambientales idóneas para el cocultivo. También es necesario que se explore el uso de consorcios microbiano mixtos (Hernández *et al.*, 201, Chen *et al.*, 2015), donde varias cepas microbianas ejerzan efectos sinérgicos entre ellas y con las microalgas, que produzcan metabolitos secundarios de fácil aprovechamiento por las microalgas y que sean capaces de incorporar los metabolitos de desechos de las microalgas.

En la presente investigación la producción de H₂ se logró bajo dos condiciones de cultivo: heterotrófica (medio TAP) y autotrófica (medio "f"). Sin embargo, en general el mayor crecimiento y la mayor producción de H₂ se observó bajo la condición heterótrofa como

se ha reportado anteriormente (Kosourov *et al.*, 2007; Heifetz *et al.*, 2000). Además, el uso de la menor irradiancia, 100 $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$, dio como resultado una relación inversa entre la irradiancia con respecto al crecimiento microalgal producción de H_2 . Esta relación inversa fue causada por la fotoinhibición y/o fotodaño debido a la exposición a irradiancias elevadas (Matsuda *et al.*, 2002). Por su parte, el uso de una fuente alterna de carbono no proporcionó una mayor producción de H_2 , por lo cual el medio heterótrofo TAP y 100 $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$ fueron la base para la producción de H_2 en esta investigación. En general, estas condiciones de cultivo favorecieron la producción de carbohidratos, que son un elemento importante en la producción de H_2 . Se ha reportado que el incremento en la producción de H_2 en cultivos de microalgas coincide con la oxidación de sustratos orgánicos, como los carbohidratos (Tsygankov *et al.*, 2002; Laurinavichene *et al.*, 2004). El medio de cultivo TAP empleado en esta investigación, favorece la acumulación de carbohidratos debido a la disponibilidad del acetato (Tsygankov *et al.* 2006). Después estos carbohidratos son catabolizados y aportan un flujo adicional de electrones para la enzima Fe- H_2 asa. De esta manera es posible tener dos fuentes de electrones, como la fotólisis del agua y el catabolismo de los carbohidratos (Zhang *et al.*, 2002; Kosourov *et al.*, 2007; Melis, 2007), para lograr una mayor cantidad de H_2 .

La producción de H_2 se realiza mediante el protocolo de privación de azufre propuesto por Melis *et al.* (2000), lo que provoca que la tasa de respiración celular sobrepase la tasa de fotosíntesis. Sin embargo, esto causa afectaciones en el resto del metabolismo celular, debido a: la inactividad en la producción de proteínas; por la afectación en los centros de reacción del PSII (Grewe *et al.*, 2014); la disminución de la capacidad fisiológica de las células para reproducirse (Chisti, 2007); y se detiene la biosíntesis de cisteína y metionina esenciales para la síntesis de proteínas lo que conlleva a la muerte del cultivo después de unos días por estrés nutricional (Tamburic *et al.*, 2011; Tamburic *et al.*, 2012). De tal forma, que es necesario desarrollar una estrategia para evitar el menor estrés posible a las microalgas con la mayor producción de H_2 .

En esta investigación, la cisteína se utilizó como agente reductor químico, con la capacidad para eliminar el O_2 del medio de cultivo. Se demostró que, es posible lograr la anaerobiosis y por lo tanto la expresión y actividad de la Fe- H_2 asa reconciliando ambos

procesos (la producción de H₂ y la generación de O₂ fotosintética) sin privar a las células de azufre. Además, la cisteína pudo contrarrestar los efectos negativos del protocolo de privación de azufre para la producción de H₂. Además, la cisteína tiene efectos positivos sobre las microalgas, ya que puede ser usada como fuente de azufre para cofactores enzimáticos con efecto positivo en el crecimiento (South y Whittick, 1987), en la síntesis de metionina, glutatión, fitoquelatinas, en las agrupaciones de hierro-azufre, vitaminas, cofactores enzimáticos, diversos metabolitos secundarios y regula la expresión y síntesis de muchas proteínas (Carfagna *et al.*, 2011). Por lo tanto, la cisteína tuvo varias funciones positivas sobre la fisiología de las células de *S. obliquus*.

Sin embargo, el uso de cisteína como agente reductor en cultivos de mayor volumen no es económicamente viable, debido a su alto costo (Das y Veziroglu, 2008). Por lo tanto, es necesario desarrollar estrategias para llevar los cultivos a una escala mayor. Una alternativa podría ser el uso de cocultivos de bacterias y microalgas que mejoren la producción de H₂, tales como: *C. reinhardtii* con *Stenotrophomonas*, *Microbacterium* y *Pseudomonas* (Li *et al.*, 2013), *Chlamydomonas* sp. MACC-549 y cc124 *C. reinhardtii* con *Brevundimonas*, *Rhodococcus* y *Leifsonia* (Lakatos *et al.*, 2014), y *C. reinhardtii* y *Bradyrhizobium japonicum* (Wu *et al.*, 2012), todos con resultados prometedores.

No obstante, aún hace falta mucha investigación para obtener los organismos con interacciones biológicas positivas que garanticen una simbiosis, donde las bacterias consuman el O₂ producido por microalgas y los metabolitos producidos en su metabolismo anaerobio, mientras que las microalgas podrían utilizar el CO₂ producido por bacterias como fuente de carbono.

8. CONCLUSIONES

El uso de un medio de cultivo heterótrofo en la fase de producción de biomasa (Etapa I) favoreció el crecimiento, la síntesis de pigmentos y el peso seco en los cultivos de *S. obliquus*, *C. reinhardtii*, *C. gloeopara*, *C. mexicana*. Las cinco especies de microalgas estudiadas fueron capaces de producir H₂ en medio autótrofo (medio "F") y medio heterótrofo (medio TAP) sin azufre, con excepción de lo encontrado en *Chlorella vulgaris* que no produjo H₂ con el medio heterótrofo TAP.

La menor irradiancia evaluada (100 $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$) promovió los mejores resultados de crecimiento y producción de H₂ en cultivos con medio heterótrofo sin azufre para *C. gloeopara* y *S. obliquus* con 73.3 mL/L y 54 mL/L, respectivamente. Por su parte, la temperatura y la combinación de los factores de temperatura e irradiancia no mostraron influencia sobre los resultados sobre el crecimiento y producción de H₂.

Con los diferentes aportes de carbono orgánico evaluados en el medio de cultivo sólo se logró producir H₂ con el medio TAP con ácido acético grado reactivo en *C. gloeopara* y *S. obliquus* con 48 mL/L y 46 mL/L, respectivamente.

El uso de la cisteína como agente reductor no tuvo efectos inhibidores sobre el crecimiento de *S. obliquus* y *C. gloeopara*, fue capaz de mantener niveles menores al 4 % de O₂ por hasta 192 h en cultivos con medio heterótrofo con azufre de *C. gloeopara*. En los tratamientos de *S. obliquus* con cisteína se alcanzaron valores del 70% de O₂ disuelto. Estos porcentajes de O₂ disuelto se le atribuyeron al mayor crecimiento de *S. obliquus* en este tratamiento.

La adición de 1 g/L de cisteína en el medio heterótrofo de cultivo con azufre durante la Etapa II, permitió que las microalgas *C. gloeopara* y *S. obliquus* mantuvieron un crecimiento constante, un mejor estado fisiológico respecto al método con la privación de azufre y la producción de H₂ fue hasta 4 veces mayor que en los tratamientos donde sólo

se eliminó el azufre del medio. La adición de mayores concentraciones de 1 g/L de cisteína en los cultivos de *C. gloeopara* y *S. obliquus* no mejoró la producción de H₂.

La adición de una bacteria anaerobia facultativa al cultivo de *S. obliquus* con medio heterótrofo no logró mejorar el crecimiento y el consumo de O₂.

9. RECOMENDACIONES

- Realizar bioensayos con diferentes concentraciones de nitrógeno para estimular la mayor acumulación carbohidratos totales y su efecto sobre la producción de H₂ en medios heterótrofos libres de azufre y empleando agentes reductores.
- Estudiar la sobreproducción de carotenoides en *Chlorella vulgaris* al eliminar el azufre del medio heterótrofo de cultivo.
- Cuantificar la expresión del gen *HydA* que codifica para la enzima Fe-H₂asa durante la producción de H₂ en medio con azufre.
- Evaluar la producción de H₂ con microalgas empleando secuestradores de O₂ en biorreactores de mayor volumen.
- Evaluar diferentes secuestradores químicos de O₂ que no inhiban el crecimiento de las microalgas y que sean económicamente viables.
- Optimizar el cultivo de *C. mexicana* para la producción de H₂ empleando agentes reductores.
- Evaluar diferentes secuestradores de O₂ biológicos que sean capaces de coexistir y de utilizar los subproductos de las microalgas para su crecimiento.
- Realizar un sistema continuo de producción de H₂ con microalgas empleando un sistema mixotrófico con la inyección de CO₂ al medio de cultivo y el uso de un secuestrador de oxígeno biológico y/o químico.

10. Literatura citada

- Abalde, J., Herrero, C. 2004. Microalgas en acuicultura: calidad nutricional. *ALGAS* 32: 16-18.
- Aceves-Lara, C.A., Buffiere, P., Bernet, N., Steyer, J.P. 2007. Experimental determination by principal component analysis of a reaction pathway of biohydrogen production by anaerobic fermentation. *Chemical Engineering and Processing*. 47:1968-1975.
- Acién-Fernández, F.G., Brindley-Alias, C., Sánchez-Pérez, J.A., Fernández-Sevilla, J.M., Ibáñez-González, M.J., Molina, E. 2003. Production of ¹³C polyunsaturated fatty acids from the microalga *Phaeodactylum tricornutum*. *Journal Applied Phycology*. 15:229-237.
- Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Watson, J.D. 2002. *Biología molecular de la célula*. (3ta ed.) Ediciones Omega. Barcelona.
- Allen, J.F. 2003. State Transitions a question of balance. *Science*. 299:1530-1532.
- Álvarez-Velden, C.A. 2002. Evaluación técnico-económica de la obtención biotecnológica de gas hidrógeno. Universidad de Chile. Tesis De Licenciatura. 131 pp.
- Amutha, K.B., Murugesan, A.G. 2011. Biological hydrogen production by the algal biomass *Chlorella vulgaris* MSU 01 strain isolated from pond sediment. *Bioresource Technology*. 102:194-199.
- Anguiano-Beltrán, C. 1996. Patogenicidad de *Vibrio alginolyticus* sobre larvas del mejillón europeo *Mytilus galloprovincialis* y larvas y poslarvas de abulón rojo *Haliotis rufescens*. Tesis de maestría. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada. Ensenada, Baja California. 47 pp.
- Antal, T.K., Krendeleva, T.E., Laurinavichene, T.V., Makarova, V.V., Ghirardi, M.L., Rubin, A.B., Tsygankov, A.A., Seibert, M. 2003. The dependence of algal H₂ production on Photosystem II and O₂ consumption activities in sulfur-deprived *Chlamydomonas reinhardtii* cells. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1607:153-160.
- Arumugam, M., Agarwal, A., Arya, M.C., Ahmed, Z. 2013. Influence of nitrogen sources on biomass productivity of microalgae *Scenedesmus bijugatus*. *Bioresource Technology*. 131:246-249.
- Arellano, J.B., De Las Rivas, J. 2006. *Plantas y cambio climáticos*. Investigación y Ciencia. 254:42-49.

- Armendáriz-Galván, J.F. 2011. Producción de biodiesel por microalgas, como una estrategia de fuentes alternas de energía. Tesis de licenciatura. Instituto Politécnico Nacional. 127 pp.
- Asada, K. 2006. Production and scavenging of reactive oxygen species in chloroplasts and their functions. *Plant Physiology*. 141:391-396.
- Auinger, B.M., Pfandl, K., Boenigk, J. 2008. Improved methodology for identification of protists and microalgae from plankton samples preserved in lugol's iodine solution: combining microscopic analysis with single-cell PCR. *Applied and Environmental Microbiology*. 2505-2510.
- Bährs, H., Heinze, T., Gilbert, M., Wilhelm, C., Steinberg C. 2013. How p-benzoquinone inhibits growth of various freshwater phototrophs: different susceptibility and modes of actions?. *Annals of Environmental Science*. 7:1-15.
- Ball, S. G., Deschamps, P. 2008. Chapter 1- Starch Metabolism. 1-40. En: Harris, E. H. Stern, D. B. y Witman, G. B. *The Chlamydomonas Sourcebook*. Vol. 2. Second Edition. Elsevier Inc. Pag. 1071.
- Bao, H., Chen, C., Jiang, L., Liu, Y., Shen, M., Liu, W., Wang, A. 2016. Optimization of key factors affecting biohydrogen production from *microcrystalline cellulose* by the co-culture of *Clostridium acetobutylicum* X 9+ *Ethanoigenens harbinense* B 2. *RSC Advances*. 6(5):3421-3427.
- Bartley, M.L., Boing, W.J., Dungan, B.N., Holguin, F.O., Schaub, T. 2013. pH effects on growth and lipid accumulation of the biofuel microalgae *Nannochloropsis salina* and invading organisms. *Journal of Applied Psychology*. 26(3):1431-1437.
- Bayro-Kaiser, V., Nelson, N. 2016. Temperature-sensitive PSII: a novel approach for sustained photosynthetic hydrogen production. *Photosynthesis Research*. 1-9.
- Beckers, L., Hiligsmann, S., Hamilton, C., Masset, J., Thonart, P. 2010. Fermentative hydrogen production by *Clostridium butyricum* CWBI1009 and *Citrobacter freundii* CWBI952 in pure and mixed cultures. *Biotechnology, Agronomy, Society and Environment*. 14(S2):541-548.
- Behrens E.W. 2005. Photobioreactor and Fermentors: The light and the dark sides of the growing algae. En: Andersen, R. A. (Ed.). *Algal culturing techniques*. Phycological Society of America. Elsevier Academic Press, Amsterdam. pp. 189-203.
- Benemann, J. R. 1998. Process analysis and economics of biophotolysis of water. Hydrogen Program of the International Energy Agency. [http://ieahia.org/pdfs/Special-Reports/Report John Benneman Task-10 Process Analysis and .aspx](http://ieahia.org/pdfs/Special-Reports/Report%20John%20Benneman%20Task-10%20Process%20Analysis%20and%20.aspx)

- Ben-Shem, A., Frolow, F., Nelson, N. 2003. Crystal structure of plant Photosystem I. *Nature*. 426:630-635.
- Bermúdez, J.L., Lodeiros, C., Morales, E. 2002. Producción de biomasa de la microalga marina *Chroomonas* sp., en función del pH, intensidad luminosa y salinidad. *Boletín de Investigaciones Marinas y Costeras*. 31:167-182.
- Bermúdez, J.L., Sánchez, G.F.G., Morales, E. 2003. Efecto de la fuente de carbono sobre el crecimiento y producción de pigmentos de la microalga marina *Chroomonas* sp. *Ciencia*. 11(4):265-269.
- Camacho-Rubio, F., Martínez-Sanchez, M.E., Sánchez-Villasclaras, S. 1989. Contenido de clorofila en *Chlorella pyrenoidosa* durante el crecimiento heterotrófico sobre monosacaridos. *Afinidad*. XLVI(420):151-153.
- Carfagna, S., Salbitani, G., Vona, V., Esposito, S. 2011. Changes in cysteine and O-acetyl-l-serine levels in the microalga *Chlorella sorokiniana* in response to the S-nutritional status. *Journal of Plant Physiology*. 168:2188-2195.
- Carvalho, A.P., Monteiro, C.M., Malcata F.X. 2009. Simultaneous effect of irradiance and temperature on biochemical composition of the microalga *Pavlova lutheri*. *Journal of Applied Phycology*. 21(5):543-552.
- Çelekli, A., Dönmez, G. 2006. Effect of pH, light intensity, salt and nitrogen concentrations on growth and β -carotene accumulation by a new isolate of *Dunaliella* sp. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 22:183-189.
- Chader, S., Haceneb H, Agathos, S.N. 2009. Study of hydrogen production by three strains of *Chlorella* isolated from the soil in the Algerian Sahara. *International Journal of Hydrogen Energy*. 34:4941-4946.
- Chandrea, T.S., Deepaka, R.S., Maneesh K.M., Mukherjic, S., Chauhana, V.S., Saradaa, R., Mudliar, S.N. 2016. Evaluation of indigenous fresh water microalga *Scenedesmus obtusus* for feed and fuel applications: Effect of carbon dioxide, light and nutrient sources on growth and biochemical characteristics. *Bioresource Technology*. 207:430-439.
- Cheirsilp B., Torpee, S. 2012. Enhanced growth and lipid production of microalgae under mixotrophic culture condition: Effect of light intensity, glucose concentration and fed-batch cultivation. *Bioresource Technology*. 110:510-516.
- Chen, Q., Silflow, C.D. 1996. Isolation and characterization of glutamine synthetase genes in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiology*. 112(3):987-996.

- Chen, H.C., Newton, A.J., Melis, A. 2005. Role of SulP, a nuclear encoded chloroplast sulfate permease, in sulfate transport and H₂ evolution in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Photosynthetic Research*. 84:289-296.
- Chen, S., Pan, L., Hong, M., Lee, A. 2012. The effects of temperature on the growth of and ammonia uptake by marine microalgae. *Botanical Studies*. 53:125-133.
- Chen, P., Wang, Y., Yan, L., Wang, Y., Li, S., Yan, X., Wang, N., Liang N., Li, H. 2015. Feasibility of biohydrogen production from industrial wastes using defined microbial co-culture. *Biological research*. 48(1):1.
- Chisti, Y. 2007. Biodiesel from microalgae. *Biotechnology Advances*. 25:294-306.
- Chu, W.L., Phang, S.M., Goh, S.H., Blakebrough, N. 1994. Environmental effects on growth and biochemical composition of *Ankistrodesmus convolutus*. En: *Proceedings of the 1st Asia-Pacific Conference on Algal Biotechnology*, Ed. Phang SM, Kun LY, Borowitzka MA, Whitton BA. P. 16-27. Kuala Lumpur, Malaysia.
- Combe, C., Hartmann, P., Rabouille, S., Talec, A., Bernard, O., Sciandra A. 2015. Long-term adaptive response to high-frequency light signals in the unicellular photosynthetic eukaryote *Dunaliella salina*. *Biotechnology and Bioengineering*. 112(6):1111-1121.
- Combres, C., Laliberté, G., Reyssac, J., De La Noue, J. 1994. Effect of acetate on growth and ammonium uptake in the microalga *Scenedesmus obliquus*. *Physiologia Plantarum*. 91:729-734.
- Contreras-Flores., C., Peña-Castro, J.M., Flores-Cotera, L.B. 2003. Avances en el diseño conceptual de fotobiorreactores para el cultivo de microalgas. *Interciencia*. 8:450-456.
- Cucchiari, E., Guerrini, F., Penna, A., Totti, C., Pistocchi, R. 2008. Effect of salinity, temperature, organic and inorganic nutrients on growth of cultured *Fibrocapsa japonica* (Raphidophyceae) from the northern Adriatic Sea. *Harmful Algae*. 7(4):405-414.
- Das, D., Veziroglu, T.N. 2001. Hydrogen production by biological processes: a survey of literatura. *International Journal of Hydrogen Energy*. 26:13-28.
- Das, D., Veziroglu T.N., 2008. Advances in biological hydrogen production processes. *International Journal of Hydrogen Energy*. 33(21):6046-6057.
- Dawson, S.C., Pace, N.R. 2002. Novel kingdom-level eukaryotic diversity in anoxic environments. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 99(12):8324-8329.
- Davey, M.W., Montagu, M.V., Inze, D., Sanmartin, M., Kanellis, A., Smirnoff N. 2000. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 80:825-860.

- Degrenne B., Pruvost, J., Christophe G., Cornet J.F., Cogne G., Legrand, J. 2010. Investigation of the combined effects of acetate and photobioreactor illuminated fraction in the induction of anoxia for hydrogen production by *Chlamydomonas reinhardtii*. *International Journal of Hydrogen Energy*. 35:10741-10749.
- De Marsac, N.T., Houmard, J. 1993. Adaptation of cyanobacteria to environmental stimuli: new steps towards molecular mechanisms. *FEMS microbiology reviews*. 10(1-2):119-189.
- Demeter, S., Janda, T., Kovacs, L., Mende, D., Wiessner, W. 1995. Effects of in vivo CO₂-depletion on electron transport and photoinhibition in the green algae, *Chlamydomonas stellate* and *Chlamydomonas reinhardtii*. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1229:166-174.
- Dobretsov, S., Teplitski, M., Bayer, M., Gunasekera, S., Proksch, P., Paul, V. J. 2011. Inhibition of marine biofouling by bacterial quorum sensing inhibitors. *Biofouling*. 27(8):893-905.
- Dragone, G., Fernandes, B.D., Abreu, A.P., Vicente, A.A., Teixeira, J.A. 2011. Nutrient limitation as a strategy for increasing starch accumulation in microalgae. *Applied Energy*. 88:3331-3335.
- Droop, M.R. 1974. Heterotrophy of carbon. En: Stewart, W.D.P. (Eds.), *Algal Physiology and Biochemistry*. Blackwell, Oxford, pp. 530-559.
- Dubinsky, Z., Stambler, N. 2009. Photoacclimation processes in phytoplankton: mechanisms, consequences, and applications. *Aquatic Microbial Ecology*. 56(2-3):163-176.
- Dubois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A., Smith, F. 1956. Colorimetric method for the determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry*. 18:350-356.
- Dutta, D., De, D., Chaudhuri, S., Bhattacharya, S.K. 2005. Hydrogen production by Cyanobacteria. Review. *Microbial Cell Factories*. 4:36-44.
- Dyall, S.D., Yan, W., Delgadillo-Correa, M.G., Lunceford, A., Loo, J.A., Clarke, C.F. Johnson, P.J. 2004. Non-mitochondrial complex I proteins in a hydrogenosomal oxidoreductase complex. *Nature*. 431:1103-1107.
- Edwards, B. 2008. *Guía básica de la sostenibilidad*. (1ra ed.) Editorial G. Gili. Barcelona.

- Endo, H., Sansawa, H., Nakajima, K. 1977. Studies on *Chlorella regularis*, heterotrophic fast-growing strain II. Mixotrophic growth in relation to light intensity and acetate concentration. *Plant and cell physiology*. 18(1):199-205.
- Erickson, E., Wakao, S., Niyogi, K. K. 2015. Light stress and photoprotection in *Chlamydomonas reinhardtii*. 82(3):449-465.
- Eroglu, E., Melis, A. 2011. Photobiological hydrogen production: Recent advances and state of the art. *Bioresource Technology*. 102:8403-8413.
- Feng, F.Y., Yang, W., Jiang, G.Z., Xu, Y.N., Kuang, T.Y. 2005. Enhancement of fatty acid production of *Chlorella* sp. (Chlorophyceae) by addition of glucose and sodium thiosulphate to culture medium. *Process Biochemistry*. 40:1315-1318.
- Fierro, J.L. G., La Parola, V., Thomas, S., Guil-López, R., Navarro, R.M. 2003. Producción de hidrógeno a partir del gas natural sin emitir dióxido de carbono. *Energética*. 03:67-70.
- Figueroa, L.F., Mercado, J., Jiménez, C., Salles, S., Aguilera, J., Sánchez-Saavedra, M.P., Lebert, M, Hader, D.P., Montero, O., Lubián, L. 1997. Relationship between bio-optical characteristics and photoinhibition of phytoplankton. *Aquatic Botany*. 59(3):237-251.
- Fogg, G.E., Thake, B.J. 1987. *Algal Cultures and Phytoplankton Ecology*. University of Wisconsin Press. London.
- Forestier, M., King, P., Zhang, L., Posewitz, M., Schwarzer, S., Happe, T., Ghirardi, M.L., Seibert, M. 2003. Expression of two [Fe]-hydrogenases in *Chlamydomonas reinhardtii* under anaerobic conditions. *European Journal of Biochemistry*. 270:2750-2758.
- Fouchard, S., Hemschemeier, A., Caruana, A., Pruvost, J., Legrand J., Happe, T., Peltier, G., Cournac, L. 2005. Autotrophic and mixotrophic hydrogen photoproduction in sulfur-deprived *Chlamydomonas* cells. *Applied and Environmental Microbiology*. 71(10):6199-6205.
- Frigon, J.C., Matteau-Lebrun, F., Abdou, R.H., McGinn, P.J., O'Leary, S.J., Guiot, S.R. 2013. Screening microalgae strains for their productivity in methane following anaerobic digestion. *Applied Energy*. 108:100-107.
- García-González, M; Moreno, J; Manzano, J.C; Florêncio, F.J; Guerrero, M.G. 2005. Production of *Dunaliella salina* biomass rich in 9-cis- β -carotene and lutein in a closed tubular photobioreactor. *Journal of Biotechnology*, 115:81-90.

- Ghirardi, M.L., Zhang, L., Lee, J.W., Flynn, T., Seibert, M., Greenbaum, E. 2000. Microalgae: a green source of renewable H₂. *Trends. Biotechnology*. 18:506-511.
- Gibbs, M., Gfeller, R.P., Chen, C. 1986. Fermentative Metabolism of *Chlamydomonas reinhardtii*. III. Photoassimilation of acetate. *Plant Physiology*. 82:160-166.
- Giordano, M., Raven, J.A. 2014. Nitrogen and sulfur assimilation in plants and algae. *Aquatic Botany*. 118:45-61
- Godaux, D., Emonds-Alt, B., Berne, N., Ghysels, B., Alric, J., Remacle, C., Cardol, P. 2013. A novel screening method for hydrogenase-deficient mutants in *Chlamydomonas reinhardtii* based on in vivo chlorophyll fluorescence and photosystem II quantum yield. *International Journal of Hydrogen Energy*. 38(4):1826-1836.
- Graves, D.A, Tevault, C.V., Greenbaum E. 1989. Control of photosynthetic reductant: the role of light and temperature on sustained hydrogen photoevolution by *Chlamydomonas* sp. in an anoxic, carbon dioxide-containing atmosphere. *Photochemistry and Photobiology*. 50(4):571-576.
- Guan, Y.F., Deng, M.C., Yu, X.J., Zhang, W. 2004. Two-stage photobiological production of hydrogen by marine green alga *Platymonas subcordiformis*. *Biochemical Engineering Journal*. 19:69-73.
- Giordano, M., Norici, A., Hell, R. 2005. Sulfur and phytoplankton: acquisition, metabolism and impact on the environment. *New Phytologist*. 166(2):371-382. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1469-8137.2005.01335.x>
- Grewe, S., Ballottari, M., Alcocer, M., D'Andrea, C., Blifernez-Klassen, O., Hankamer, B., Mussgnug, J.H., Bassi, R., Kruse, O. 2014. Light-harvesting complex protein LHCBM9 is critical for photosystem II activity and hydrogen production in *Chlamydomonas reinhardtii*. *The Plant Cell*. 26:1598-1611.
- Guillard, R.R.I., Ryther, J.H. 1962. Studies on marine planktonic diatoms I. *Cyclotella nana* Hustedt and *Detonula confervacea* (Cleve). *Can. J. Microbiol.* 8:229-239.
- Gumiński, S., Jurajda, K., Tatkowska, E. 1983. The influence of the redox potential of the medium on the growth of some *Chlorophyceae*. *Oceanologia*. 17:29-33.
- Hagen, C., Braune, W., Greulich, F. 1993. Functional aspects of secondary carotenoids in *Haematococcus lacustris* Rostafiski (Volvocales). IV. Protection from photodynamic damage. *Photochemistry and Photobiology*. 20:153-160.
- Hallenbeck, P.C., Benemann, J.R. 2002. Biological hydrogen production; fundamentals and limiting processes. *International Journal of Hydrogen Energy*. 27:1185-1193.

- Happe, T., Mosler, B., Naber, J.D. 1994. Induction, localization and metal content of hydrogenase in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. European Journal of Biochemistry. 222(3):769-774.
- Harris, E.H. 2009. The Chlamydomonas Sourcebook. Introduction to *Chlamydomonas* and Its Laboratory Use. Vol 1. (2da ed.) Academic Press, San Diego.
- Hartman, H., Krasna, A. I. 1963. Studies on the “adaptation” of hydrogenase in *Scenedesmus*. Journal of Biological Chemistry. 238:(2):749-57.
- Havelková-Dousová, H., O. Prásil, M. J. Behrenfeld. 2004. Photoacclimation of *Dunaliella tertiolecta* (Chlorophyceae) under fluctuating irradiance. Photosynthetica. 42(2):273-281.
- Haußühl, K., Andersson, A., Adamska, I. 2001. A chloroplast DegP2 protease performs the primary cleavage of the photodamaged D1 protein in plant photosystem II. The EMBO Journal. 20(4):713-722.
- Hawkesford, M.J. 2003. Transporter gene families in plants: the sulphate transporter gene family- redundancy or specialization? Physiologia Plantarum. 117:155-163.
- He, Y.Y., Häder, D.P. 2002. UV-B-induced formation of reactive oxygen species and oxidative damage of the cyanobacterium *Anabaena* sp.: protective effects of ascorbic acid and N-acetyl-L-cysteine. Journal of Photochemistry and Photobiology. 66(B):115-124.
- He, M., Li, L., Liu, J. 2012. Isolation of wild microalgae from natural water bodies for high hydrogen producing strains. International Journal of Hydrogen Energy. 37:4046-4056.
- Heifetz, P.B., Förster, B., Osmond, C.B., Giles, L.J., Boynton, J.E. 2000. Effects of acetate on facultative autotrophy in *Chlamydomonas reinhardtii* assessed by photosynthetic measurements and stable isotope analyses. Plant Physiology. 122:1439-1445.
- Hell, R. 1997. Molecular physiology of plant sulfur metabolism. Planta. 202:138-148.
- Hemschemeier A, Melis A, Happe T. 2009. Analytical approaches to photobiological hydrogen production in unicellular green algae. Photosynthesis Research. 102(2-3):523-540.
- Hernández, D., Riaño, B., Coca, M., García-González, M. C. 2013. Treatment of agro-industrial wastewater using microalgae–bacteria consortium combined with anaerobic digestion of the produced biomass. Bioresource technology. 135:598-603.

- Hibbing, M.E., Fuqua, C., Parsek, M.R., Peterson, S.B. 2010. Bacterial competition: surviving and thriving in the microbial jungle. *Nature Reviews Microbiology*. 8(1):15-25.
- Ho, S.H., Chen, C.Y., Chang, J.S. 2012. Effect of light intensity and nitrogen starvation on CO₂ fixation and lipid/carbohydrate production of an indigenous microalga *Scenedesmus obliquus* CNW-N. *Bioresource Technology*. 113:244-252.
- Hodaifa, G., Martínez, M.E., Sánchez, S. 2009. Influence of pH on the culture of *Scenedesmus obliquus* in olive-mill wastewater. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*. 14:854-860.
- Hsieh, C-H., Wu, W-T. 2009. Cultivation of microalgae for oil production with a cultivation strategy of urea limitation. *Bioresource Technology*. 100:3921-3926.
- Hungate, R.E. 1969. A roll tube method for cultivation of strict anaerobes. En: Norris, J. R., Robins, D.W. (Eds.), *Methods in Microbiology*. Academic Press, New York. pp. 117-32.
- Irihimovitch, V., Shapira, M. 2000. Glutathione redox potential modulated by reactive oxygen species regulates translation of Rubisco large subunit in the chloroplast. *The Journal of Biological Chemistry*. 275:16289-16295.
- Jayaraman, A., Mansfeld, F.B., Wood, T.K. 1999. Inhibiting sulfate-reducing bacteria in biofilms by expressing the antimicrobial peptides indolicidin and bactenecin. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 22:167-175.
- Jiang, L., Xu, H., Zeng, X., Wu, X., Long, M., Shao, Z. 2015. Thermophilic hydrogen-producing bacteria inhabiting deep-sea hydrothermal environments represented by *Caloranaerobacter*. *Research in microbiology*. 166(9):677-687.
- Jorquera, C.O., Hernández, P.J., Herrera, Z.L. 2001. Producción biofotolítica de hidrógeno. *Ciencia Abierta. Revista electrónica*. 16.
- Jorquera, O., Kiperstok, A., Sales, E.A., Embiruçu, M., Ghirardi, M.L. 2008. S-systems sensitivity analysis of the factors that may influence hydrogen production by sulfur-deprived *Chlamydomonas reinhardtii*. *International Journal of Hydrogen Energy*. 33:2167-2177.
- Kashahara, S. 2016. Water electrolysis. En: Yan, X. L., Hino, R. (Eds.). *Nuclear hydrogen production handbook*. CRC Press. London.
- Katsuda, T., Oshima, H., Azuma, M., Kato, J. 2006. New detection method for hydrogen gas for screening hydrogen-producing microorganisms using water-soluble Wilkinson's catalyst derivative. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 102(3):220-226.

- Kerst, H. 1981. Method for deoxygenation of water. United States Patent 4,278,635. 07/107/486.
- Kim, J.P., Kang, C.D., Park, T.H., Kim, M.S., Sim, S.J. 2006. Enhanced hydrogen production by controlling light intensity in sulfur-deprived *Chlamydomonas reinhardtii* culture. *International Journal of Hydrogen Energy*. 31:1585-1590.
- Klekner, V., Kosaric, N. 1992. Degradation of phenols by algae. *Environmental Technology*. 13(5):493-501.
- Kosourov, S., Tsygankov, A., Seibert, M., Ghirardi, M.L. 2002. Sustained hydrogen photoproduction by *Chlamydomonas reinhardtii*: effects of culture parameters. *Biotechnology and Bioengineering*. 78:731-740.
- Kosourov, S., Seibert, M., Ghirardi, M.L. 2003. Effect of extracellular pH on the metabolic pathways in sulfur-deprived, H₂-producing *Chlamydomonas reinhardtii* cultures. *Plant and Cell Physiology*. 44:146-55.
- Kosourov, S., Makarova, V., Fedorov, A.S., Tsygankov, A., Seibert, M., Ghirardi, M.L. 2005. The effect of sulfur re-addition on H₂ photoproduction by sulfur-deprived green algae. *Photosynthesis Research*. 85:295-305.
- Kosourov, S., Patrusheva, E., Ghirardi, M.L., Seibert, M., Tsygankov, A. 2007. A comparison of hydrogen photoproduction by sulfur-deprived *Chlamydomonas reinhardtii* under different growth conditions. *Journal of Biotechnology*. 128:776-787.
- Kosourov, S.N., Ghirardi, M.L., Seibert, M. 2011. A truncated antenna mutant of *Chlamydomonas reinhardtii* can produce more hydrogen than the parental strain. *International Journal of Hydrogen Energy*. 36(3):2044-2048.
- Krause, G.H., Weis, E. 1991. Chlorophyll fluorescence and photosynthesis: the basics. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*. 42:313-349.
- Kruse, O., Rupprecht, J., Bader, K.P., Thomas-Hall, S., Schenk, P.M., Finazzi, G. 2005. Improved photobiological H₂ production in engineered green algal cells. *The Journal of Biological Chemistry*. 280:34170-34177.
- Kumar, K., Kumar, M.S., Choi, G-G., Yang, J-W. 2015. CO₂ sequestration through algal biomass production. En: Das, D. (Eds.), *Algal Biorefinery: An Integrated Approach*. Springer International Publishing, New Delhi. 35-57 pp.
- Kumari, S., White, R.T., Kumar, B., Spurgeon, J.M. 2016. Solar hydrogen production from seawater vapor electrolysis. *Energy & Environmental Science*. 9(5):1725-1733.

- Lalucat, J., Imperial, J., Pares, R. 1984. Utilization of light for the assimilation of organic matter in *Chlorella* sp. VJ79. *Biotechnology and Bioengineering*. 26:677-681.
- Lakatos, G., Deák, Z., Vass, I., Rétfalvi, T., Rozgonyi, S., Rákhely, G., Ördög, V., Kondorosi, E., Maróti, G. 2014. Bacterial symbionts enhance photo-fermentative hydrogen evolution of *Chlamydomonas algae*. *Green Chemistry*. 16:4716-4127.
- La Mer, V.K., Rideal, E.K. 1924. The influence of hydrogen concentration on the auto-oxidation of hydroquinone. A note on the stability of the quinhydrone electrode. *Journal of the American Chemical Society*. 46(1):223-231.
- Laliberte, G., de la Noue, J. 1993. Auto-, hetero- and mixotrophic growth of *Chlamydomonas humicola* (Chlorophyceae) on acetate. *Journal of Phycology*. 29:612-620.
- Laurinavichene, T.V., Tolstygina, I.V., Galiulina, R.R., Ghirardi, M.L., Seibert, M., Tsygankov, A.A. 2002. Dilution methods to deprive *Chlamydomonas reinhardtii* cultures of sulfur for subsequent hydrogen photoproduction. *International Journal of Hydrogen Energy*. 27:1245-1249.
- Laurinavichene, T.V., Tolstygina, I., Tsygankov, A.A. 2004. The effect of light intensity on hydrogen production by sulfur-deprived *Chlamydomonas reinhardtii*. *Journal of Biotechnology*. 114:143-151.
- Lee, H., Lee, S., Park, B. 1989. The estimation of algal yield parameters associated with mixotrophic and photoheterotrophic growth under batch cultivation. *Biomass*. 18:153-160.
- Leustek, T., Martin, M.N., Bick, J.A., Davies, J.P. 2000. Pathways and regulation of sulfur metabolism revealed through molecular and genetic studies. *Annual Review of Plant Biology*. 51:141-165.
- Li, X., Xu, H., Wu, Q. 2007. Large-scale biodiesel production from microalga *Chlorella protothecoides* through heterotrophic cultivation in bioreactors. *Biotechnology and Bioengineering*. 98(4):764-771.
- Li, X., Huang, S., Yu, J., Wang, Q., Wu, S. 2013. Improvement of hydrogen production of *Chlamydomonas reinhardtii* by co-cultivation with isolated bacteria. *International Journal of Hydrogen Energy*. 38(25):10779-10787.
- Liang, Y., Sarkany, N., Cui, Y. 2009. Biomass and lipid productivities of *Chlorella vulgaris* under autotrophic, heterotrophic and mixotrophic growth conditions. *Biotechnology Letters*. 31(7):1043-1049.

- Lin, S., Carpenter, E. J. 1999. A PSTTLRE-form of cdc2-like gene in the marine microalga *Dunaliella tertiolecta*. *Gene*. 239:39-48.
- Lin, C. Y., Jo, C. H. 2003. Hydrogen production from sucrose using an anaerobic sequencing batch reactor process. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*. 78:678-684.
- Liu, X., Duan, S., Li, A., Xu, N., Cai, Z., Hu, Z. 2009. Effects of organic carbon sources on growth, photosynthesis, and respiration of *Phaeodactylum tricornutum*. *Journal of Applied Phycology*. 21(2):239-246.
- Logan, B.A. 2005. Reactive oxygen species and photosynthesis. En: N. Smirnov (Ed.). *Antioxidants and Reactive Oxygen in Plants*, Blackwell Publishing, Oxford. pp. 250-267.
- Lopes, P.F., Thapper, A., Sontheim, W., Lindblad, P. 2009. Analysis of current and alternative phenol based RNA extraction methodologies for cyanobacteria. *BMC Molecular Biology*. 10:79. doi:10.1186/1471-2199-10-79.
- López-Elías, J.A., Fimbres-Olivarría, D., Medina-Juárez, L.A., Miranda-Baeza, A., Martínez-Córdova, L.R., Molina-Quijada, D.M.A. 2013. Producción de biomasa y carotenoides de *Dunaliella tertiolecta* en medios limitados en nitrógeno. *Phyton*, 82, 23-30.
- Mandal, S., Mallick, N. 2009. Microalga *Scenedesmus obliquus* as a potential source for biodiesel production. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 84:281-291.
- Maneeruttanarungroj, C., Lindblad, P., Incharoensakdi, A. 2012. Sulfate permease (SulP) and hydrogenase (HydA) in the green alga *Tetraspora* sp. CU2551: Dependence of gene expression on sulfur status in the medium. *International Journal of Hydrogen Energy*. 37:15105-15116.
- Markov, S.A., Eivazova, E.R., Greenwood, J. 2006. Photostimulation of H₂ production in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii* upon photoinhibition of its O₂-evolving system. *International Journal of Hydrogen Energy*. 31(10):1314-1317.
- Martínez, F., Orús, M.I. 1991. Interactions between glucose and inorganic carbon metabolism in *Chlorella vulgaris* strain UAM 101. *Plant Physiology*. 95(4):1150-1155.
- Matsuda, T., Polle, J.E.W., Melis, A. 2002. Biosynthesis and distribution of chlorophyll among the photosystems during recovery of the green alga *Dunaliella salina* from irradiance stress. *Plant Physiology*. 128:603-614.

- Melis, A., Zhang, L., Forestier, M., Ghirardi, M.L., Seibert, M. 2000. Sustained photobiological hydrogen gas production upon reversible inactivation of oxygen evolution in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiology*. 122:127-35.
- Melis, A., Chen, H.C. 2005. Chloroplast sulfate transport in green algae: genes, proteins and effects. *Photosynthesis Research*. 86:299-307.
- Melis, A., Seibert, M., Ghirardi, M.L. 2007. Hydrogen Fuel Production by Transgenic Microalgae. En: *Transgenic Microalgae as Green Cell Factories*. León, R., Galván, A., Fernández, E.L. (Eds.), Bioscience and Springer Science+Business Media, Texas. pp. 45-52.
- Mera, R.S. 2016. El sulfato como nutriente esencial en la protección contra los efectos citóxicos del cadmio en la microalga dulceacuícola *Chlamydomonas moewusii* Gerloff. Tesis de doctorado. Universidade da Coruña. 245 pp.
- Merzlyak, M.N., Chivkunova, O.B., Maslova, I.P., Naqvi, K.R., Solovchenko, A.E., Klyachko-Gurvich, G.L. 2008. Light absorption and scattering by cell suspensions of some cyanobacteria and microalgae. *Russian Journal of Plant Physiology*. 55(3):420-425.
- Miao, X., Wu, Q. 2004. High yield bio-oil production from fast pyrolysis by metabolic controlling of *Chlorella protothecoides*. *Journal of Biotechnology*. 110(1):85-93.
- Miao, X., Wu, Q. 2006. Biodiesel production from heterotrophic microalgal oil. *Bioresource Technology*. 97:841-846.
- Moellering, E.R., Benning, C. 2010. RNA interference silencing of a major lipid droplet protein affects lipid droplet size in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Eukaryotic Cell*. 9(1):97-106.
- Molina-Cárdenas, C.A. 2011. Efecto inhibitorio de diferentes especies de microalgas sobre *Vibrio* spp. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada. Tesis Maestría Pag. 81.
- Montes J.J.P., Pulido J.M. 2012. Obtención de protocolos para el aislamiento, cultivo y extracción de ADN de *Chlorella vulgaris* Beyerinck. *El Astrolabio*. 11(2):47-54.
- Moon M., Kim C.W., Park W-K., Yoo, G., Choi Y-E, Yang J-W. 2013. Mixotrophic growth with acetate or volatile fatty acids maximizes growth and lipid production in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Algal Research*. 2(4):352-357.
- Muccitelli, J.A. 1985. Hydroquinone catalyzed oxygen scavenger and methods of use thereof United States Patent. US 4541932 A.

- Muller-Feuga, A., Robert, R., Cahu, C., Robin, J., Divanach, P. 2003 Uses of Microalgae in Aquaculture. En: Støttrup, J.G., McEvoy, L.A. (Eds.), Live Feeds in Marine Aquaculture. Blackwell Science Ltd, Oxford. pp. 253-299. doi: 10.1002/9780470995143.ch7
- Murthy, U.M.N., Ghirardi, M.L. 2013. Algal Hydrogen Production. En: Lennarz, W.J., Lane, M.D. Encyclopedia of Biological Chemistry. Academic Press, New York. 66-70 pp.
- Nakai, S., Inoue, Y., Hosomi, M. 2001. Algal growth inhibition effects and inducement modes by plant-producing phenols. Water Research. 35(7):1855-1859.
- Ngangkham, M., Ratha, S.K., Prasanna, R., Saxena, A.K., Dhar, D.W., Sarika, C., Narayana, P.R.B. 2012. Biochemical modulation of growth, lipid quality and productivity in mixotrophic cultures of *Chlorella sorokiniana*. SpringerPlus. 1:33.
- Nguyen, A.V., Thomas-Hall, S.R., Malnoe, A., Timmins, M., Mussnug, J.H., Rupprecht, J., Kruse, O., Hankamer, B., Schenk, P.M. 2008. Transcriptome for photobiological hydrogen production induced by sulfur deprivation in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. Eukaryotic Cell. 7(11):1965-1979.
- Ni, M., Leung, D.Y.C., Leung, M.K.H., Sumathy, K. 2006. An overview of hydrogen production from biomass. Fuel Processing Technology. 87:461-472.
- Oesterhelt, C., Schmäzlin, E., Schmitt, J.M., Lokstein, H. 2007. Regulation of photosynthesis in the unicellular acidophilic red alga *Galdieria sulphuraria*. The Plan Journal. 51(3):500-511.
- Ogbonna, J.C., Tanaka, H. 1997. Industrial size photobioreactors. The American Chemical Society. 27:43-49.
- Oncel, S., Vardar-Sukan, F.S. 2011. Effect of light intensity and the light: dark cycles on the long term hydrogen production of *Chlamydomonas reinhardtii* by batch cultures. Biomass and Bioenergy. 35:1066-1074.
- Ortega, J., Moronta, R., Morales, E. 2004. Influencia del acetato sobre el crecimiento y contenido de pigmentos de la microalga *Chlorella* sp. Ciencia. 12(1):25-31.
- Pachapur, V.L., Sarma, S.J., Brar, S.K., Le Bihan, Y., Buelna, G., Verma, M. 2015a. Biological hydrogen production using co-culture versus mono-culture system. Environmental Technology Reviews. 4(1):55-70
- Pachapur, L., Sarma, V.J., Kaur Brar, S., Le Bihan, S., Soccol, Y.R., Buelna, C., Verma, M.G. 2015b. Co-culture strategies for increased biohydrogen production. International Journal of Energy Research. 39(11):1479-1504.

- Parsons, T. R., Maita, Y., Lalli, C. M. 1984. A Manual of Chemical and Biological Methods for Seawater Analysis. 1th ed. Pergamon Press, Oxford.
- Pérez-García, O., Escalante, F. M. E., De-Bashan, L. E., Bashan, Y. 2011. Heterotrophic cultures of microalgae: Metabolism and potential products. *Water Research*. 45:11-36.
- Pérez-García, O., De-Bashan, E., Hernández, J. P., Bashan, Y. 2010. Efficiency of growth and nutrient uptake from wastewater by heterotrophic, autotrophic, and mixotrophic cultivation of *Chlorella vulgaris* immobilized with *Azospirillum brasilense*. *Journal of Phycology*. 46(4):800-812.
- Podgórska, B., Węgrzyn, G. 2006. A modified *Vibrio harveyi* mutagenicity assay based on bioluminescence induction. *Letters in Applied Microbiology*. 42(6):578-582.
- Pootakham, W., Gonzalez-Ballester, D., Grossman, A.R. 2010. Identification and regulation of plasma membrane sulfate transporters in *Chlamydomonas*. *Plant Physiology*. 153:1653-1668.
- Powles, S.B. 1984. Photoinhibition of photosynthesis induced by visible light. *Annual Review of Plant Biology*. 35:15-44.
- Prince, R.C., Kheshgi, H.S. 2005. The photobiological production of hydrogen: potential efficiency and effectiveness as a renewable fuel. *Critical Reviews in Microbiology*. 31:19-31.
- Prosperi, C., Boluda, L., Luna, C., Fernandez, E. 1992. Environmental factors affecting in vitro nitrogenase activity of cyanobacteria isolated from ricefields. *Journal of Applied Phycology*. 4:197-204.
- Pulz, O., Gross, W. 2004. Valuable products from biotechnology of microalgae. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 65:635-648.
- Qiao H., Wang G., Zhang X. 2009. Isolation and characterization of *Chlorella sorokina* GXNN01 (Chlorophyta) with the properties of heterotrophic and microaerobic growth. *Journal of Phycology*. 45(5):1153-1162.
- Rashid, N., Lee, K., Mahmood, Q. 2011. Bio-hydrogen production by *Chlorella vulgaris* under diverse photoperiods. *Bioresource Technology*. 102:2101-2104.
- Raven, P.H., Evert, R.F., Eichhorn, S.E. 1992. *Biología de las plantas*. Volumen 2. (4ta ed.) Editorial Reverte, New York.
- Richardson, K., Beardall, J., Raven, J.A. 1983. Adaptation of unicellular algae to irradiance: an analysis of strategies. *New Phytologist*. 93(2):157-191.

- Rodolfi, L., Zittelli, G.C., Bassi, N., Padovani, G., Biondi, N., Bonini, G. 2009. Microalgae for oil: strain selection, induction of lipid synthesis and outdoor mass cultivation in a low-cost photobioreactor. *Biotechnology and Bioengineering*. 102:100-112.
- Rodrigues, M.A., Dos Santos, C.P., Yoneshigue-Valentin, Y., Strbac, D., Hall, D.O. 2000. Photosynthetic light-response curves and photoinhibition of the deepwater *Laminaria abyssalis* and the intertidal *Laminaria digitata* (Phaeophyceae). *Journal of Phycology*. 36:97-106.
- Rühle, T., Hemschemeier, A., Melis, A., Happe, T. 2008. A novel screening protocol for the isolation of hydrogen producing *Chlamydomonas reinhardtii* strains. *BMC Plant Biology*. 8(1):1.
- Saito, K. 2004. Sulfur assimilatory metabolism. The long and smelling road. *Plant Physiology*. 136:2443-2450.
- Schmidt, A., Zetsche, K. 1990. Regulation of the synthesis of isocitrate lyase and the corresponding mRNA in the green alga *Chlorogonium*. *Botanica Acta*. 103:48-53.
- Shi, X.M., Zhang, X.W., Chen, F. 2000. Heterotrophic production of biomass and lutein by *Chlorella protothecoides* on various nitrogen sources. *Enzyme and Microbial Technology*. 27(3):312-318.
- Shollna, S.I., Bogolyubskii, V.A., Kruglyakova, K.E. 1963. The antioxidant efficiency of some hydroquinone derivatives. *Bulletin of the Academy of Sciences of the USSR*. 12(5):715-18.
- Siaut, M., Cui n , S., Cagnon, C., Fessler, B., Nguyen, M., Carrier, P., Beyly, A., Beisson, F., Triantaphylid s, C., Li-Beisson, Y., Peltie, G. 2011. Oil accumulation in the model green alga *Chlamydomonas reinhardtii*: characterization, variability between common laboratory strains and relationship with starch reserves. *BMC Biotechnology*. 11:7. <http://www.biomedcentral.com/1472-6750/11/7>
- Slater, T.F., Cheeseman, K.H., Davies, M.J., Proudfoot, K., Xin, W. 1987. Free radical mechanisms in relation to tissue injury. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 46:1-12.
- Singh, S.P., Singh, P. 2015. Effect of temperature and light on the growth of algae species: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 50:431-444.
- Skj nes, K., Knutsen, G., K llqvist, T., Lindblad, P. 2008. H₂ production from marine and freshwater species of green algae during sulfur deprivation and considerations for bioreactor design. *International Journal of Hydrogen Energy*. 33:511-521.

- Sorokin, C. 1973. Dry weight, packed cell volume and optical density. 321-343. En: Stein, J. R. (ed.). Handbook of Phycological Methods. Culture Methods and Growth Measurements. Cambridge University Press. New York.
- South, G.R., Whittick, A. 1987. Physiology and Biochemistry. En: South, G. R., Whittick A. (ed.). An introduction to Phycology. Blackwell Scientific Publications, Oxford.
- Spreitzer, R.J., Thow, G., Zhu, G. 1995. Pseudoreversion substitution at large-subunit residue 54 influences the CO₂/O₂ specificity of chloroplast ribulose-bisphosphate carboxylase/oxygenase. Plant Physiology. 109:681-685.
- Steele, M.M, Anctil, A., Ladner, D.A. 2014. Integrating algaculture into small wastewater treatment plants: process flow options and life cycle impacts Environmental Science: Processes & Impacts. 16:1387-1399. DOI: 10.1039/C3EM00685A
- Steinberg-Yfrach, G., Rigaud, J.L., Durantini, E.N., Moore, A.L., Gust, D., Thomas A. Moore. 1998. Light-driven production of ATP catalysed by F₀F₁-ATP synthase in an artificial photosynthetic membrane. Nature. 392:479-482.
- Steinmüller, K., Zetsche, K. 1984. Photo-and metabolite regulation of the synthesis of ribulose bisphosphate carboxylase/oxygenase and the phycobiliproteins in the alga *Cyanidium caldarium*. Plant physiology. 76(4):935-939.
- Stroebel, D., Choquet, Y., Popot, J.L., Picot, D. 2003. An atypical haem in the cytochrome b6f complex. Nature. 426:413-418.
- Tamburic, B., Zemichael, F.W., Maitland, G.C., Hellgardt, K. 2011. Parameters affecting the growth and hydrogen production of the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. International Journal of Hydrogen Energy. 36:7872-7876.
- Tamburic, B., Zemichael, F.W., Maitland, G.C., Hellgardt, K. 2012. A novel nutrient control method to deprive green algae of sulphur and initiate spontaneous hydrogen production. International Journal of Hydrogen Energy. 37(11):8988–9001.
- Taylor, R., Fletcher, R.L., Raven, J.A. 2005. Preliminary studies on the growth of selected 'green tide' algae in laboratory culture: effects of irradiance, temperature, salinity and nutrients on growth rate. Citation Information: Botanica Marina. 44(4):327-336.
- Tiffany, L.H., Britton, M.E. 1971. The algae of Illinois. Hafner Publishing Company. New York. 407 pp.
- Timmins, M., Zhou, W., Rupprecht, J., Lim, L., Thomas-Hall, S.R., Doebbe, A., Kruse, O., Hankamer, B., Marx, U.T., Smith, S.M., Schenk, P.M. 2009. The metabolome of *Chlamydomonas reinhardtii* following induction of anaerobic H₂ production by sulfur depletion. Journal of Biological Chemistry. 284(35):23415-23425.

- Torzillo, G., Scoma, A., Faraloni, C., Giannelli, L. 2015. Advances in the biotechnology of hydrogen production with the microalga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Critical reviews in biotechnology*. 35(4):485-496.
- Trchounian, K., Trchounian, A. 2015. Hydrogen production from glycerol by *Escherichia coli* and other bacteria: an overview and perspectives. *Applied Energy*. 156:174-184.
- Trevors, T.J., Basaraba, J. 1980. Toxicity of benzoquinone and hydroquinone in short-term bacterial bioassays. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*. 25:672-675.
- Tsygankov, A., Kosourov, S., Seibert, M., Ghirardi, M.L. 2002. Hydrogen photoproduction under continuous illumination by sulfur-deprived, synchronous *Chlamydomonas reinhardtii* cultures. *International Journal of Hydrogen Energy*. 27:1239-1244.
- Tsygankov, A., Kosourov, S., Tolstygina, I., Ghirardi, M., Seibert, M. 2006. Hydrogen production by sulfur-deprived *Chlamydomonas reinhardtii* under photoautotrophic conditions. *International Journal of Hydrogen Energy*. 31(11):1574-1584.
- Ueno, Y., Kurano, N., Miyachi, S., 1998. Ethanol production by dark fermentation in the marine green alga, *Chlorococcum littorale*. *Journal of Fermentation and Bioengineering*. 86:38-43.
- Vallon, O., Spalding, M. H. 2009. Amino Acid Metabolism. En: Harris, E.H. (eds.). *The Chlamydomonas Sourcebook. Introduction to Chlamydomonas and Its Laboratory Use. Vol 1. (2da ed.) Academic Press, San Diego.*
- Verfondern, K. 2016. Nuclear coal gasification. En: Yan, X.L., Hino, R. (Eds.). *Nuclear hydrogen production handbook. CRC Press, London.*
- Verma, N., Kummar, S.A. 2013. Development of biological oxygen demand biosensor for monitoring the fermentation industry effluent. *ISRN Biotechnology*. 236062:6. <http://dx.doi.org/10.5402/2013/236062>.
- Volgusheva, A., Kukarskikh, G., Krendeleva, T., Rubin, A., Mamedov, F. 2015. Hydrogen photoproduction in green algae *Chlamydomonas reinhardtii* under magnesium deprivation. *RSC Advances*. 5(8):5633-5637.
- Wahidina, S., Idrisb, A., Raehanah, S., Shaleh, M. 2013. The influence of light intensity and photoperiod on the growth and lipid content of microalgae *Nannochloropsis sp.* *Bioresource Technology*. 129:7-11.
- Wang, X., Tian, W., Li, Y. 2008. Development of an efficient protocol of RNA isolation from recalcitrant tree tissues. *Molecular Biotechnology*. 38:57-64.

- International Energy Agency. 2016. The Outlook for Energy: A View to 2040. Exxon Mobil Corporation's internal. Pp.79. <http://cdn.exxonmobil.com/~media/global/files/outlook-for-energy/2016/2016-outlook-for-energy.pdf>.
- Wieczorek, N., Kucuker, M. A., Kuchta, K. 2015. Microalgae-bacteria flocs (MaB-Flocs) as a substrate for fermentative biogas production. *Bioresource technology*, 194, 130-136.
- Winkler, M, Hemschemeier, A., Gotor, C., Melis, A., Happe, T. 2002. [Fe]-hydrogenases in green algae: photo-fermentation and hydrogen evolution under sulfur deprivation. *International Journal of Hydrogen Energy*. 27(11-12):1431-1419.
- Whyte, J.N.C. 1987. Biochemical composition and energy content of six species of phytoplankton used in mariculture of bivalves. *Aquaculture*. 60:231-241.
- Wu, S., Li, X., Yu, J., Wang, Q. 2012. Increased hydrogen production in co-culture of *Chlamydomonas reinhardtii* and *Bradyrhizobium japonicum*. *Bioresource Technology*. 123:184-188.
- Wykoff, D.D., Davies, J.P., Melis, A., Grossman, A. R. 1998. The Regulation of Photosynthetic Electron Transport during Nutrient Deprivation in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiology*. 117:129-139.
- Xiao, X., Chen, Y.X., Liang, X.Q., Lou, L.P., Tang, X.J. 2010. Effects of Tibetan hullless barley on bloom-forming cyanobacterium (*Microcystis aeruginosa*) measured by different physiological and morphologic parameters. *Chemosphere*. 81(9):1118-1123.
- Xin, L., Hong-yin, H. 2010. Effects of different nitrogen and phosphorus concentrations on the growth, nutrient uptake, and lipid accumulation of a freshwater microalgae *Scenedesmus* sp. *Bioresource Technology*. 101:5494-5500.
- Xu, H., Miao, X., Wu, Q. 2006. High quality biodiesel production from a microalga *Chlorella protothecoides* by heterotrophic growth in fermenters. *Journal of Biotechnology*. 126(4):499-507.
- Yang, D.J., Lin, J.T., Chen, Y.C., Liu, S.C., Lu, F.J., Chang, T.J., Wang, M., Lin, H-W, Chang, Y.Y. 2013. Suppressive effect of carotenoid extract of *Dunaliella salina* alga on production of LPS-stimulated pro-inflammatory mediators in RAW264. 7 cells via NF- κ B and JNK inactivation. *Journal of Functional Foods*, 5(2), 607-615.
- Yoder-López, A.T. 2007. El hidrógeno como fuente alterna de energía. Tesis de licenciatura. Escuela Superior de Ingeniería Mecánica y Eléctrica. Unidad Culhuacan. Instituto Politécnico Nacional (IPN). México, Distrito Federal. Pág. 101.

- Yokoi, H., Tokushige, T., Hirose, J., Hayashi, S., Takasaki, Y. 1998. H₂ production from starch by a mixed culture of *Clostridium butyricum* and *Enterobacter aerogenes*. *Biotechnology Letters*. 20(2):143-147.
- Zar, J.H. 1984. *Biostatistical Analysis*. 2th ed. Prentice-Hall Inc., New Jersey.
- Zhang, X.W., Shi, X.M., Chen, F. 1999. A kinetic model for lutein production by the green microalga *Chlorella protothecoides* in heterotrophic culture. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 23(6):503-507.
- Zhao, X., Zhou, Y., Huang, S., Qiu, D., Schideman, L., Chai, X., Zhao, Y. 2014. Characterization of microalgae-bacteria consortium cultured in landfill leachate for carbon fixation and lipid production. *Bioresource technology*, 156, 322-328.
- Zhang, L., Happe, T., Melis, A. 2002. Biochemical and morphological characterization of sulfur-deprived and H₂-producing *Chlamydomonas reinhardtii* (green alga). *Planta*. 214:552-561.
- Zhang, L., Zhang, W., Jin, M., Zhang, H., Wang, Y. 2005. Cloning and structure analysis of hydrogenase gene from *Chlamydomonas reinhardtii* SE. *Process Biochemistry*. 40:2968-2972.
- Zhao, T., Li, G., Mi, S., Li, S., Hannon, G. J., Wang, X., Qi, Y. 2007. A complex system of small RNAs in the unicellular green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Genes & Development*. 21:1190-1203.
- Zhu J., Rong J., Zong B. 2013. Factors in mass cultivation of microalgae for biodiesel. *Chinese Journal of Catalysis*. 34:80-100.

11. APENDICE

11.1. Efecto del aporte químico de nitrógeno (NO₃ y NH₄Cl) sobre el crecimiento

Para este ensayo se utilizaron cinco especies de algas verdes: *C. gloeopara*, *C. mexicana*, *C. reinhardtii*, *Chlorella vulgaris* y *S. obliquus* mantenidas bajo las condiciones descritas en la sección 5.1. Los cultivos se mantuvieron por triplicado en sistemas estáticos, monoespecíficos, no axénicos en matraces Erlenmeyer de 250 mL con 150 mL de medio autótrofo "f" (Guillard y Ryther, 1962) (Tabla I), fueron agitados manualmente dos veces al día durante 30 segundos y se mantuvieron a una temperatura de 20 ± 1 °C. El medio de cultivo se esterilizó y preparó como se describe en la sección 5.1. Se evaluó el efecto de fuente nitrogenada en el medio de cultivo sobre la densidad celular. Para ello se emplearon dos fuentes inorgánicas de nitrógeno (NO₃ y NH₄). Se calculó la cantidad de nitrógeno en el medio "f" en forma de NO₃ y se sustituyó por otra fuente de nitrógeno (NH₄). La luz se suministró de forma continua y fue provista por medio de lámparas fluorescentes de 40 watts de luz blanca a una irradiancia de 100 $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$. Durante 32 días se evaluó el crecimiento mediante conteo celular (cél/mL) como se describe en la sección 5.2.2.

Los valores de crecimiento de *C. gloeopara*, *C. mexicana*, *Chlorella vulgaris* y *S. obliquus* se analizaron mediante un análisis de varianza de una vía (ANOVA) con un nivel de confianza del 95%.

Para todos los datos analizados se verificaron los supuestos de normalidad y de homogeneidad de varianzas. Cuando se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos, se utilizó el análisis *a posteriori* de Tukey (Zar, 1984). Todos los datos fueron analizados con el programa estadístico STATISTICA® versión 7.0 (Stat Soft Inc. EE.UU., 2004). Las gráficas fueron realizadas mediante el programa Excel 2013.

11.1.1. Resultados: Efecto del aporte químico de nitrógeno (NO₃ y NH₄Cl) sobre el crecimiento

No se observaron diferencias significativas en el crecimiento de las microalgas *C. gloeopara*, *C. mexicana*, *Chlorella vulgaris* y *S. obliquus* debido a los dos aportes químicos de nitrógeno ($p > 0.05$). La fase de crecimiento exponencial tuvo una duración entre 5 y 10 días. Solo la especie *C. reinhardtii* presentó un mayor crecimiento cuando se cultivó en medio "f" con NH₄. La mayor densidad celular se obtuvo con la especie *S. obliquus* el día 22 usando NH₄. La etapa de crecimiento exponencial tuvo una duración entre 8 y 12 días de cultivo y se observó la fase estacionaria de los cultivos hasta el final del ensayo (Figura I).

Debido a que se utilizó la especie *C. reinhardtii* como control positivo para la producción de H₂ en distintos ensayos de esta tesis, fue necesario modificar el medio "f" (Guillard y Ryther, 1962) adicionando NH₄ para potenciar una mayor densidad celular y así poder obtener mayor cantidad de H₂.

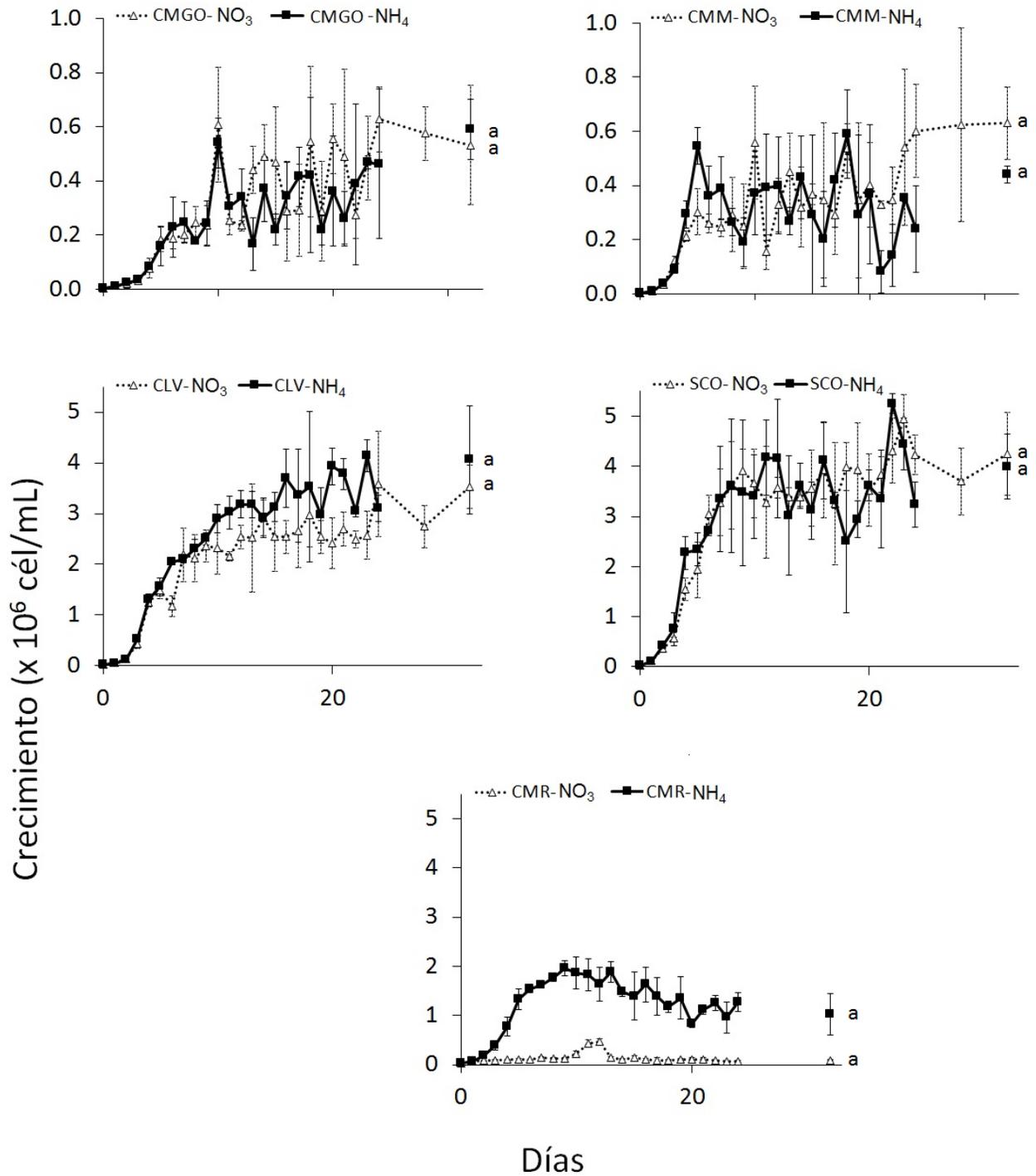


Figura I. Curva de crecimiento de las especies *Chlamydomonas gloeopara* (CMGO), *Chlamydomonas mexicana* (CMM), *Chlorella vulgaris* (CLV), *Scenedesmus obliquus* (SCO) y *Chlamydomonas reinhardtii* (CMR) ($\times 10^6$ cél/mL) en medio "f" con dos aportes químicos de nitrógeno (NO_3^- y NH_4^+).

11.2. Producción de biogás con medio “f”

Para este ensayo se utilizaron cuatro especies de microalgas: *C. gloeopara*, *C. mexicana*, *Chlorella vulgaris* y *S. obliquus* mantenidas bajo las condiciones descritas en la sección 5.1.

Los cultivos se mantuvieron por triplicado en sistemas estáticos, monoespecíficos, no axénicos en matraces Erlenmeyer de 500 mL con 300 mL de medio y fueron agitados manualmente dos veces al día durante 30 segundos (Etapa I). Se mantuvieron a una temperatura de $20 \pm 1^\circ\text{C}$, la luz se suministró de forma continua y fue provista por medio de lámparas fluorescentes de 40 watts de luz blanca a una irradiancia de $100 \mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$. El medio de cultivo se esterilizó y preparó como se describe en la sección 5.1. Durante 11 días se evaluó el crecimiento mediante conteo celular (cél/mL) como se describe en la sección 5.2.2 y mediante la densidad óptica usando un espectrofotómetro HACH DR/4000 a una longitud de onda de 680 nm.

Después de 11 días las microalgas fueron cosechadas y transferidas a un medio “f” sin azufre (Etapa II) donde se reemplazaron las sales de sulfato por sales de cloruro para la producción anaerobia de H_2 como se indica en la sección 5.2.1. Se determinó la producción de biogás mediante la técnica de desplazamiento de salmuera como se describe en la sección 5.2.1.

11.2.1. Resultados: Producción de biogás con medio “f”

La figura II muestra la densidad celular ($\times 10^6$ células/mL) y densidad óptica (DO) durante la Etapa I y producción anaerobia de biogás (Etapa II). Existió una relación directa entre la densidad óptica y el conteo celular directo realizado en los cultivos de *C. gloeopara*, *C. mexicana*, *Chlorella vulgaris* y *S. obliquus*. La correlación más fuerte se observó en *Chlorella vulgaris* y *S. obliquus*, las cuales presentaron células individuales en la mayor parte del cultivo. *C. gloeopara* y *C. mexicana* formaron aglomerados de células a partir del día 4, los cuales fueron difíciles de separar y esta característica causó errores en los conteos por densidad óptica y una menor correlación entre los conteos con densidad óptica y los conteos celulares en la cámara de Neubauer. De tal manera, que los conteos directos en la cámara fueron más confiables y por ello se continuaron realizando en los

posteriores ensayos. La mayor densidad celular se alcanzó con *S. obliquus* seguido de *Chlorella vulgaris*, *C. gloeopara* y *C. mexicana*.

Para este ensayo aún no se contaba con un método para verificar la producción de H₂ de forma cuantitativa o cualitativa. Por tanto, todo el biogás producido por las microalgas fue cuantificado. La mayor producción de biogás se presentó *Chlorella vulgaris* (20 mL/L) seguida de *C. gloeopara*, *S. obliquus* y *C. mexicana*. La producción se mantuvo hasta el final del ensayo en todas las especies con excepción de *S. obliquus* que detuvo su producción el día 17.

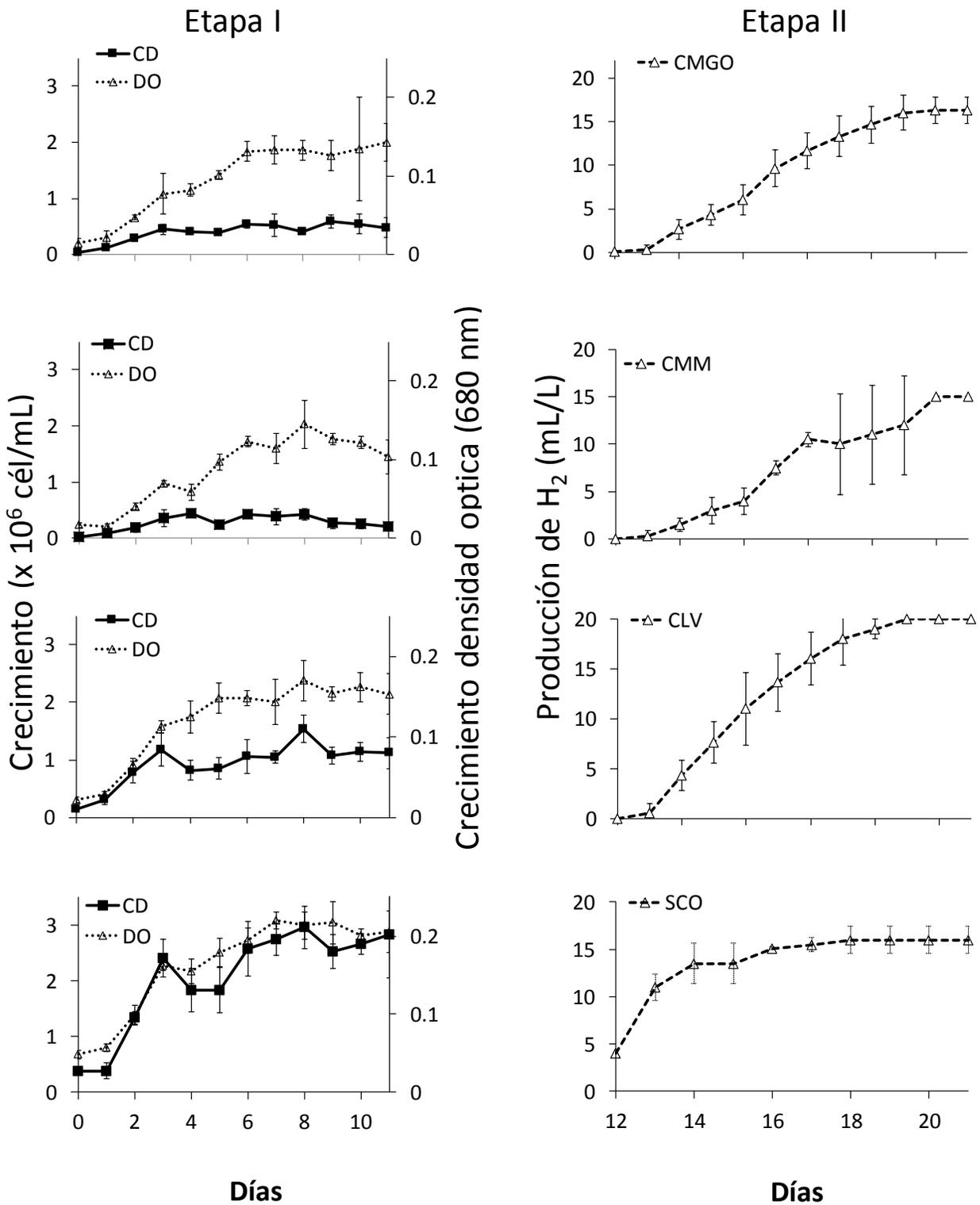


Figura II. Curva de crecimiento durante la producción de biomasa (Etapa I) y la producción de H₂ mediante la privación de azufre (Etapa II) de *Chlamydomonas gloeopara* (CMGO), *Chlamydomonas mexicana* (CMM), *Chlorella vulgaris* (CLV) y *Scenedesmus obliquus* (SCO). Cuento directo en microscopio (CD); conteo por densidad óptica (DO-680 nm).

11.3. Producción de H₂ en cultivos con medio autótrofo y heterótrofo

Se utilizaron cinco especies de algas verdes: *C. gloeopara*, *C. mexicana*, *Chlorella vulgaris*, *S. obliquus* y *C. reinhardtii* como control positivo para la producción de H₂. Los cultivos se mantuvieron bajo las condiciones descritas en la sección 5.1.

Los cultivos se mantuvieron en sistemas estáticos, monoespecíficos, no axénicos en medio autótrofo "f" modificado (Guillard y Ryther, 1962) y medio heterótrofo TAP (Harris, 2009) y se evaluó su crecimiento y la producción de H₂. El medio de cultivo se esterilizó y preparó como se describe en la sección 5.1. En la etapa de producción de biomasa (Etapa I), los cultivos se realizaron en matraces Erlenmeyer de 250 mL con 150 mL de medio y fueron agitados manualmente dos veces al día durante 30 segundos. Los cultivos se mantuvieron a una temperatura de 20 ± 1°C, la luz se suministró de forma continua y fue provista por medio de lámparas fluorescentes de 40 watts de luz blanca a una irradiancia de 100 μE/m²/s. Durante 10 días se evaluó el crecimiento mediante conteo celular (cél/mL) como se describe en la sección 5.2.2

Después de 10 días para la Etapa II, los cultivos de las 5 especies de microalgas fueron cosechados mediante sedimentación y decantación como se indica en la sección 5.2.1. Para la producción de H₂, después de cosechar y enjuagar las células de cada especie fueron divididas en partes iguales y cada una de las partes fue transferida a medio autótrofo "f" (Guillard y Ryther, 1962) y otra parte a medio de cultivo heterótrofo TAP (Harris, 2009), donde se reemplazaron las sales de sulfato por sales de cloruro para la producción anaerobia de H₂ como se indica en la sección 5.2.1. Se determinó la producción de biogás mediante la técnica de desplazamiento de salmuera como se describe en la sección 5.2.1.

Los valores de crecimiento, concentración de clorofila "a", clorofila "b", carotenos y peso seco de *C. gloeopara*, *C. mexicana*, *C. reinhardtii*, *Chlorella vulgaris* y *S. obliquus* en la Etapa I se analizaron mediante un análisis de varianza de una vía (ANOVA) con un nivel de confianza del 95%.

Para todos los datos analizados se verificaron los supuestos de normalidad y de homogeneidad de varianzas. Cuando se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos, se utilizó el análisis *a posteriori* de Tukey (Zar, 1984). Todos los datos

fueron analizados con el programa estadístico STATISTICA® versión 7.0 (Stat Soft Inc. EE.UU., 2004). Las gráficas fueron realizadas mediante el programa Excel 2013.

11.3.2. Resultados: Producción de H₂ en cultivos con medio autótrofo y heterótrofo

El crecimiento de las microalgas con el medio heterótrofo fue significativamente superior en los cultivos de *C. gloeopara*, *C. reinhardtii* y *S. obliquus* ($p < 0.05$). En *C. mexicana* y *Chlorella vulgaris* (Figura III) no se presentaron diferencias significativas ($p > 0.05$) producidas por los medios de cultivo autótrofo "f" y medio heterótrofo TAP.

Los resultados obtenidos de las curvas de crecimiento mostraron una fase de acondicionamiento de 4 días para las cinco especies de microalgas con los dos tipos de medios de cultivo, siendo más pronunciada la fase acondicionamiento en *C. mexicana* en ambos medios de cultivo, así como para *C. gloeopara* y *C. reinhardtii* con el medio autótrofo "f". El medio heterótrofo (TAP) originó la mayor cantidad de células en *C. reinhardtii* siendo un 97% superior a lo producido en el medio "f" ($p < 0.05$). La menor cantidad de biomasa final se produjo en *C. mexicana* con el medio "f" fotoautótrofo.

Durante la Etapa II, se encontró que todas las especies produjeron H₂. Solo *C. reinhardtii* fue capaz de producir H₂ en ambos medios de cultivo y la mayor cantidad de presentó con el medio autótrofo (88 mL/L). Con el medio autótrofo se produjo una mayor cantidad de H₂ en *C. gloeopara*, *C. mexicana*, *Chlorella vulgaris*, y *C. reinhardtii* ($p < 0.05$). Solo en *S. obliquus* existió una relación directa entre la mayor densidad celular y la mayor producción de H₂.

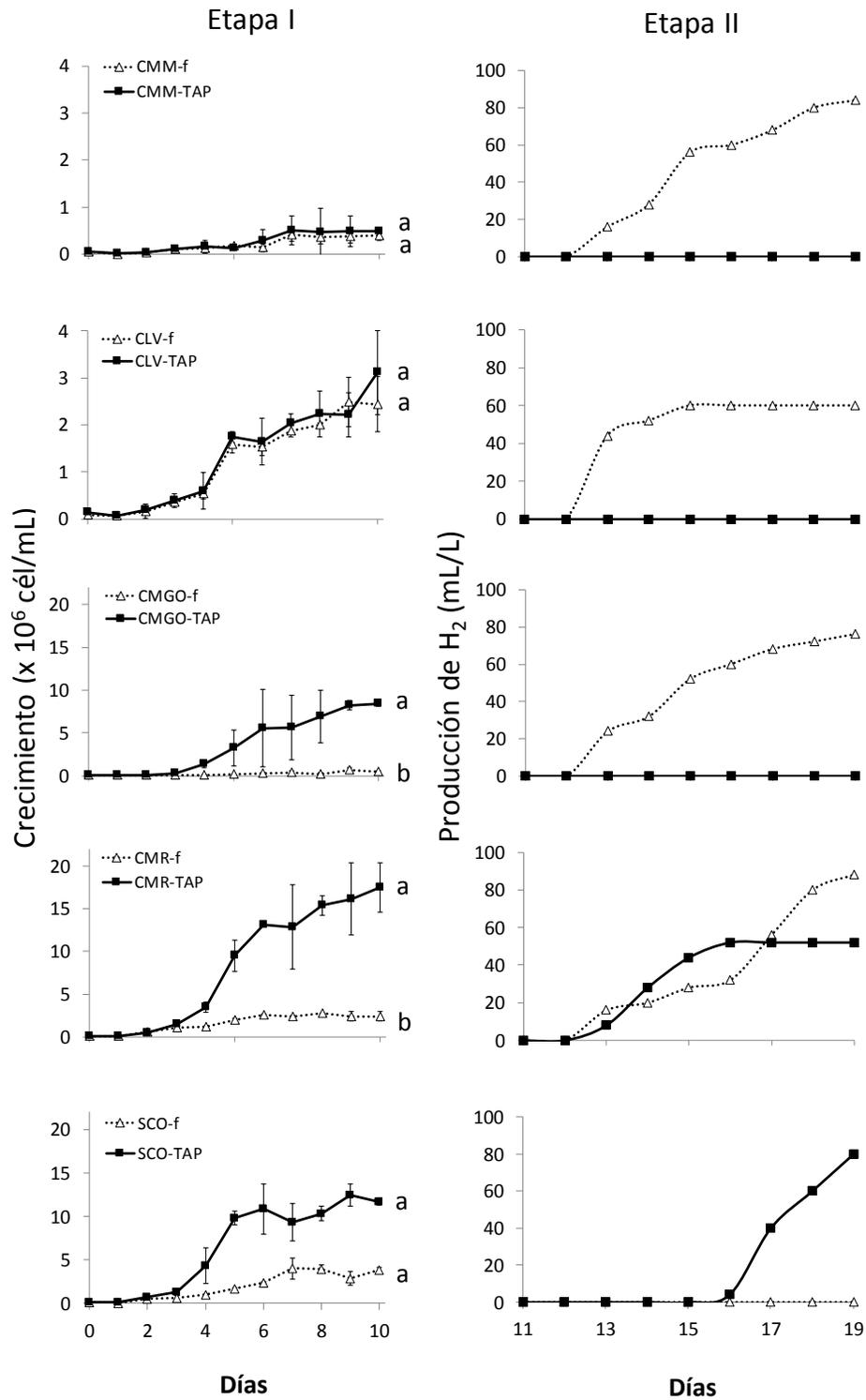


Figura III. Curva de crecimiento ($\times 10^6$ cél/mL) y producción de H₂ de las especies *Chlamydomonas mexicana* (CMM), *Chlorella vulgaris* (CLV), *Chlamydomonas gbeopara* (CMGO), *Chlamydomonas reinhardtii* (CMR) y *Scenedesmus obliquus* (SCO) cultivadas en medio "f" y medio TAP.

La concentración de clorofila “a”, clorofila “b” y carotenos en las diferentes especies de microalgas fue afectada por el medio de cultivo ($p < 0.05$). El medio heterótrofo (TAP) promovió una mayor concentración de pigmentos, principalmente de clorofila “a”. La mayor concentración de clorofila “a” se observó en *C. reinhardtii* con el medio heterótrofo TAP y la menor en *C. mexicana* en el medio autótrofo “f” (Tabla III). El peso seco total de las distintas especies de microalgas cultivadas fue mayor con el medio heterótrofo TAP, siendo entre 1.3 y 3.3 veces mayor que los obtenidos con el medio “f” ($p < 0.001$). La mayor diferencia se observó en *C. mexicana* (Tabla I).

Tabla I. Concentración de clorofila “a”, clorofila “b” y carotenoides ($\mu\text{g/L}$) y peso seco total (mg/L) de *Chlamydomonas gloeopara* (CMGO), *Chlamydomonas mexicana* (CMM), *Chlamydomonas reinhardtii* (CMR), *Chlorella vulgaris* (CLV) y *Scenedesmus obliquus* (SCO). $a > b$.

	CMGO	CMM	CMR	CLV	SCO
	"f"	"f"	"f"	"f"	"f"
Clorofila "a"	23.3 \pm 5.9 ^b	20.6 \pm 4.6 ^b	42.1 \pm 7.8 ^b	46.6 \pm 6.5 ^b	88.4 \pm 30.8 ^b
Clorofila "b"	6.6 \pm 2.4 ^b	7.9 \pm 4.1 ^b	25.9 \pm 5.1 ^b	13.9 \pm 2.7 ^b	23.8 \pm 8.1 ^b
Carotenoides	14.3 \pm 4.5 ^b	8.4 \pm 2.9 ^b	26.8 \pm 10.1 ^b	25.6 \pm 3.7 ^b	49.9 \pm 12.6 ^b
Peso seco total	52.2 \pm 1.3 ^b	61.8 \pm 2.6 ^b	87.4 \pm 15.2 ^b	89.5 \pm 1.1 ^b	113.2 \pm 10.0 ^b

	CMGO	CMM	CMR	CLV	SCO
	TAP	TAP	TAP	TAP	TAP
Clorofila "a"	720.1 \pm 398.8 ^a	323.8 \pm 111.4 ^a	2112.9 \pm 490.2 ^a	126.6 \pm 75.5 ^a	531.2 \pm 145.4 ^a
Clorofila "b"	244.4 \pm 134.1 ^a	112.9 \pm 36.2 ^a	971.4 \pm 206.5 ^a	51.4 \pm 37.2 ^a	125.4 \pm 39.1 ^a
Carotenoides	314.3 \pm 170.9 ^a	145.3 \pm 44.2 ^a	1103.6 \pm 283.1 ^a	51.1 \pm 24.1 ^a	256.2 \pm 58.1 ^a
Peso seco total	132.2 \pm 27.9 ^a	207.3 \pm 44.9 ^a	118.8 \pm 21.6 ^a	215.3 \pm 48.2 ^a	164.1 \pm 39.4 ^a