



Centro de Investigación Científica de Yucatán, A. C.

Posgrado en Ciencias en Energía Renovable

Título:

**BIOHIDRÓGENO POR BIOFOTÓLISIS INDIRECTA
BAJO CONDICIONES DE AUSENCIA DE AZUFRE
DE TRES ESPECIES DE MICROALGAS VERDES:
Coelastrum sp. (COE-1) y *Scenedesmus* sp. (SCRE-
1 y SCRE-2)**

Tesis que presenta:

KATIA ISABEL ANCONA CANCHÉ

En opción al título de

MAESTRO EN CIENCIAS EN ENERGÍA RENOVABLE

Mérida, Yucatán a Diciembre 2020.

Agradecimientos:

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el apoyo económico durante la realización de este proyecto a través de la beca No. 222222.

Al Fondo Sectorial SENER-CONACYT: Fortalecimiento Institucional para la Sustentabilidad Energética, por el apoyo otorgado a través del Proyecto: "Consolidación del Laboratorio de Energía Renovable del Sureste.

A la unidad de Energía Renovable y al Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., por las instalaciones y equipos prestados.

A mi asesora de tesis la Dra. Ruby Alejandra Valdez Ojeda, por su apoyo, motivación, dedicación y asesoría para desarrollar el trabajo de tesis.

A mi coasesora de tesis la Dra. Pilar Sánchez, por sus observaciones, aportaciones, asesoramiento y apoyo en el trabajo de tesis.

A los revisores de tesis el Dr. Jesús Alvarado, Dr. Rodrigo Patiño, Dr. Felipe Barahona y Dr. Hugo Perales por sus aportaciones, correcciones y comentarios del trabajo de tesis.

A la técnica Fati Castro, por su apoyo, tiempo, asesoramiento y dedicación en los análisis de los datos.

A la técnica Q.I. Tanit Toledano y Alejandro May, por el apoyo técnico en el laboratorio y manejo de equipos.

A la M.C. Silvia López, por todo su apoyo, dedicación y asesoría en el mundo de las microalgas.

A mis amigas Isaura y Elda por su amistad y brindarme su apoyo siempre.

A mis compañeros de generación y laboratorio por su apoyo.

A mi esposo, padres, suegros y abuelos por brindarme soporte y la fuerza necesaria para realizar la tesis.

Gracias.

Dedicatoria

Esta tesis va dedicada con todo cariño:

A Dios, por la familia que me dio y por haberme permitido llegar hasta este momento de mi formación profesional.

A mi esposo, mi apoyo incondicional y la persona que me ha acompañado durante toda la tesis y a la que le agradezco todo el amor, paciencia y dedicación que me brinda siempre.

A mis padres, hermana, abuelas y suegros por todo el apoyo brindado.

A mis sobrinos, mis motores para seguir adelante.

ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS	iii
ÍNDICE DE TABLAS	v
GLOSARIO	vi
RESUMEN.....	viii
ABSTRACT	ix
INTRODUCCIÓN.....	1
CAPITULO 1	3
ANTECEDENTES	3
1.1 Frente a la problemática global de emisiones de CO ₂ y el calentamiento global.....	3
1.2 Alternativa de los biocombustibles a partir de microalgas.....	3
1.3 Hidrógeno como combustible.....	4
1.4 Producción biológica de hidrógeno.....	5
1.5 Fotosíntesis en microalgas verdes.....	6
1.6 Biofotólisis y el metabolismo de las microalgas para la producción de hidrógeno	6
1.7 Biofotólisis indirecta	7
1.8 Hidrogenasas para la producción de hidrógeno.....	8
1.9 Alternativas biotecnológicas para inducir la producción de hidrógeno.....	9
1.10 Medición de clorofila	12
1.11 Medición de carbohidratos (almidón).....	12
1.12 Parámetros que afectan la producción de H ₂	13
1.12.1 Nutrientes.....	14
1.12.2 La luz	15
1.12.3 Temperatura	16
1.12.4 pH	17
1.13 Las microalgas verdes <i>Scenedesmus</i> sp. y <i>Coelastrum</i> sp., para la producción de biohidrógeno.....	17
JUSTIFICACIÓN	20
HIPÓTESIS	21

OBJETIVOS	22
Objetivo general:	22
Objetivos específicos:	22
CAPÍTULO 2	23
MATERIALES Y MÉTODOS	23
2.1 Estrategia experimental	23
2.2 Material biológico	24
2.3 Medio de cultivo	24
2.3.1 Cultivos microalgales	24
2.4 Medición de las curvas de crecimiento	25
2.5 Cultivo en dos etapas	26
2.5.1 Cultivo Aeróbico	26
2.5.2 Cultivo Anaeróbico	26
2.6 Cuantificación de clorofila	27
2.7 Cuantificación de carbohidratos (almidón)	28
2.8 Cuantificación de biohidrógeno	29
2.9 Análisis estadístico	29
CAPITULO 3	30
RESULTADOS y DISCUSIÓN	30
3.1 Cultivos microalgales	30
3.2 Curvas de crecimiento	31
3.3 Cuantificación de clorofila (etapa aeróbica)	33
3.4 Cuantificación del almidón (etapa aeróbica)	35
3.5 Cultivos anaeróbicos con ausencia de azufre	36
3.6 Cuantificación de clorofila (etapa anaeróbica)	36
3.7 Cuantificación del almidón (etapa anaeróbica)	38
3.8 Cuantificación en la producción de hidrógeno	40
CONCLUSIONES	43
PERSPECTIVAS	44
BIBLIOGRAFÍA:	45
ANEXOS	56

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura por rayos X de la [FeFe] hidrogenasa [17].	9
Figura 2. Procesos bioquímicos que ocurren en relación al azufre. a) Condiciones con azufre: funcionamiento normal del fotosistema II (PSII), síntesis del ATP, producción de oxígeno e inactivación de la enzima hidrogenasa y ciclo de Calvin activo; y b) Condiciones de ausencia de azufre: disminuye la actividad del fotosistema II (PSII) y la del ciclo de Calvin (causada por el agotamiento de la enzima Rubisco), y se promueve la actividad de la hidrogenasa como resultado de las condiciones anaeróbicas [40].	11
Figura 3. Complejo almidón (hélice de color blanco)-yodo (esferas de color morado) [88].	13
Figura 4. Estrategia experimental que se llevará a cabo con las especies de estudio de Coelastrum (COE-1) y Scenedesmus (SCRE-1 y SCRE-2).	23
Figura 5. Fórmula y cuadrantes en los que se realizó el conteo celular de la cámara Neubauer.	25
Figura 6. Cultivo anaeróbico. A) Medio TAP con ausencia de azufre; B) Limpieza de la jeringa y toma de nitrógeno gas; C) Toma de medio TAP con ausencia de azufre; D) Inyección de nitrógeno gas al inóculo; E) Inyección del inóculo a la botella con medio TAP con ausencia de azufre y F) Succión de aire.	27
Figura 7. Cultivo de Coelastrum sp. (COE-1) con aglomerados celulares.	30
Figura 8. Curvas de crecimiento de Coelastrum sp. (COE-1); Scenedesmus sp. (SCRE-1 y SCRE-2).	31
Figura 9. Curvas de crecimiento de COE-1, SCRE-1 y SCRE-2 durante la etapa anaeróbica.	32
Figura 10. Clorofila obtenida de las especies, Coelastrum sp. (COE-1) y Scenedesmus sp. (SCRE-1 y SCRE-2).	33
Figura 11. Concentración de clorofila de los cultivos en etapa aeróbica de Coelastrum sp. (COE-1) y Scenedesmus sp. (SCRE-1 y SCRE-2). Valores con letras mayúsculas indican diferencias significativas entre especies. Letras minúsculas indican diferencias significativas entre tiempo de cultivo. ANOVA de dos vías y a posteriori prueba de Tukey ($\alpha=0.05$, $A > B$, $a > b > c > d$, valor promedio \pm DE, $n=3$).	34
Figura 12. Concentración de Almidón de los cultivos etapa aeróbica de Coelastrum sp. (COE-1) y Scenedesmus sp. (SCRE-1 y SCRE-2). Valores con letras mayúsculas indican diferencias significativas entre especies. Letras minúsculas indican diferencias significativas entre tiempo de cultivo. ANOVA de dos vías y a posteriori prueba de Tukey ($\alpha=0.05$, $A > B$, $a > b > c$, valor promedio \pm DE, $n=3$).	35
Figura 13. Concentración de clorofila de Coelastrum sp. (COE-1) y Scenedesmus sp. (SCRE-1 y SCRE-2) en etapa anaeróbica. Valores con letras mayúsculas indican diferencias significativas entre especies. Letras minúsculas indican diferencias significativas entre tiempo de cultivo. ANOVA de dos vías y a posteriori prueba de Tukey ($\alpha=0.05$, $A > B > C$, a valor promedio \pm DE, $n=3$).	37
Figura 14. Concentración de Almidón de los cultivos en etapa anaeróbica de Coelastrum sp. (COE-1) y Scenedesmus sp. (SCRE-1 y SCRE-2). Valores con letras mayúsculas	

indican diferencias significativas entre especies. Letras minúsculas indican diferencias significativas entre tiempo de cultivo. ANOVA de dos vías y a posteriori prueba de Tukey ($\alpha=0.05$, $A > B$, $a > b > c > d$, valor promedio \pm DE, $n=3$). 38

Figura 15. Porcentaje de H₂ de los cultivos en etapa anaeróbica de *Coelastrum* sp. (COE-1) y *Scenedesmus* sp. (SCRE-1 y SCRE-2). Valores con letras mayúsculas indican diferencias significativas entre especies. Letras minúsculas indican diferencias significativas entre tiempo de cultivo. ANOVA de dos vías y a posteriori prueba de Tukey ($\alpha=0.05$, $A > B$, $a > b > c > d$, valor promedio \pm DE, $n=3$). 40

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Condiciones de cultivo para la producción de hidrógeno en microalgas.....	16
Tabla 2. Composición del medio TAP	56
Tabla 3. Composición medio TAP (tris-acetato-fosfato) modificado.....	58

GLOSARIO

ABSORBANCIA: Cantidad de luz absorbida por una muestra a una determinada longitud de onda, misma que dependerá de la composición y la concentración de los elementos de la muestra.

ALMIDÓN: Carbohidrato de reserva y posible sumidero de electrones.

AUTOTRÓFICO: Metabolismo celular que utiliza luz, ya sea natural o artificial, como fuente de energía y CO₂ como fuente de carbono.

BIOCOMBUSTIBLES: Combustibles producidos a partir de biomasa, surgen como una alternativa ante la problemática global ya que son menos contaminantes que los combustibles fósiles.

BIOFOTOLISIS: Descomposición del agua en H₂ y O₂ mediante fotosíntesis realizada por las algas, plantas y bacterias.

BIOFOTOLISIS DIRECTA: Proceso de descomposición de la molécula de agua por medio de la luz absorbida, permitiendo la transferencia de electrones a la enzima hidrogenasa para la generación de H₂.

BIOFOTÓLISIS INDIRECTA: Proceso también conocido como vía independiente del PSII, que consiste en dos etapas; la primera de fotosíntesis para la acumulación de carbohidratos; los cuales son utilizados en una segunda etapa de producción de H₂.

BIOMASA MICROALGAL: Biomasa orgánica producida a partir de CO₂ y luz.

CEPA: Grupo de células de una misma especie perteneciente a una muestra particular.

CÁMARA DE NEUBAUER: Instrumento empleado para realizar conteos celulares.

CLOROFILAS: Es el principal fotoreceptor de luz, absorbiendo fotones de luz resultando la excitación de electrones en la fotosíntesis.

DENSIDAD ÓPTICA: Es la relación logarítmica entre la luz transmitida o reflejada y la luz incidente.

ESPECTROFOTÓMETRO: Instrumento que proyecta un haz de luz útil para medir la cantidad de luz absorbida por una muestra.

FERMENTACIÓN OSCURA: Proceso realizado en condiciones de oscuridad por bacterias anaerobias y algunas microalgas que utilizan sustratos ricos en carbohidratos para producir H_2 .

FOTOFERMENTACIÓN: Proceso que utiliza luz y compuestos reducidos, como ácidos orgánicos realizado por bacterias púrpuras que producen H_2 , catalizado por la enzima nitrogenasa bajo condiciones deficientes en N_2 .

FOTOSÍNTESIS: Proceso físico-químico por el cual las microalgas u otros organismos con clorofila utilizan la energía de la luz solar para sintetizar compuestos orgánicos.

HETEROTRÓFICO: Metabolismo celular en el que la energía y el carbono provienen de la oxidación de sustratos orgánicos.

HIDROGENASA: Enzima con alta sensibilidad al oxígeno que cataliza la producción o la oxidación del H_2 .

LONGITUD DE ONDA: Distancia entre una cresta a otra cresta, entendiéndose como cresta como el pico alto de una onda y se representa mediante la letra griega lambda (λ).

MIXOTRÓFICO: Metabolismo celular en el que se utiliza la luz como fuente de energía, pero con presencia de una fuente de carbono orgánico.

PSII (Fotosistema II): Primer fotosistema en funcionar que absorbe luz del rojo de 680nm, produciendo un oxidante muy fuerte capaz de oxidar al agua, liberando O_2 , generando un flujo de electrones al complejo citocromo b_6f y la reducción de la plastoquinona.

PSI (Fotosistema I): Segundo fotosistema funcional que absorbe luz del rojo lejano de 700nm, produciendo un reductor fuerte capaz de reducir NADP.

RESUMEN

La producción de biohidrógeno a partir de microalgas, puede ser una alternativa a los energéticos derivados de fósiles. Debido a la diversidad de especies microalgales, el presente trabajo evaluó bajo biofotólisis indirecta, el potencial de tres especies de microalgas verdes *Coelastrum* sp. (COE-1) y *Scenedesmus* sp. (SCRE-1 y SCRE-2) para la producción de biohidrógeno en condiciones limitantes de azufre. Los experimentos se llevaron a cabo en dos etapas, siempre bajo luz continua a $90 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ y $(25 \pm 2) \text{ }^\circ\text{C}$: aeróbica y anaeróbica. En la etapa aeróbica los cultivos fueron en medio Tris-acetato-fosfato (TAP, por sus siglas en inglés) y con agitación de 150 rpm. Durante su crecimiento se analizó: curva de crecimiento, concentración de clorofila y almidón. En la etapa anaeróbica, los cultivos se transfirieron a medio TAP sin azufre (TAP-S), se analizó clorofila, almidón e H_2 . Los resultados obtenidos en etapa aeróbica revelaron que *Coelastrum* sp. (COE-1) y *Scenedesmus* sp. (SCRE-1) presentaron menor concentración celular, que *Scenedesmus* sp. (SCRE-2) lo que resultó en menor contenido de clorofila, y favoreció la concentración de almidón. En etapa anaeróbica se evidenció una concentración ascendente de almidón y disminución de clorofila resultando en la presencia de H_2 . El máximo de producción de H_2 se obtuvo a las 96 h. *Coelastrum* (COE-1) con la mayor producción 17.1 %, mientras que las especies de *Scenedesmus* SCRE-1 y SCRE-2, presentaron valores similares con 6.6 y 6.8 %, respectivamente.

ABSTRACT

The production of biohydrogen from microalgae can be an alternative to the energetic derived from fossils. Due to the diversity of microalgal species, the present work evaluated under indirect biophotolysis, the potential of three species of green microalgae *Coelastrum* sp. (COE-1) and *Scenedesmus* sp. (SCRE-1 and SCRE-2) for the production of biohydrogen under limiting sulfur conditions. The experiments were carried out in two stages, always under continuous light at $90 \mu\text{mol} / \text{m}^2 / \text{s}$ and $(25 \pm 2) ^\circ \text{C}$: aerobic and anaerobic. In the aerobic stage, the cultures were in Tris-acetate-phosphate (TAP) medium and with agitation of 150 rpm. During its growth, the following were analyzed: growth curve, chlorophyll and starch concentration. In the anaerobic stage, the cultures were transferred to TAP medium without sulfur (TAP-S), chlorophyll, starch and H_2 were analyzed. The results obtained in the aerobic stage revealed that *Coelastrum* sp. (COE-1) and *Scenedesmus* sp. (SCRE-1) presented a lower cell concentration than *Scenedesmus* sp. (SCRE-2) which resulted in a lower chlorophyll content, and favored the starch concentration. In the anaerobic stage, an ascending concentration of starch and a decrease in chlorophyll resulting in the presence of H_2 are evident. The highest H_2 production was obtained at 96 h. *Coelastrum* sp. (COE-1) with the highest production with 17.1 %, while the *Scenedesmus* species SCRE-1 and SCRE-2, presented similar values with 6.6 and 6.8 % respectively.

INTRODUCCIÓN

El aumento de la población y del consumo de energía por persona, han generado altas demandas en la explotación de los recursos, especialmente de los combustibles fósiles. Como consecuencia directa, el aumento en las emisiones de CO₂ a la atmósfera y por consiguiente el incremento de la temperatura en el planeta, son escenarios inminentes y actuales [1].

La producción de biocombustibles, es una alternativa de gran importancia para la disminución de la contaminación ambiental y el calentamiento global, a fin de reemplazar las reservas de petróleo que se están agotando [2,3]. El hidrógeno como combustible, posee 2.8 veces más cantidad de energía por unidad de masa que el gas natural y la gasolina; teniendo como subproducto de su combustión el agua. Sin embargo, el inconveniente principal del hidrógeno es la falta de accesibilidad en la naturaleza [2,3]. En este sentido, la producción biológica del hidrógeno a partir de microalgas verdes, es una alternativa que se explora actualmente. Estos microorganismos fotosintéticos no contribuyen a las emisiones de CO₂; metabolizan el CO₂ mediante el ciclo de Calvin para la formación de compuestos orgánicos y para desarrollar sus funciones vitales [1].

Existen dos vías fotobiológicas de producción de hidrógeno en las microalgas verdes, la primera, ocurre por biofotólisis directa (la producción de H₂ ocurre por la reducción catalítica mediante las enzimas hidrogenasas de electrones y protones liberados por la fotólisis del agua), e indirecta (la producción de H₂ ocurre a partir de los electrones provenientes del catabolismo de los carbohidratos) [3,4].

Al momento, no se tiene información sobre la producción de biohidrógeno a partir de microalgas a gran escala, debido a que esta tecnología aún no está madura. Como principal limitación se encuentra el establecimiento de las condiciones de crecimiento (luz, temperatura, el pH y fuente de carbono) para cada una de las especies microalgales y la inhibición mediante el proceso, de la enzima hidrogenasa por su sensibilidad al oxígeno [3].

En este sentido la ausencia de nutrientes como el azufre en el medio de cultivo microalgal y, la separación temporal de la fotosíntesis oxigénica de la producción de hidrógeno mediante la biofotólisis indirecta, promueven el bloqueo de la fotosíntesis oxigénica en el fotosistema II (PSII), con lo cual se evita la ruptura de la molécula de agua (factor principal

de la generación de oxígeno como un subproducto), resultando en un estado anaeróbico que induce la actividad de la enzima hidrogenasa para la producción de hidrógeno [3,4, 5].

Debido a la diversidad de especies microalgales aún sin explorar para la producción de hidrógeno, este trabajo tiene por objetivo evaluar el potencial de tres especies de microalgas del grupo de las clorofíceas y pertenecientes a dos géneros *Coelastrum* (COE-1) y *Scenedesmus* (SCRE-1 y SCRE-2); para producir biohidrógeno por biofotólisis indirecta bajo condiciones limitantes de azufre.

CAPITULO 1

ANTECEDENTES

1.1 Frente a la problemática global de emisiones de CO₂ y el calentamiento global.

La fuerte demanda de los combustibles fósiles ha causado un importante impacto negativo, ocasionando acumulación de gases de efecto invernadero como el dióxido de carbono (CO₂), metano (CH₄), óxidos de nitrógeno (NO_x), y dióxido de azufre (SO₂), calentamiento global, lluvias ácidas y contaminación en general de suelo y agua. Adicionalmente, las reservas actuales de los combustibles fósiles se agotan, lo que conlleva a la búsqueda de nuevas fuentes energéticas eficientes y renovables para sustituir a los combustibles fósiles [6,7].

Una opción factible para satisfacer la demanda de combustibles y un cambio significativo al ambiente es el uso de biocombustibles limpios y sostenibles que provengan de fuentes renovables y amigables con el ambiente. Las microalgas son microorganismos que poseen altas tasas de producción de biomasa y poseen metabolitos útiles para la producción de biocombustibles, además de que estos microorganismos por su naturaleza metabólica llegan a capturar el CO₂, contribuyendo a la reducción de las emisiones [8].

1.2 Alternativa de los biocombustibles a partir de microalgas.

Los biocombustibles son recursos energéticos y alternativas eficientes para contribuir ante la problemática global y la crisis energética. La clasificación de los biocombustibles depende de la materia prima utilizada, en primera, segunda y tercera generación y por la tecnología implementada [9].

Los biocombustibles primeramente utilizados son los de *primera generación* para la elaboración de bioetanol y biodiesel, que proceden de cultivos agrícolas y comestibles, como el jugo de caña de azúcar, los granos de maíz, el aceite de palma, aceite de coco, entre otros. Su uso prioritario para la producción de biocombustibles, ha provocado controversias con respecto a su uso como alimento. Además para su cultivo, requiere de

grandes extensiones de tierra provocando inicialmente deforestación de una gran área, ocasionando contaminación del suelo por el uso de pesticidas o fertilizantes, y altas demandas del uso del agua [9, 10, 11]. Los biocombustibles de *segunda generación* ha sido una propuesta atractiva para la producción de etanol y metanol principalmente, la materia prima empleada son desechos orgánicos como el bagazo de la caña de azúcar, paja de trigo, hojas, ramas secas, etc. La principal problemática, es la remoción del material lignocelulósico, lo que conlleva a la aplicación de pretratamientos con base en las propiedades de la biomasa, involucrando un aumento en los costos de producción [10, 12, 13].

En los biocombustibles de *tercera generación*, se considera a los organismos autótrofos como las microalgas, ya que tienen un crecimiento rápido y altas densidades energéticas que se encuentran almacenadas en sus componentes químicos [60]. Los biocombustibles a partir de microalgas ofrecen mayores ventajas: a) no compiten por tierras con los cultivos alimenticios, ni requiere de herbicidas ni pesticidas para su cultivo; b) requieren menor espacio y agua dulce; c) sus requerimientos nutricionales son muy sencillos; d) producen biomasa en menor tiempo por su rápido crecimiento durante todo el año; y e) contienen altos contenidos de lípidos y carbohidratos útiles para producir biocombustibles como biodiesel, biogás, y biohidrógeno. La principal ventaja de las microalgas, es su contribución al secuestro de CO₂ durante su crecimiento, debido a que la producción de 1 kg de biomasa de algas secas requiere aproximadamente 1.83 kg de CO₂ [1, 7, 12].

1.3 Hidrógeno como combustible

El hidrógeno presenta múltiples aplicaciones, en la industria química, en la producción de derivados electrónicos y como vector energético posee 122 kJ/g de rendimiento energético [15, 16, 17], lo cual es 2.8 veces mayor que los combustibles fósiles, por lo que en un futuro cercano cobrará mayor relevancia en los ámbitos de transporte y de la producción de electricidad [14]. La obtención aún tiene altos costos energéticos en el proceso; por ejemplo, la gasificación, la electrólisis del agua y procesos termoquímicos. Sin embargo, en años recientes existe una nueva forma para obtener hidrógeno, conocida como “tecnología verde”, mediante la utilización de organismos para producir hidrógeno [6].

La producción de hidrógeno a partir de microorganismos es una alternativa para la sustitución de los combustibles fósiles, además como combustible es ecológico, eficiente, renovable y no genera CO₂ ni NO_x en pequeñas cantidades. Conforme a esto, la producción biológica de hidrógeno posee varias ventajas sobre los procesos convencionales de producción de hidrógeno [18].

1.4 Producción biológica de hidrógeno

La producción de biohidrógeno a partir de microorganismos, puede darse por tres diferentes procesos, por fermentación oscura, fotofermentación y biofotólisis. La fermentación oscura, ocurre por la actividad metabólica de bacterias anaerobias que emplean carbohidratos y compuestos orgánicos como sustrato. Este proceso se caracteriza por una alta producción de H₂ y CO₂ como subproducto. Sin embargo, también se producen ácidos orgánicos y alcoholes, contaminantes de agua y presenta baja eficiencia de conversión de energía y acumulación de ácidos grasos volátiles (AGVs), los cuales pueden ocasionar inhibiciones durante el proceso. Por ello una alternativa eficiente es la combinación con procesos fotobiológicos para que los residuos de los AGVs restantes de la fermentación sean utilizados en su gran mayoría [16, 19, 20].

La fotofermentación es realizada por bacterias púrpuras y pueden utilizar los ácidos grasos, subproductos de la fermentación oscura, como fuente de energía. Este proceso requiere un amplio rango de luz y la eficiencia de conversión es baja. La principal desventaja es la producción de oxígeno, el cual puede inhibir a las nitrogenasas y reducir la producción de H₂ [21].

La biofotólisis es efectuada por las cianobacterias y microalgas verdes, y están clasificadas en dos procesos distintos, directos o dependientes del fotosistema II (PSII) e indirectos o independientes del fotosistema II (PSII) [17, 22]. Ambos procesos tienen alta eficiencia, solo requieren agua, luz y fuente de carbono usualmente para la biofotólisis indirecta, siendo los gases resultantes, hidrógeno y oxígeno. La presencia de éste último ocasiona la inhibición de la enzima hidrogenasa [17, 23].

1.5 Fotosíntesis en microalgas verdes

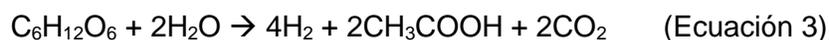
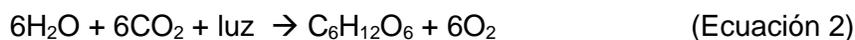
El proceso de fotosíntesis en las microalgas verdes, libera oxígeno molecular y utiliza el CO_2 de la atmósfera para sintetizar compuestos orgánicos. Se lleva a cabo en dos etapas, la etapa de reacciones de captación de energía y la etapa de reacciones de fijación del carbono [24]. La primera etapa, se realiza en la membrana de los tilacoides, estructura predominante de los cloroplastos de las algas verdes. Estas estructuras responden ante el efecto destructor de la luz, estrés oxidativo y tienen la capacidad de repararse constantemente. Su función principal es transformar la energía solar en energía química en forma de ATP y NADPH^+ , que serán utilizados en la etapa de reacciones de fijación de carbono. La segunda etapa ocurre en el estroma del cloroplasto, y son utilizados el ATP y el NADPH de la primera etapa para la síntesis de carbohidratos a partir de la fijación del CO_2 por la enzima Ribulosa-1,5-bisfosfato carboxilasa/oxigenasa (Rubisco) [7, 25].

Las microalgas poseen dos sistemas fotosintéticos: el fotosistema II (PSII) altamente oxidante donde ocurre la oxidación del agua y el fotosistema I (PSI) altamente reductor donde ocurre la reducción de NADP^+ , ambos fotosistemas están conformados por un complejo antena (clorofilas) que captan la luz y la energía generada se transfiere al centro de reacción que se excita y libera los electrones a través de la cadena transportadora de electrones para la formación de ATP [24, 26].

1.6 Biofotólisis y el metabolismo de las microalgas para la producción de hidrógeno

La biofotólisis, también conocida como fotodisociación biológica del agua [3], es una ruta alterna de la fotosíntesis bajo condiciones anaeróbicas para producir H_2 en microalgas [27]. La biofotólisis puede ser directa e indirecta, la primera obtiene electrones mediante la oxidación de la molécula del agua (electrones, protones y oxígeno), energía lumínica, que mediante la ferredoxina entrega los electrones a la enzima hidrogenasa para la reducción de protones en H_2 y de igual forma resulta una producción de O_2 (Ecuación 1). Sin embargo, la biofotólisis indirecta en comparación de la directa, separa las reacciones de producción de H_2 y O_2 lo que resulta favorable a la enzima hidrogenasa para evitar su inhibición por el oxígeno [27]. La biofotólisis indirecta ocurre en dos etapas, en la primera las células

microlagales sintetizan compuestos orgánicos a través de la fotosíntesis (Ecuación 2), mientras que en la segunda etapa en condiciones anaeróbicas, se lleva a cabo la degradación de los compuestos orgánicos almacenados, como el almidón para las microlagas verdes (Ecuación 3) [24, 28].



1.7 Biofotólisis indirecta

La biofotólisis indirecta genera una separación temporal o espacial de la generación de O_2 y las reacciones de producción de H_2 . Para lograr esto, el proceso se lleva a cabo en dos etapas, en la primera la célula microalgal crece aeróbicamente, realiza la fotosíntesis por lo que produce O_2 y de igual forma se acumula carbono en forma de biomasa. En la segunda etapa, bajo ausencia de azufre las células microalgales modifican la fotosíntesis y su metabolismo para su supervivencia, sin dejar de generar ATP y previniendo el daño oxidativo, como respuesta ante la ausencia de azufre [29]. En las primeras 24 h de ausencia de azufre se produce una disminución de la actividad fotosintética por debajo de del nivel de respiración, debido al detenimiento de la síntesis de aminoácidos azufrados como la cisteína y metionina de la proteína D1 del PSII, ocasionando también el detenimiento del crecimiento celular. Mientras que la respiración permanece constante, lo que resulta en un consumo de oxígeno induciendo condiciones anaeróbicas [36]. El ciclo de Calvin también se ve afectado ante la ausencia de azufre puesto que la proteína ribulosa-1,5-bifosfato carboxilasa/oxigenasa (Rubisco) está conformada por aminoácidos ricos en azufre [46].

Además, la ausencia de azufre conduce a la acumulación de carbohidratos, en forma de almidón en las microalgas verdes. Estos carbohidratos, son consumidos por el metabolismo resultando un exceso de electrones que podrán ser eliminados. Los electrones del NADPH^+ son transferidos a la plastoquinona por medio de la enzima NADPH -plastoquinona oxidoreductasa lo que volverá el proceso independiente del fotosistema II. Esta vía de electrones alternativa, creará un ambiente anaeróbico, lo que permitirá la expresión de la

enzima hidrogenasa que junto con la ferredoxina catalizan la conversión de dos protones (2H^+) a hidrógeno gaseoso H_2 . Los electrones generados de la actividad residual del PSII y los de la plastoquinona se transfieren al fotosistema I, luego a la ferredoxina, una proteína situada entre el tilacoide y el estroma que donará los electrones a la enzima hidrogenasa, capaz de combinar los protones (H^+) y los electrones provenientes de la ferredoxina reducida para la producción de H_2 [30, 31].

Las condiciones anaeróbicas ocasionadas por la vía independiente del fotosistema II, favorecen la actividad de las enzimas hidrogenasas para catalizar la reducción de los protones (H^+) a H_2 molecular. Por esta razón el proceso requiere de la eliminación del oxígeno para la activación de las enzimas y mejorar la producción de hidrógeno [22].

1.8 Hidrogenasas para la producción de hidrógeno

Las hidrogenasas son las metaloenzimas claves para la producción de hidrógeno en las microalgas verdes a partir de la reducción de protones (H^+). La primera secuencia génica reportada fue la hidrogenasa en *Scenedesmus obliquus* [32]. Catalizan la reacción de modo reversible en condiciones anaeróbicas estrictas, y de modo irreversible [33], por lo que las enzimas pueden tanto producir como consumir el H_2 , dependiendo de las condiciones medioambientales en las que se encuentre [31].



Existen tres clases diferentes de hidrogenasas dependiendo del contenido metálico de su centro activo, las conformadas por dos núcleos de Fe: [FeFe] hidrogenasa, las que tienen un átomo de Ni y uno de Fe: [NiFe] hidrogenasa y la que solo posee un átomo de Fe: hidrogenasa, particularmente en arqueas metanogénicas [17]. Una característica particular de las hidrogenasas es que los átomos de Fe están unidos a pequeños ligandos no proteínicos como el CN y CO. El sitio activo de la enzima es altamente sensible al oxígeno.

Las [FeFe]-hidrogenasas son 100 veces más activas que las demás hidrogenasas, su función principal es remover los equivalentes de H^+ excesivos en los microorganismos anaerobios estrictos [6, 34]. Posee un peso molecular de 45- 50 kDa, su sitio activo se le

denomina clúster-H y está conformado por un grupo $[\text{Fe}_4\text{S}_4]$ vinculado a la cisteína (Figura 1). Los dos átomos de Fe se vinculan con un ligando de cianuro (CN^-) y uno de carbono (CO), un CO conecta los dos átomos de Fe. La inhibición de su actividad puede estar mediada por la presencia de oxígeno ya que son altamente sensibles [35, 36], de igual forma por altas concentraciones de su producto hidrógeno [6].

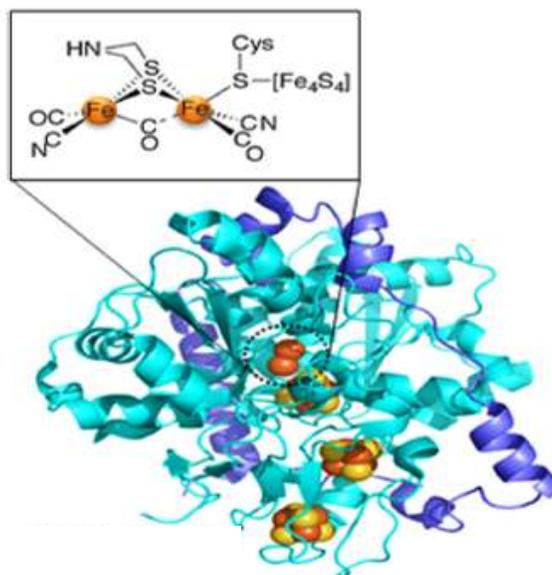


Figura 1. Estructura por rayos X de la $[\text{FeFe}]$ hidrogenasa [17].

La actividad de las enzimas va de acuerdo a la obtención de electrones, ya sea mediante biofotólisis directa por la oxidación de la molécula de agua, o por biofotólisis indirecta por la degradación de moléculas orgánicas [22, 37].

1.9 Alternativas biotecnológicas para inducir la producción de hidrógeno.

El azufre es un componente importante en las microalgas verdes, ya que es constituyente de algunos componentes de la pared celular, pero también de los aminoácidos como la cisteína y metionina del fotosistema II (PSII). Las microalgas aprovechan el azufre en forma de sulfato y lo asimilan en el cloroplasto [38].

La ausencia de azufre y sustitución por sales y cloruro, ha incrementado la producción de hidrógeno [39]. Esta ausencia provoca la separación de la fotosíntesis de la producción de H_2 , conduciendo una disminución en el funcionamiento del fotosistema II, el fotosistema I (PSI) no es afectado [41, 42]. Debido a que el PSII, está conformado por proteínas ricas en azufre como la D1 (aminoácidos cisteína y metionina), la tasa fotosintética a partir de las 10-18 h comienza a disminuir, siendo casi nula a las 24 h. La finalidad principal de la ausencia de azufre es crear un ambiente anaeróbico, esto se logra debido a que disminuye la actividad del PSII y por consiguiente la evolución de oxígeno. El oxígeno residual, se agota a través de la respiración, induciendo condiciones anaeróbicas en el cultivo de las microalgas, de esa forma, se promueve la actividad catalítica de la hidrogenasa, para la reducción de protones y electrones en la forma de H_2 molecular [6, 40] (Figura 2).

La ausencia de azufre, también promueve la acumulación de carbohidratos de reserva como el almidón en las microalgas verdes, resultando una fuente de electrones útiles para el proceso de producción de H_2 [36].

Fedorov y colaboradores en el 2005, realizaron por primera vez la fotoproducción continua de hidrógeno con ausencia de azufre, mediante la separación del crecimiento fotosintético, por aproximadamente 4000 h utilizando dos fotobiorreactores. Observaron que, si se le agregaba azufre a los cultivos después de la producción de hidrógeno, éstos se recuperaban y podían ser sometidos nuevamente a ausencia de azufre. Lo cual ocasionó la recuperación de la actividad residual del fotosistema II, mediante la oxidación del agua.

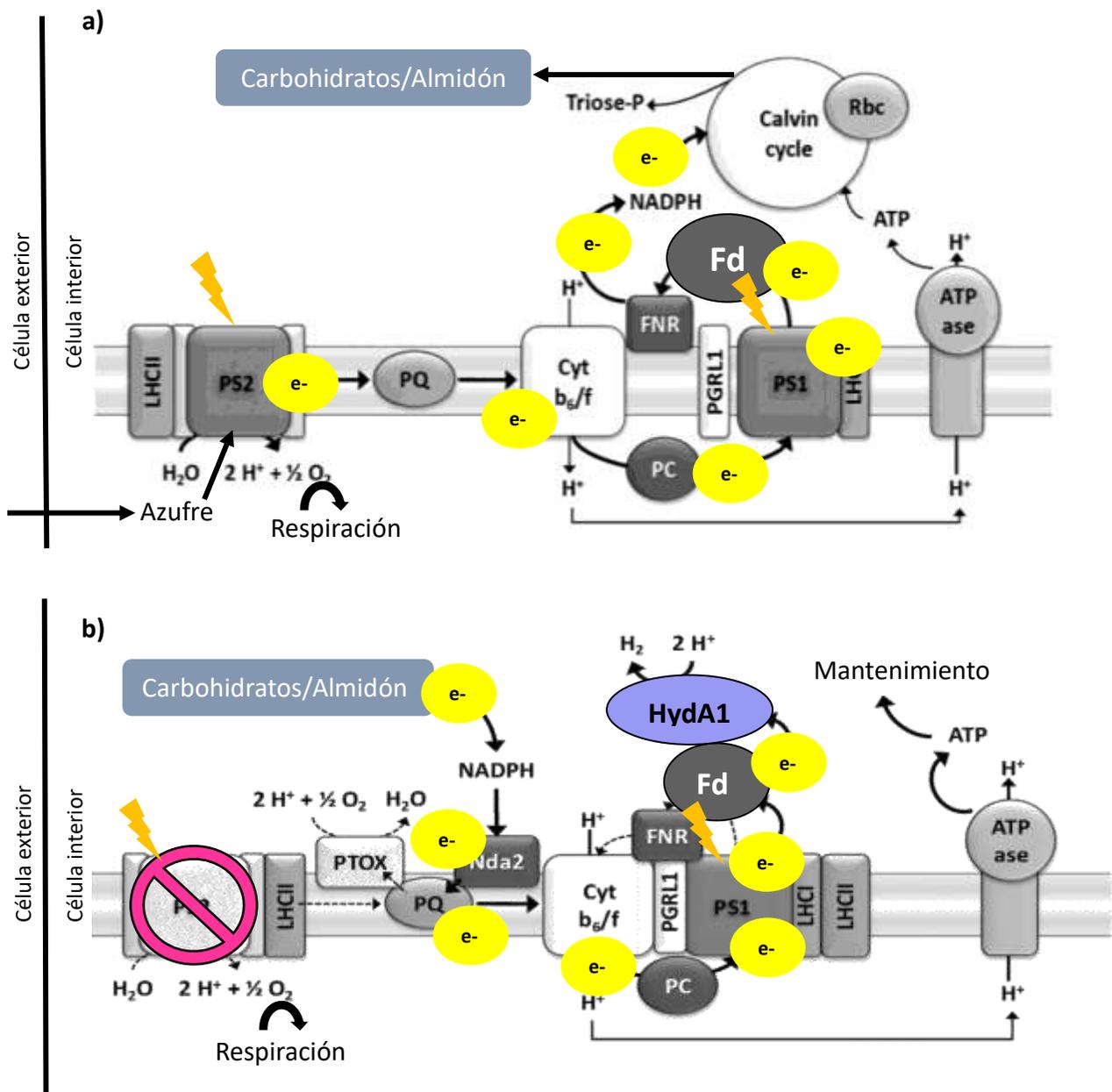


Figura 2. Procesos bioquímicos que ocurren en relación al azufre. a) Condiciones con azufre: funcionamiento normal del fotosistema II (PSII), síntesis del ATP, producción de oxígeno e inactivación de la enzima hidrogenasa y ciclo de Calvin activo; y b) Condiciones de ausencia de azufre: disminuye la actividad del fotosistema II (PSII) y la del ciclo de Calvin (causada por el agotamiento de la enzima Rubisco), y se promueve la actividad de la hidrogenasa como resultado de las condiciones anaeróbicas [40].

1.10 Medición de clorofila

A principios del siglo XX se dieron a conocer las estructuras químicas de la clorofila a y b (sistemas de recolección de luz). Éstas clorofilas están presentes en Clorofíceas (algas verdes), Euglenofíceas, Chlorarachniophytes y cianobacterias. La función de la clorofila a, es realizar reacciones fotoquímicas tanto en el fotosistema I (PSI) y II (PSII) [44].

La cuantificación de clorofila a, permite estudiar de manera indirecta la biomasa en los cultivos. Para estimarla se emplean diferentes métodos (espectrofotométrico y cromatográficos), procedimientos (sonificación, calentamiento y congelamiento) y modelos matemáticos (para minimizar los errores debido a la presencia de otros pigmentos). Los principales solventes empleados son acetona, metanol, etanol, entre otros [45].

La concentración de clorofila en la producción de hidrógeno es un indicativo de las reacciones de transferencia de electrones, la distribución de energía dentro del aparato fotosintético y el efecto del crecimiento de los cultivos microalgales, en ambas etapas (aeróbica y anaeróbica) [46]. De acuerdo a estudios, en la fase aeróbica la clorofila a aumenta y en la fase anaeróbica (con ausencia de azufre), disminuye [43].

1.11 Medición de carbohidratos (almidón)

Las microalgas verdes almacenan carbohidratos en forma de almidón, que se sintetiza y almacena en los cloroplastos, llegando a proporcionar energía para diferentes procesos metabólicos y la adaptación a diferentes condiciones ambientales [69]. El almidón está conformado principalmente por dos polisacáridos: la amilosa, un polímero lineal formado por unidades de glucosa y unidas entre sí, principalmente por enlaces α (1-4) con muy pocos enlaces α (1,6) adoptando una forma helicoidal. Este polímero constituye del 25 hasta un 30% del almidón, mientras que la amilopectina está formada por cadenas ramificadas debido a los enlaces α -1,6 por cada 30 enlaces α (1,4) y representa un 70-75% del almidón [66].

Los carbohidratos son el sustrato principal para la producción de biocombustibles como el biohidrógeno. En la producción de H_2 , se busca aumentar la concentración de almidón para

que actúe como fuente de electrones por la vía independiente del PSII, por lo que se ha reportado que la ausencia de nutrientes como el azufre permite la acumulación del almidón, ya que detiene la división celular provocando el aumento en la concentración de almidón en las primeras horas de anaerobiosis, obteniéndose resultados favorables para el proceso [69,71].

Una técnica para determinar la presencia del almidón, es la prueba de yodo, en donde se forma un complejo almidón-yodo, produciendo un color violeta, como resultado de la formación de cadenas de poliyoduro (Figura 3).

La amilosa es insoluble en agua, pero llega a hidratarse con moléculas vecinas mediante los puentes de hidrógeno, reacciona con el yodo, formando un complejo de color azul. Mientras que la amilopectina es soluble en agua caliente, y en reacción con las moléculas de yodo producen un color rojo debido a las hélices cortas por lo que no logran juntarse. En cambio, cuando entra en contacto las moléculas de yodo con la combinación de ambos polisacáridos se produce un color violeta, característico del almidón [63].

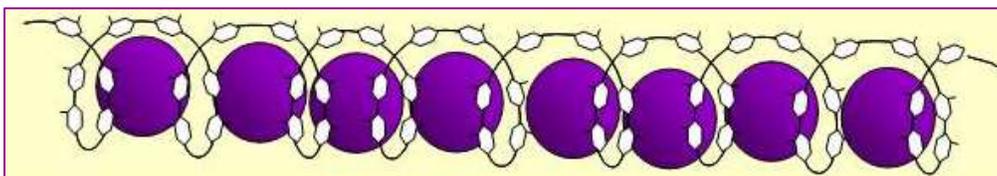


Figura 3. Complejo almidón (hélice de color blanco)-yodo (esferas de color morado) [88].

El complejo yodo-almidón es sensible a la temperatura: altas temperaturas (punto de ebullición) ocasionan la modificación de la estructura del almidón y la liberación de las moléculas de yodo, mientras que en temperatura ambiente, la estructura del almidón se reorganiza y las moléculas de yodo se unen nuevamente [65, 79].

1.12 Parámetros que afectan la producción de H₂

El cultivo de microalgas en producción de hidrógeno debe ser sometido a evaluación en condiciones de luz, temperatura, pH, requerimientos nutricionales y la fuente de carbono en

función de la especie sobre las condiciones ambientales óptimas que favorezcan la producción de H₂ [3, 7,47].

1.12.1 Nutrientes

La presencia o la ausencia de nutrientes en el medio de cultivo pueden ocasionar estrés en las células microalgales, llevando a la modificación de su metabolismo. La ausencia de nutrientes induce la acumulación de carbohidratos de reserva útiles para la generación de Hidrógeno molecular [31].

Entre los nutrientes indispensables para las microalgas está el nitrógeno, constituyente de las macromoléculas incluyendo proteínas y ácidos nucleicos. Por otra parte, el fósforo, es necesario para el crecimiento de las microalgas y la síntesis de ADN y ARN [7,48]. Estudios han demostrado que con un aumento del 10% en la concentración en ambos macronutrientes en el cultivo, provoca que la producción de hidrógeno sea 2,85 moles por cada mol de glucosa [49, 50].

El carbono orgánico o inorgánico, en el medio de cultivo es indispensable para el crecimiento de la microalga y mantenimiento del pH del medio de cultivo [48]. Los compuestos de carbono almacenados en las células microalgales se utilizan para la producción de hidrógeno, junto con la adición de carbono exógeno para el aumento del rendimiento [47].

El acetato en el medio de cultivo, puede llegar a ser una fuente de carbono efectiva en la producción de H₂, resultando un mejor almacenamiento de carbohidratos [47]. Fourchard y colaboradores en el 2005, mencionan que el acetato puede resultar propicio para alcanzar la anaerobiosis en los cultivos bajo ausencia de azufre para la producción de H₂, ya que la ausencia de azufre no resulta suficiente para disminuir la actividad fotosintética del PSII y mantener la anaerobiosis, por lo que el acetato incita y mantiene la respiración para agotar el oxígeno residual de la actividad fotosintética del PSII.

1.12.2 La luz

La luz es un requerimiento indispensable y a la vez limitante para el crecimiento microalgal ya que un suministro insuficiente provocaría una disminución en el crecimiento celular y un exceso de luz puede causar fotoinhibición de las células, dañando directamente al complejo antena de los fotosistemas. Es por esto que se debe adecuar la cantidad necesaria de irradiación (flujo de luz por unidad de área) y fotoperiodo (cantidad de horas luz que serán sometidas a la cantidad de irradiancia). De éste último, 12:12, 18:6, 14:10 son los más empleados en dependencia de los requerimientos de cada especie microalgal, para un óptimo crecimiento e incrementar la producción de biomasa [7, 51].

La luz es un parámetro importante para la eficiencia en la producción de hidrógeno en las microalgas [31] (Tabla 1). Un suministro de luz suficiente (no mayor a $200 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ ya que resulta una intensidad alta para las microalgas) ocasiona más poder reductor y ATP mediante la transferencia de electrones en la fotosíntesis, además de más eficiencia en la reducción del carbono en almidón, con lo cual se promueve el crecimiento y la producción de biomasa en la fase aeróbica. Si no se logra suministrar las cantidades óptimas de luz, pueden cambiar el contenido de pigmentos fotosintéticos, ocasionar cambios en el metabolismo de las microalgas y por consiguiente disminuir la producción de hidrógeno [47, 52].

La intensidad de luz se asocia a la biofotólisis (vía alterna de la fotosíntesis que bajo condiciones anaeróbicas, a través de la fotólisis del agua se produce H_2) debido a que la irradiación en los cultivos bajo ausencia de azufre, causan mejor actividad del PSI por la disminución del PSII, mejorando la producción de H_2 [31].

En este sentido, González et al., 2016 mencionan que las lámparas LEDS son una buena fuente de luz para mejorar la producción de hidrógeno en microalgas. De igual forma ellos observaron que la luz roja y azul promovió mayor producción de hidrógeno que la luz blanca e inclusive la irradiación UV también aumentó la producción de H_2 .

Tabla 1. Condiciones de cultivo para la producción de hidrógeno en microalgas.

Especie microalgal	Temperatura	Irradiación ($\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$)	Medio	Agitación	Cita
<i>C.reinhardtii</i> ; <i>S. vacuolatus</i> ; <i>S.obliquus</i> y <i>C. fusca</i>	20°C	150	TAP	No específica	Winkler et al., 2002
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	20°C	100	TAP	100 rpm	Hemschemeier, 2005
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	(25±1)°C	100	TAP	No específica	Wu et al., 2011
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	(28±1)°C	100	TAP	100 rpm	Kosourov et al., 2012
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	(25±5)°C	202	TAP	por burbujeo de aire	Sánchez-Martín del campo, 2013
<i>Scenedemus obliquus</i>	30°C	100	Omarov modificado	Manual	Papazi et al., 2014
<i>C. gloeopara</i> y <i>S. obliquus</i>	20°C	100	TAP	No agitación	Márquez, 2016
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	24-25°C	90	TAP	120 rpm	Nagy et al., 2016

1.12.3 Temperatura

Otro parámetro fundamental para el crecimiento de las especies microalgales y la producción de H₂ es la temperatura, puesto que, a bajas temperaturas, por debajo de los 16°C, afecta directamente el crecimiento de algunas especies microalgales. Mientras que valores por encima de los 40°C, la célula llega a sufrir daños principalmente en algunas

proteínas y además en la velocidad de las reacciones enzimáticas. Para la obtención de hidrógeno se reportan temperaturas entre los 25 y los 35°C [19].

1.12.4 pH

El pH, es importante para varios procesos bioquímicos y metabólicos de las microalgas [53]. Durante el proceso de fotosíntesis de las microalgas, el pH disminuye debido a la formación de ácido carbónico (H_2CO_3), después incrementa por la evolución del oxígeno como resultado de la fotólisis del agua, es decir, los valores de pH alcalinos son indicativos de una alta actividad fotosintética [53].

En cuanto a la producción de hidrógeno se refiere, una variación de pH puede cambiar las vías metabólicas provocando un bajo rendimiento de hidrógeno. Por ello, este parámetro tiene un papel de suma importancia en la fase aeróbica y anaeróbica [49, 54]. Valores de pH < 5.0, inactivan las enzimas hidrogenasas, resultando en la disminución de la producción de H_2 , como resultado de la formación de CO_2 e hidrógeno del metabolismo anaeróbico de las microalgas. De igual forma, un valor de pH > 9.0 disminuye la producción de hidrógeno [47, 55]. En ausencia de azufre, el pH tiende a ser inestable, afectando la producción de hidrógeno [19].

1.13 Las microalgas verdes *Scenedesmus* sp. y *Coelastrum* sp., para la producción de biohidrógeno.

El hidrógeno ofrece un suministro de energía mayor que la de los combustibles fósiles ya que 5.1172 kJ/kg (2.2 libras) de hidrógeno es equivalente a 14.4212 kJ/kg (6.2 libras) de gasolina [31] y durante su combustión su único subproducto es agua, convirtiéndolo en un biocombustible limpio y amigable con el ambiente [6, 22].

Desde hace ya más de 70 años, se descubrió la capacidad de las microalgas para producir hidrógeno, desde entonces se han realizado estudios para obtener mejores rendimientos como la ausencia de azufre y otros nutrientes, diferentes intensidades de luz, etc. [4, 5, 52].

La especie *Scenedesmus obliquus*, fue la primera especie de microalga utilizada por Hans Gaffron y colaboradores en 1942, para la producción fotosintética de hidrógeno. Entre los trabajos con *Scenedesmus* se puede mencionar el de Papazi y colaboradores en el 2012, en el que se evaluó la producción de hidrógeno por microalgas, utilizando el medio líquido Bishop y Senger modificado con ausencia de azufre sustituidos por sales de cloruro. Los resultados indicaron que la ausencia de azufre, derivó en el incremento en 33% de la producción de hidrógeno, comparado con el tratamiento control.

Márquez-Reyes en el 2016, estudió el efecto de las condiciones ambientales y remoción del O₂ fotosintético sobre el crecimiento y producción de hidrógeno en cultivos de *Chlamydomonas gloeopara*, *C. mexicana*, *C. reinhardtii*, *Chlorella vulgaris* y *Scenedesmus obliquus*. Las condiciones evaluadas fueron: privación de azufre bajo condiciones autotróficas y heterotróficas; irradiancia (100 y 400 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$); temperatura (20, 25 y 30°C) y fuente de carbono (ácido acético y sacarosa). Entre los resultados, las mejores condiciones se observaron bajo condiciones heterotróficas a 100 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$, 25°C y ácido acético como fuente de carbono para la especie *S. obliquus*, la cual presentó mayor producción de H₂ (74 mL H₂/L), en comparación con las demás microalgas, (*C. mexicana*, 62 mL H₂/L; *C. gloeopara*, 30 mL H₂/L y *C. reinhardtii*, 26 mL H₂/L).

Debido a los limitados estudios de diferentes especies microalgales para la producción de H₂, Duangjan y colaboradores en el 2017, estudiaron 90 cepas de 6 diferentes órdenes de microalgas verdes; Chaetophorales (1 cepa), Chlorellales (7 cepas), Sphaeropleales (63 cepas), Ulotrichales (1 cepa), Volvocales (6 cepas) y Zygnematales (12 cepas), de los cuales once resultaron nuevos géneros para la producción de H₂. Las microalgas fueron cultivadas en medio autotrófico Jaworski (JM) (Stein, 1973) y medio mixotrófico TAP, bajo una irradiancia de 54 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ a 25°C con agitación continua. Para la producción de H₂ fueron transferidas a medio limitante de azufre con agitación manual cada dos días desplazando el oxígeno con gas argón. Entre las microalgas estudiadas para la producción de H₂ aparecen por primera vez dos cepas de *Coelastrum*; *C. indicum* AARL G043 produciendo 0.31 $\mu\text{mol H}_2 \text{ mg Chl } a^{-1} \text{ h}^{-1}$ y *C. microporum* AARL G007 0.26 31 $\mu\text{mol H}_2 \text{ mg Chl } a^{-1} \text{ h}^{-1}$, ambas en medio JM-S. Posteriormente en otro estudio más reciente de Chen y colaboradores en el 2019, aislaron e identificaron una nueva cepa microalgal perteneciente al género *Coelastrum* XNY8011 para conocer si es un candidato para la producción de H₂ y de igual forma para la producción de biodiesel. La cepa fue cultivada en medio TAP a (27

$\pm 1^{\circ}\text{C}$) con iluminación continua $50 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$, obteniéndose una producción de H_2 de 32,89 μmol de gas para 1 mg de clorofilas en cultivos de 120 h. Sin embargo, en este estudio no se detalla los métodos de obtención de H_2 ya que el enfoque era conocer el potencial de la cepa como generador de bioenergía.

Con respecto a lo anterior existen trabajos sobre la producción de hidrógeno a partir de *Scenedesmus*, obteniendo mayor cantidad de hidrógeno en comparación con *Chlamydomonas reinhardtii* (microalga más ampliamente utilizada). Sin embargo, existen más trabajos de especies de *Scenedesmus* evaluados para la producción de biodiesel que de H_2 . Mientras que el género *Coelastrum*, ha sido poco estudiado para la producción de biocombustibles. La finalidad de este trabajo es analizar el potencial de tres especies de ambos géneros para la producción de hidrógeno, ya que presentan altas tasas de reproducción celular durante su crecimiento (fase aeróbica), lo cual es favorable para obtener mejores rendimientos en la producción de hidrógeno (fase anaeróbica).

JUSTIFICACIÓN

Las altas emisiones de CO₂ y la búsqueda de nuevas alternativas de combustibles para satisfacer la demanda energética, han motivado el estudio de las microalgas verdes como alternativa para producir hidrógeno mediante dos vías fotobiológicas. El rendimiento del hidrógeno producido varía en función de las condiciones nutrimentales del cultivo y de las especies empleadas. Es por esto que el presente trabajo se enfoca en evaluar el potencial de tres especies de microalgas verdes, pertenecientes al género *Scenedemus* (SCRE-1 y SCRE-2) y *Coelastrum* (COE-1), para producir hidrógeno en condiciones limitantes de azufre.

HIPÓTESIS

Las especies de *Coelastrum* (COE-1) y *Scenedesmus* (SCRE-1 y SCRE-2), tienen el potencial para la producción de hidrógeno en condiciones de ausencia de azufre.

OBJETIVOS

Objetivo general:

Evaluar el potencial de tres especies de microalgas verdes pertenecientes a dos géneros: *Coelastrum* (COE-1) y *Scenedesmus* (SCRE-1 y SCRE-2) para producción de hidrógeno por biofotólisis indirecta en condiciones nutrimentales en ausencia de azufre.

Objetivos específicos:

- Cultivar microalgas en condiciones aeróbicas para la producción de biomasa en medio TAP.
- Evaluar las curvas de crecimiento de las especies de *Coelastrum* (COE-1) y *Scenedesmus* (SCRE-1 y SCRE-2).
- Analizar y cuantificar la cantidad de clorofila de las especies microalgales en condiciones aeróbicas y anaeróbicas.
- Analizar y cuantificar la cantidad del almidón de las especies microalgales en condiciones aeróbicas y anaeróbicas.
- Estudiar cultivos anaeróbicos con ausencia de azufre para la producción de hidrógeno.
- Cuantificar la producción de hidrógeno en condiciones anaeróbicas con ausencia de azufre mediante cromatografía de gases.

CAPÍTULO 2

MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Estrategia experimental

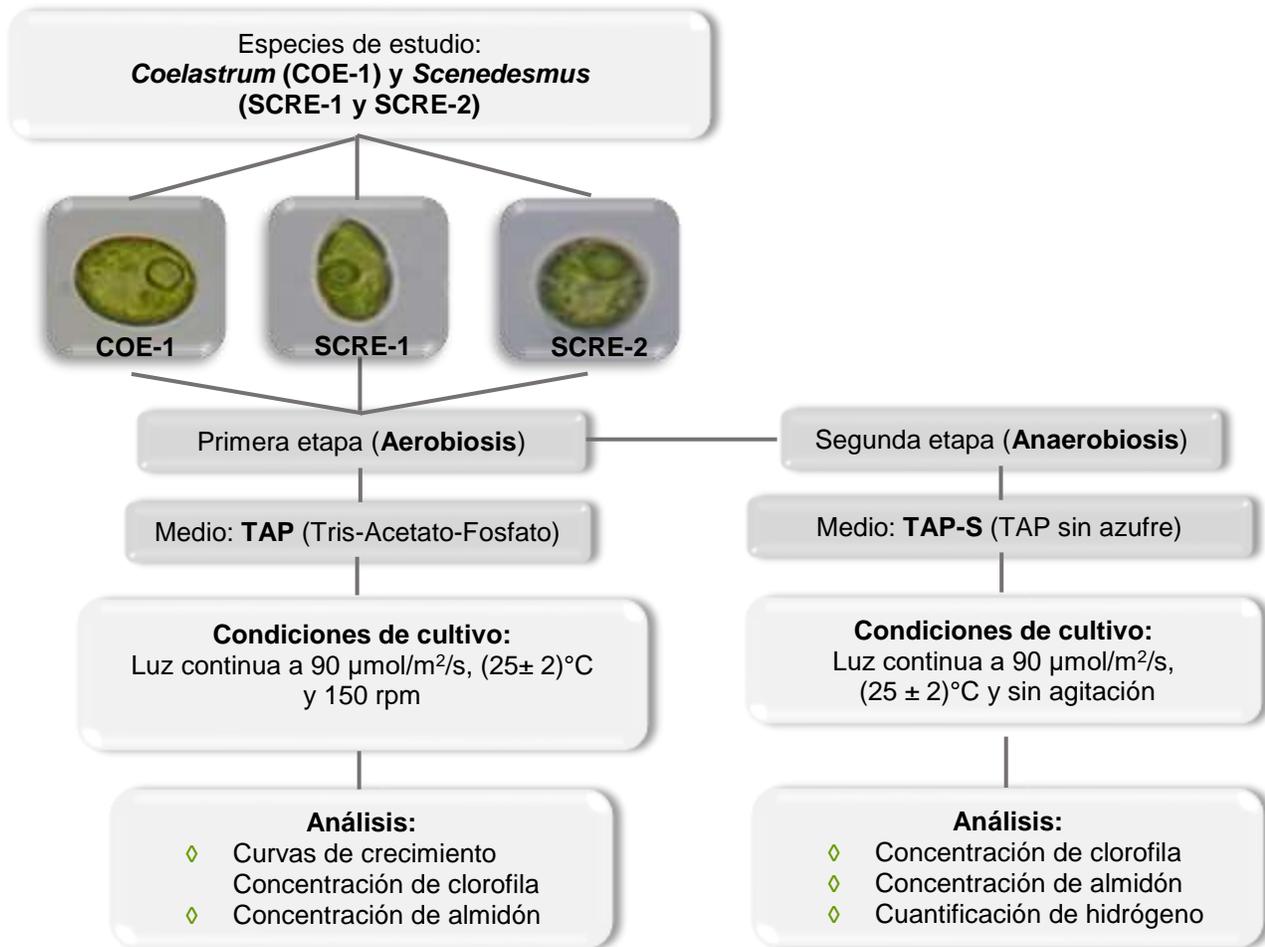


Figura 4. Estrategia experimental que se llevará a cabo con las especies de estudio de *Coelastrum* (COE-1) y *Scenedesmus* (SCRE-1 y SCRE-2).

2.2 Material biológico

Se emplearon tres especies de microalgas verdes (SCRE-1, SCRE-2 y COE-1) provenientes del Cepario de la Unidad de Energía Renovable del Centro de Investigación Científica de Yucatán (CICY). Dos de las especies pertenecen al género *Scenedesmus* sp. (SCRE-1 y SCRE-2) y una pertenece a *Coelastrum* (COE-1), sugeridas como candidatas para la producción de biocombustibles, pero aún desconocido el potencial que poseen para la producción de H₂. Las especies han sido mantenidas en medio TAP (Tris-Acetato-Fosfato) a (19 ± 2) °C (Temperatura del Cepario de la Unidad de Energía Renovable).

2.3 Medio de cultivo

Las tres especies de estudio (SCRE-1, SCRE-2 y COE-1) fueron cultivadas en medio Tris-acetato-fosfato (TAP, por sus siglas en inglés) (ver anexos tabla 2) en fase aeróbica, y en la etapa anaeróbica se cultivaron en medio TAP con ausencia de azufre (ver anexos tabla 3), posteriormente se ajustaron a un pH 7.0 con HCl 1M o KOH 1M. Finalmente se esterilizó en autoclave a 120°C y 1.26 kg/cm² de presión durante 20 minutos. Las condiciones de trabajo, se determinaron con base en comparativo de diferentes referencias para la producción de hidrógeno en microalgas verdes y la capacidad de respuesta de las especies de estudio a las condiciones inducidas.

2.3.1 Cultivos microalgales

Se realizaron cultivos por triplicado para cada una de las especies microalgales en matraces Erlenmeyer de 500 mL con un inóculo de 500,000 cel/mL, posteriormente se cultivaron bajo las siguientes condiciones: luz continua a 90 μmol/m²/s, mediante lámparas de luz blanca de 30 W, (25 ± 2) °C y 150 rpm (Platform shaker, Excella E10). Con los cultivos algales, también se determinó la curva de crecimiento de cada una de las especies bajo estudio.

2.4 Medición de las curvas de crecimiento

Se realizaron cultivos por separado para las tres especies de *Scenedesmus* (SCRE-1, SCRE-2) y de *Coelastrum* (COE-1) en medio TAP, en matraces Erlenmeyer de 500 mL con un inóculo de 500,000 cel/mL en un volumen de trabajo de 250 mL. Para el conteo celular se tomó una alícuota de 500 μ L del cultivo por cepa cada 24 horas. Se tomó 0.9 μ L y se depositó en la cámara Neubauer, para observar al microscopio óptico con un aumento de 40X (Nikon Eclipse E200). Posteriormente, se calculó la densidad por unidad de volumen mediante la suma de las células en cinco cuadrantes de la cámara Neubauer (Figura 5). El número de células se dividió entre el número de cuadrantes de conteo, se multiplicó por 50,000 para obtener la densidad celular por mililitro. Estos valores se emplearon para determinar la curva de crecimiento para cada una de las especies bajo estudio.

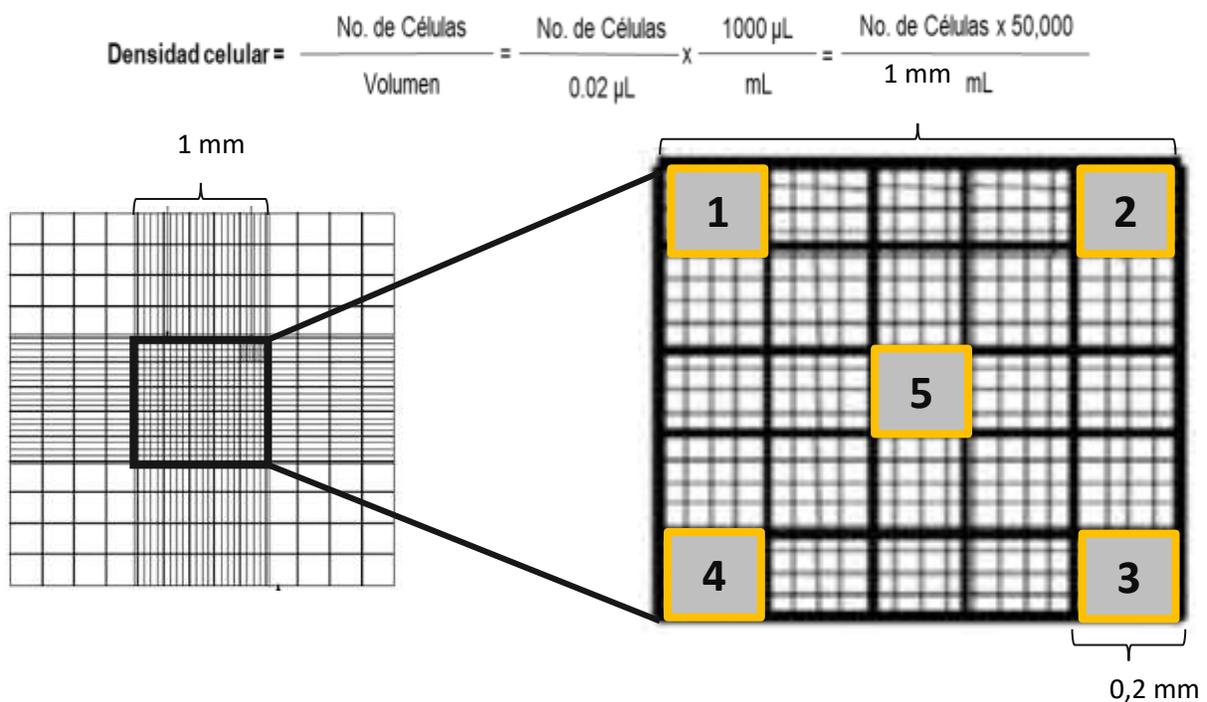


Figura 5. Fórmula y cuadrantes en los que se realizó el conteo celular de la cámara Neubauer.

2.5 Cultivo en dos etapas

2.5.1 Cultivo Aeróbico

En la etapa aeróbica, los cultivos experimentales se realizaron en matraces Erlenmeyer de 500 mL con un volumen útil de 250 mL de medio TAP para cada especie de estudio y con un inóculo de 500,000 cel/mL. Hasta alcanzar la cantidad máxima de clorofila registrada, se incubaron bajo las siguientes condiciones: luz continua de 90 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ emitido por lámparas fluorescentes de luz blanca de 30 W, $(25 \pm 2)^\circ\text{C}$, y 150 rpm (Platform shaker, Excella E10). Una vez alcanzada la mayor concentración de clorofila, los cultivos se iniciaron nuevamente (Figura 6) para inducir la generación de hidrógeno, posteriormente se colectó la biomasa por centrifugación (2380 g por 10 min) y se lavó dos veces con medio TAP sin azufre (TAP-S). Posterior, para la etapa anaeróbica la biomasa se transfirió a medio TAP sin azufre (TAP-S). Por lo que todas las sales con azufre se reemplazaron por sales de cloruro (ZnCl_2 , FeCl_3 , $\text{CuCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$, $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) (Anexos Tabla 3).

2.5.2 Cultivo Anaeróbico

Los cultivos anaeróbicos se llevaron a cabo en medio TAP con ausencia de azufre y como inóculo toda la biomasa cosechada de la etapa aeróbica.

Inicialmente en botellas para medio de 250 mL se depositó 250 mL de medio de cultivo sin azufre (quedando un espacio de cabeza de 5 cm aproximadamente para la producción del hidrógeno), se sellaron con tapones de rosca con septas de silicón (Figura 6A) y se esterilizaron en autoclave ($121^\circ\text{C}/20 \text{ min}/1.26 \text{ kg}/\text{cm}^2$).

Las condiciones de anoxia se llevaron a cabo de la siguiente manera: inicialmente se procedió a la limpieza de la aguja, por lo que se dispuso una jeringa estéril (10 mL) al flujo de nitrógeno y se bombeo tres veces (Figura 6B), posteriormente se tomó 10 mililitros de medio TAP con ausencia nutricional estéril contenidas en las botellas de medio de 250 mL, y procurando no capturar aire (Figura 6C), se depositó y homogenizó toda la biomasa microalgal generada en la etapa aeróbica (por centrifugación a $5355 \text{ g}/4^\circ\text{C}/10 \text{ min}$, en microcentrifuga Hettich).

Para la inoculación de la biomasa al medio de cultivo se tomó otra jeringa estéril (10 mL), se limpió nuevamente bombeando diez veces bajo el flujo de nitrógeno, en el cual, en el décimo bombeo se retuvo 10 ml (el volumen de la jeringa) de nitrógeno gas, y se inyectó a la biomasa homogenizada para hacer anaerobio el inóculo (Figura 6D). Inmediatamente después, con mucho cuidado de no succionar aire se tomó la biomasa anaeróbica con jeringa y se inoculó en las botellas de 250 mL con medio TAP con ausencia nutrimental (Figura 6E). Finalmente, se succionó 10 mL de aire (cantidad de inóculo inyectado), para igualar la presión interna del sistema (Figura 6F). Posterior, se incubó en condiciones anaeróbicas de crecimiento (25°C, 90 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ con luz continua [24 h] con lámparas fluorescentes).

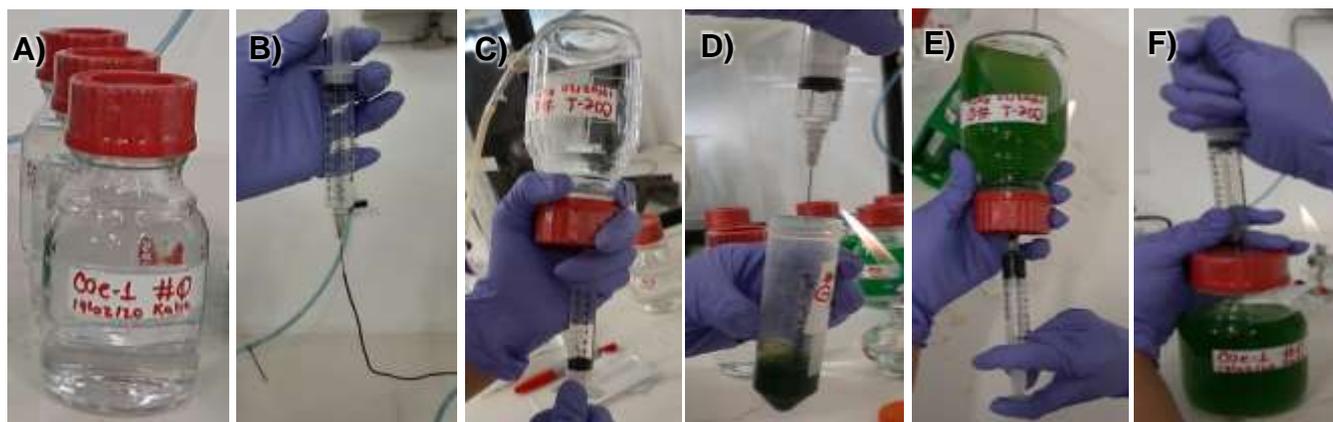


Figura 6. Cultivo anaeróbico. A) Medio TAP con ausencia de azufre; B) Limpieza de la jeringa y toma de nitrógeno gas; C) Toma de medio TAP con ausencia de azufre; D) Inyección de nitrógeno gas al inóculo; E) Inyección del inóculo a la botella con medio TAP con ausencia de azufre y F) Succión de aire.

2.6 Cuantificación de clorofila

Se realizó la cuantificación de la clorofila para evaluar las reacciones de transferencia de electrones, la distribución de energía dentro del aparato fotosintético y el efecto del crecimiento de los cultivos microalgales, en ambas etapas (aeróbica y anaeróbica) [46] de acuerdo al procedimiento de Torpees (2012). Para ello inicialmente se tomaron alícuotas de 1 mL proveniente de los cultivos aeróbicos y anaeróbicos, durante los primeros cinco

días. Posterior se centrifugó a 5355 g a 25°C durante 15 min, se retiró el sobrenadante y la biomasa se resuspendió en 1 mL de acetona al 80%, seguidamente se protegió de la luz y se preservó a 4°C por dos horas. Transcurrido el tiempo se centrifugó nuevamente en las mismas condiciones antes mencionadas, y se tomaron las lecturas de las densidades ópticas a 645 nm y 663 nm (Genova UV-VIS, Jenway 6405) para calcular la concentración de clorofila mediante la siguiente ecuación:

$$\text{Clorofila (mg/L)} = (8.02 \times \text{OD } 663 \text{ nm}) + (20.21 \times \text{OD } 645 \text{ nm}) \text{ [57]}$$

2.7 Cuantificación de carbohidratos (almidón)

La cuantificación de carbohidratos sirvió para evaluar la acumulación y la degradación del almidón (carbohidrato de reserva) en etapa aerobia y anaerobia respectivamente. Para ello, inicialmente se estableció una curva de calibración utilizando almidón (J.T.Baker) como estándar, realizando soluciones con concentraciones de 150, 120, 90, 60, 30, 10 y 5 µg/mL para su lectura en el espectrofotómetro (Genova UV-VIS, Jenway 6405). Posteriormente del cultivo se tomó 1 mL y cosechó la biomasa microalgal por centrifugación a 3500 g durante 5 min a 4°C. Luego se desechó el sobrenadante y a la biomasa restante se le agregó 1:1 volumen de acetona al 90% (1 mL de cultivo: 1mL de acetona), se dejó actuar por 2 h a 4°C, para extraer las clorofilas y evitar su intervención en las lecturas. El sobrenadante se separó nuevamente por centrifugación a 3500 g por 5 min y a la biomasa restante se le agregó agua destilada y expuso a 150 °C por 5 min. Posteriormente los restos celulares se eliminaron por centrifugación a 3500 g por 5 min. Finalmente para la determinación de la cantidad de carbohidratos (almidón) extraídos se le agregó 20 µl de yodo de lugol (a partir de una solución de 950 µl de H₂O + 50 µL de yodo de lugol) y el contenido se colocó en celdas de cuarzo para leerse en espectrofotometría a una longitud de onda de 600 nm. La concentración del almidón se calculó usando la lectura de absorbancia y la curva de calibración antes mencionada para cada una de las especies [80, 81, 82, 83, 84].

2.8 Cuantificación de biohidrógeno

La cuantificación de hidrógeno se realizó por cromatografía (Perkin Elmer modelo Clarus 500) a una temperatura 35°C por 3 min. El gas acarreador fue nitrógeno de alta pureza con un flujo de 30 mL/min y la columna a emplear fue una Elite GC GS-MOLESIEVE de 30m x 0.053mm (Perkin Elmer). Las señales fueron generadas por el detector de conductividad térmica (TCD) a una temperatura de 200°C y la temperatura del inyector fue de 35°C.

2.9 Análisis estadístico

Los resultados obtenidos se expresaron como valores promedios de los datos y su desviación estándar. La cuantificación de la producción de hidrógeno se expresó en valor de porcentaje obtenido del cromatógrafo de gases. Para el análisis estadístico, los datos obtenidos de las curvas de crecimiento, clorofila, almidón y producción de H₂ se les realizó un análisis de varianza de dos vías (ANOVA) con un nivel de confianza del 95%. Para conocer si existen diferencias entre los grupos se realizó el análisis *a posteriori* de prueba de Tukey. Todas las pruebas se realizarán por triplicado.

CAPITULO 3

RESULTADOS y DISCUSIÓN

3.1 Cultivos microalgales

El acondicionamiento de los cultivos microalgales en la etapa aeróbica (25 ± 2 °C, luz continua a $90 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ y 150 rpm), se definió tomando en cuenta lo reportado en la literatura sobre producción de hidrógeno para el grupo de las clorofíceas ($90\text{-}200 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$), así como por la capacidad de respuesta de las especies de estudio a las condiciones inducidas, para incrementar la producción de biomasa y el contenido de carbohidratos de almacenamiento, que eventualmente resultaría en buenos rendimientos de biohidrógeno [54].

A partir de la implementación de las condiciones mencionadas en la literatura, los cultivos de *Coelastrum* (COE-1) y *Scenedemus* (SCRE-1), comenzaron a mostrar aglomeraciones celulares (Figura 7) una posible consecuencia por las condiciones altas y continuas de luz. Así mismo, mediante la observación del cultivo se notó presencia de bacterias, lo que no permitió la recuperación del cultivo axénico, debido a una mayor densidad bacteriana que de células microalgales [68].

Se definió que la condición de crecimiento principal que afectó los cultivos fue la alta irradiancia y el tiempo de exposición de luz, debido a que las especies ya habían sido crecidas a la misma temperatura (25 ± 2)°C y el mismo medio TAP. Lo anterior, repercutiría en el crecimiento de las especies de estudio. Por esta razón, los cultivos se purificaron con lavados de HCl 1N y agua estéril y se mantuvieron en incubación bajo una intensidad de luz de $90 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ para que no se formen aglomerados y se obtenga un mejor crecimiento de los cultivos.



Figura 7. Cultivo de *Coelastrum* sp. (COE-1) con aglomerados celulares.

Bajo las condiciones definidas (25 ± 2 °C, luz continua a $90 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ y 150 rpm), el cultivo de *Scenedesmus* sp. (SCRE-2), en comparación con *Coelastrum* sp. (COE-1) y *Scenedesmus* sp. (SCRE-1), mostró mayor densidad celular debido a una mejor adaptación y aprovechamiento de los nutrientes al medio de cultivo.

3.2 Curvas de crecimiento

La evaluación de la curvas de crecimiento permitió conocer la concentración celular máxima alcanzada de cada una de las especies bajo estudio y determinar su adaptación a las condiciones ambientales establecidas para el cultivo. En este sentido, se realizaron conteos cada 24 h y se monitorearon hasta las 240 h (Figura 8).

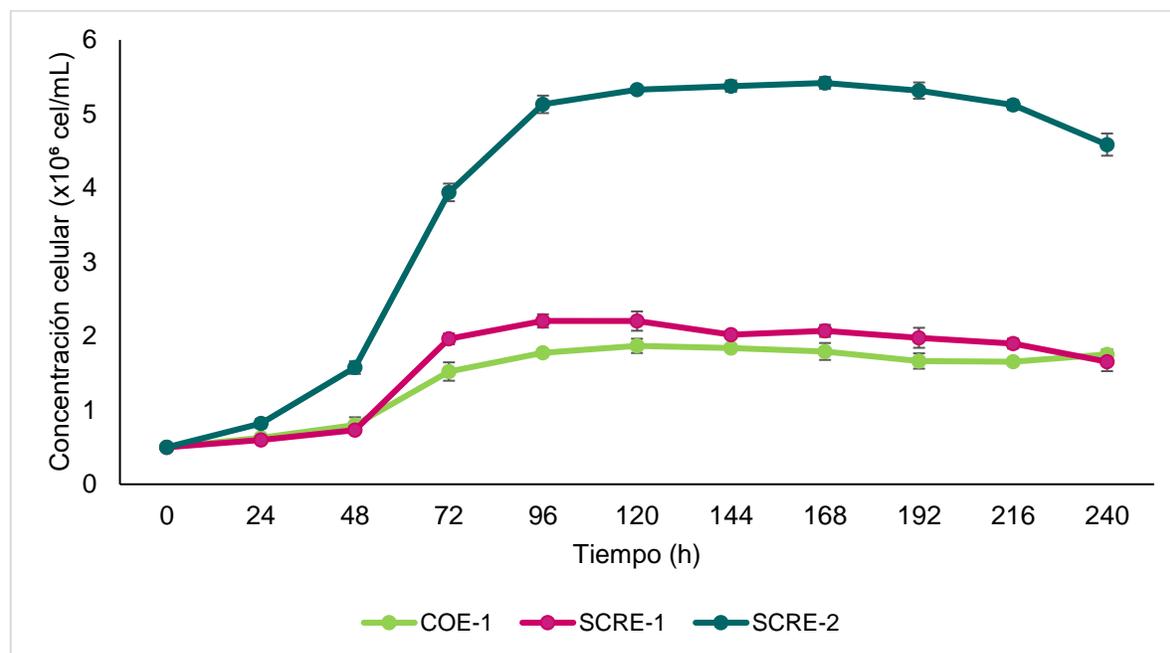


Figura 8. Curvas de crecimiento de *Coelastrum* sp. (COE-1); *Scenedesmus* sp. (SCRE-1 y SCRE-2).

A partir de las curvas de crecimiento se determinó que la concentración celular máxima de las tres especies fueron en orden descendente: SCRE-2 > SCRE-1 > COE-1 ($p < 0.05$). En estas especies ocurrió a las 96 h de cultivo: SCRE-2 con 5.13×10^6 células·mL⁻¹, mientras que *Scenedesmus* sp. (SCRE-1) con 2.21×10^6 células·mL⁻¹ y *Coelastrum* sp. (COE-1) fue 1.78×10^6 células·mL⁻¹.

Como se muestra en la figura 8, tanto *Coelastrum* sp. (COE-1) como *Scenedesmus* sp. (SCRE-1) presentaron valores más bajos de densidad celular; esto puede ser debido a que para estas especies fue alta la irradiancia o se pudieron ver afectados por el tiempo de exposición de luz, lo que inhibió el número de células [64]. *Scenedesmus* sp. (SCRE-2) presentó, al parecer, más alta tolerancia a la irradiancia con lo cual produjo más biomasa. A este respecto, algunos estudios mencionan que altas intensidades de luz no mayores a saturación, incitan un aumento en el contenido de carbohidratos. Por lo tanto se esperaría que las especies *Scenedesmus* sp. (SCRE-1) y *Coelastrum* sp. (COE-1) que resultaron tener una alta irradiancia, prosperen en el almacenamiento de carbohidratos y de igual forma en la producción de H₂ en comparación con *Scenedesmus* sp. (SCRE-2) [52,69].

En la figura 9, se muestran curvas de crecimiento durante la producción de H₂ en condiciones de privación de azufre (etapa anaeróbica).

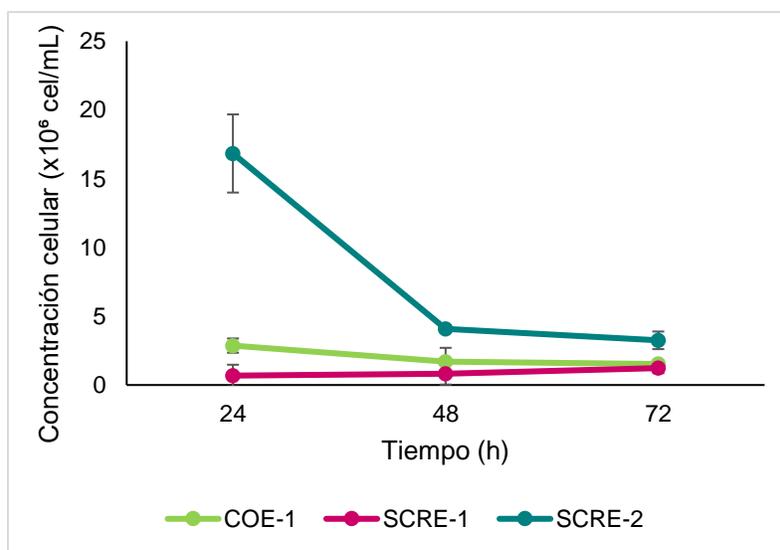


Figura 9. Curvas de crecimiento de COE-1, SCRE-1 y SCRE-2 durante la etapa anaeróbica.

De una etapa a otra se esperaba una disminución de crecimiento celular; en contraste, se observó un incremento de la densidad celular a partir de las 24 h de cultivo en etapa anaeróbica en SCRE-2 y en COE-1, mientras que en SCRE-1 mostró una disminución celular a las 24 h y un leve aumento de crecimiento celular durante el tiempo de cultivo. En la etapa anaeróbica se observó, en SCRE-2 un aumento significativo de densidad celular

en comparación con COE-1 y SCRE-1 ($p < 0.05$). Esto pudo deberse a que los valores de densidad celular en etapa anaeróbica fueron calculados a partir de la densidad celular en la etapa aeróbica, lo que reflejó el aumento de la densidad celular y una notoria disminución de crecimiento en etapa anaeróbica. Por esta razón, se propone realizar en las siguientes ocasiones la experimentación de la densidad celular en la etapa anaeróbica para comparar los datos obtenidos.

Las tres especies de estudio mostraron disminución de crecimiento celular del cultivo en etapa anaeróbica. Esta disminución, puede deberse a que de acuerdo a la literatura, la ausencia de azufre, ocasiona daños en los centros de reacción de PSII, afectando la biosíntesis de la proteína D1 conformada por la cisteína y metionina, aminoácidos azufrados esenciales para la síntesis de proteínas del crecimiento y para el funcionamiento del metabolismo celular, sin embargo se requiere más análisis para confirmarlo [3,77].

3.3 Cuantificación de clorofila (etapa aeróbica)

Las mediciones de clorofila se realizaron como indicativo de la actividad fotosintética y el crecimiento celular en las etapas aeróbica y anaeróbica [46] (Figura 10). Los concentrados de clorofila extraída de los cultivos aeróbicos (250 mL) en las especies *Coelastrum* sp. (COE-1) y *Scenedesmus* sp. (SCRE-1 y SCRE-2) a las 0, 24, 48, 72 y 96 horas se muestran en la Figura 10.

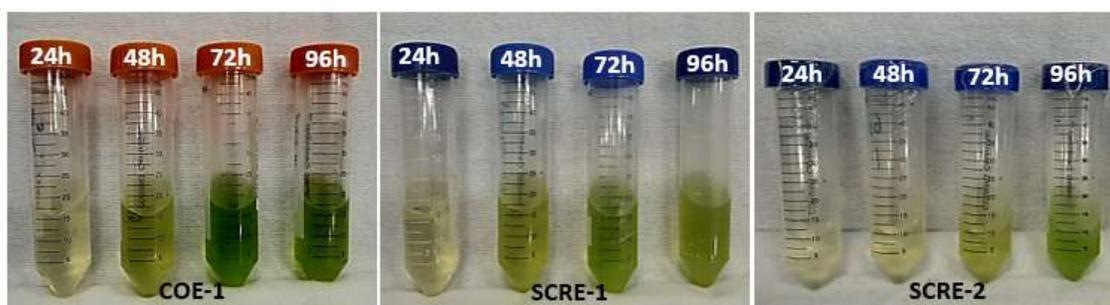


Figura 10. Clorofila obtenida de las especies, *Coelastrum* sp. (COE-1) y *Scenedesmus* sp. (SCRE-1 y SCRE-2).

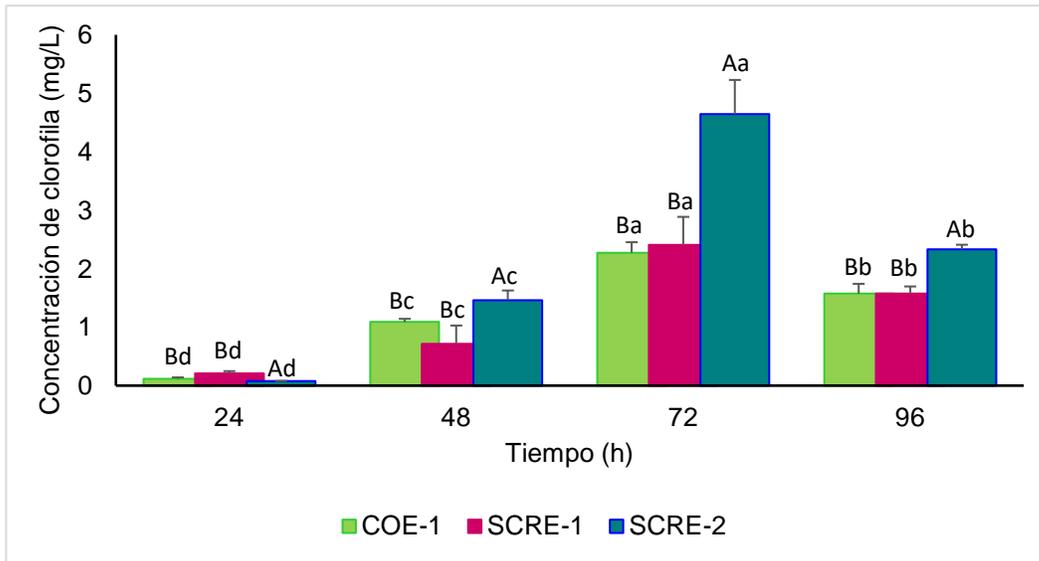


Figura 11. Concentración de clorofila de los cultivos en etapa aeróbica de *Coelastrum* sp. (COE-1) y *Scenedemus* sp. (SCRE-1 y SCRE-2). Valores con letras mayúsculas indican diferencias significativas entre especies. Letras minúsculas indican diferencias significativas entre tiempo de cultivo. ANOVA de dos vías y *a posteriori* prueba de Tukey ($\alpha=0.05$, $A > B$, $a > b > c > d$, valor promedio \pm DE, $n=3$).

En la figura 11 se muestra la concentración de clorofila de los cultivos extraída cada 24h, siendo SCRE-2, la que presentó mayor concentración de clorofila en comparación con COE-1 y SCRE-1 ($p < 0.05$). La máxima concentración se alcanzó a las 72h de cultivo en SCRE-2 con 4.6 mg/L, seguida de *Scenedemus* sp. (SCRE-1) con 2.4 mg/L y *Coelastrum* sp. (COE-1) con 2.2 mg/L y ($p < 0.05$).

Los cultivos después de haber alcanzado la máxima concentración de clorofila, presentaron una disminución de la concentración de clorofila en las tres especies *Coelastrum* sp. (COE-1) y *Scenedemus* sp. (SCRE-1 y SCRE-2). Esto puede estar influenciado por la máxima absorción de energía necesaria, procedente de la actividad fotosintética alcanzada a las 72h y la pronta disminución de concentración de clorofila derivó en un restringido aprovechamiento de luz, con lo cual el crecimiento se mantiene o bien disminuye al igual que la actividad fotosintética [54, 57].

Cheirsilp y Torpee (2012) indicaron que una alta intensidad de luz ($108-135 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$) en *Chlorella* sp. marina y *Nannochloropsis* sp. derivó en mayor síntesis de clorofila ($56.74 \pm$

3.22) mg/g, y mayor actividad fotosintética. En contraste, COE-1 y SCRE-1, a pesar de crecer en altas intensidades de luz, la concentración de clorofila no fue mayor que la de SCRE-2. Los valores de SCRE-2 pueden deberse a que la intensidad lumínica fue óptima para la especie, lo que favoreció una mayor actividad fotosintética que COE-1 y SCRE-1.

La concentración de clorofila, también podría ser indicativo del crecimiento celular, lo cual concuerda con la tendencia obtenida en el crecimiento de los cultivos en etapa aeróbica; siendo SCRE-2 la de mayor crecimiento celular y mayor concentración de clorofila [46].

3.4 Cuantificación del almidón (etapa aeróbica)

Se cuantificó el almidón para evaluar la cantidad (carbohidrato de reserva) producida en la etapa aeróbica.

El cálculo de la concentración del almidón se realizó mediante curvas de calibración obteniendo el modelo: $y = 0.0038x + 0.0063$ y el coeficiente de determinación (R^2) de 0.9915. Posteriormente la ecuación se utilizó para determinar la concentración de almidón.

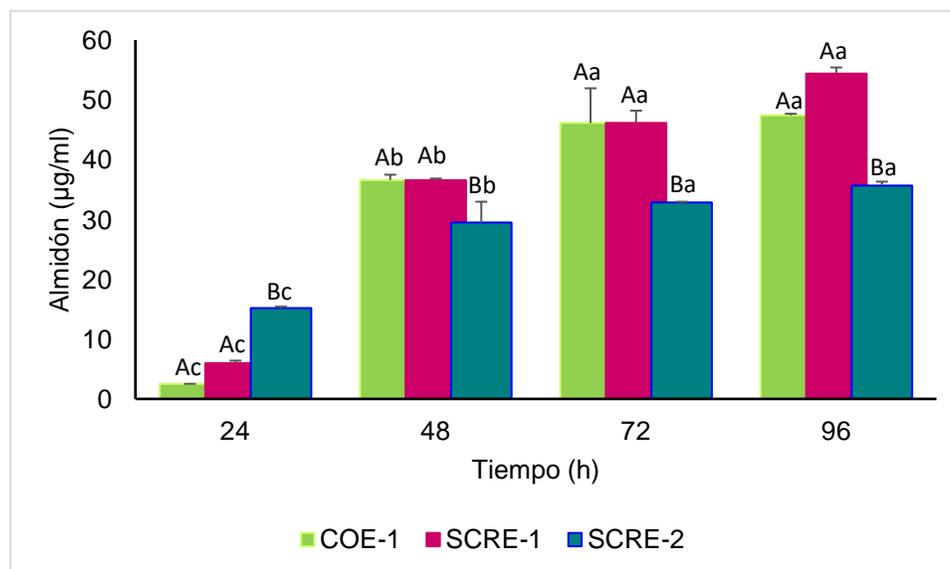


Figura 12. Concentración de Almidón de los cultivos etapa aeróbica de *Coelastrum* sp. (COE-1) y *Scenedesmus* sp. (SCRE-1 y SCRE-2). Valores con letras mayúsculas indican diferencias significativas entre especies. Letras minúsculas indican diferencias significativas entre tiempo de cultivo. ANOVA de dos vías y *a posteriori* prueba de Tukey ($\alpha=0.05$, $A > B$, $a > b > c$, valor promedio \pm DE, $n=3$).

Las especies COE-1 y SCRE-1 presentaron concentraciones de almidón similares y mayores que SCRE-2 ($p < 0.05$). Se alcanzó concentraciones máximas de almidón a las 72 y 96 h de incubación ($p < 0.05$). Las especies *Coelastrum* sp. (COE-1) y *Scenedesmus* sp. (SCRE-1), presentaron una concentración de almidón de 46.12 mg/L a las 72 h. Mientras que SCRE-2 presentó una concentración de 32.84 mg/L (Figura 12).

La tendencia en los valores de la concentración de almidón en *Coelastrum* sp. (COE-1) y *Scenedesmus* sp. (SCRE-1) fue esperada debido a que presentaron menor densidad celular que SCRE-2. Markou y colaboradores en el 2012, mencionan que una menor densidad celular en las células microalgales conduce a un mejor almacenamiento de almidón, lo cual proporcionaría la energía necesaria para los procesos metabólicos de las microalgas.

3.5 Cultivos anaeróbicos con ausencia de azufre

3.6 Cuantificación de clorofila (etapa anaeróbica)

Se realizó el cultivo en anaerobiosis de las especies *Coelastrum* sp. (COE-1) y *Scenedesmus* sp. (SCRE-1 y SCRE-2), y se evaluó el funcionamiento del aparato fotosintético del cultivo de las especies de estudio mediante la cuantificación de la clorofila. El gráfico de las concentraciones de clorofila en el cultivo anaeróbico de las especies bajo estudio se muestra en la Figura 13.

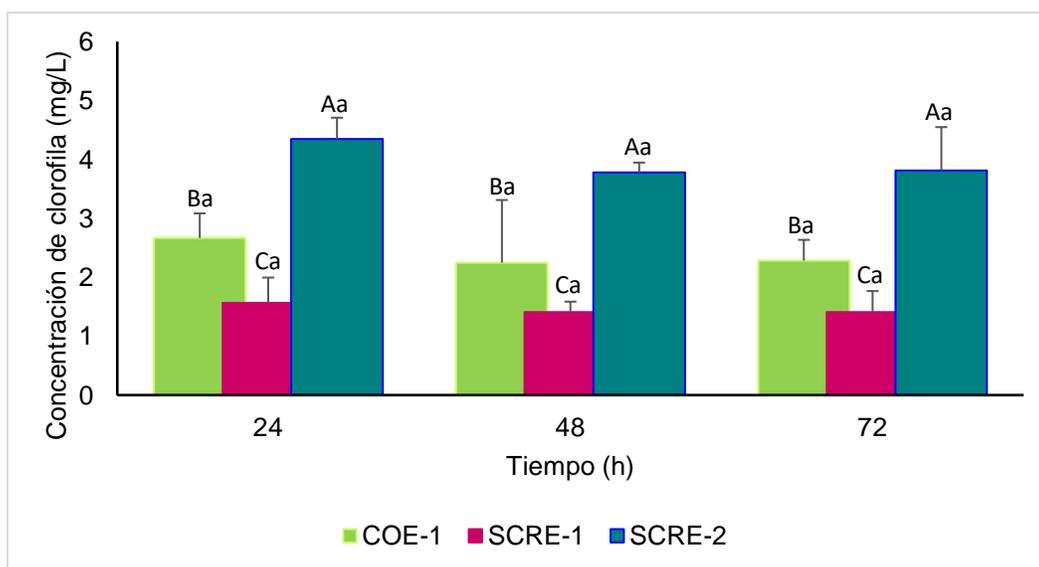


Figura 13. Concentración de clorofila de *Coelastrum* sp. (COE-1) y *Scenedesmus* sp. (SCRE-1 y SCRE-2) en etapa anaeróbica. Valores con letras mayúsculas indican diferencias significativas entre especies. Letras minúsculas indican diferencias significativas entre tiempo de cultivo. ANOVA de dos vías y *a posteriori* prueba de Tukey ($\alpha=0.05$, $A > B > C$, a valor promedio \pm DE, $n=3$).

Los resultados obtenidos en los valores de concentración de clorofila, no indicaron diferencias significativas en cuanto al tiempo de cultivo ($p < 0.05$) ya que se obtuvo un leve decremento en la concentración. Sin embargo, si presentaron diferencias significativas entre especies, en orden descendente: SCRE-2 > COE-1 > SCRE-1 ($p < 0.05$) (Figura 15).

En este estudio, al pasar los cultivos de una etapa a otra, las especies de *Scenedesmus* sp. (SCRE-1 y SCRE-2), presentaron una disminución en la concentración de clorofila como se esperaba. Estudios sobre producción de biohidrógeno indican que, en condiciones anaerobias, ocurre la disminución de la clorofila, lo cual sugiere disminución de la actividad fotosintética, y por consiguiente disminución del oxígeno, creando un ambiente anóxico que induce la actividad de la enzima hidrogenasa, resultando en la producción de hidrógeno [52, 43, 46, 62]. En general, los resultados sugieren que las tres especies pueden ser productoras de hidrógeno.

Se esperaría que, en la continuidad de la experimentación, se observe la disminución en la concentración de clorofila en las especies de estudio, lo que sugeriría una disminución de oxígeno producido por la actividad residual del PSII generando un ambiente anóxico propicio para la producción de H₂ como menciona la literatura [71]. Conforme a esto, los resultados obtenidos pueden proporcionar datos para futuros experimentos de la producción de hidrógeno.

3.7 Cuantificación del almidón (etapa anaeróbica)

La cuantificación de almidón en la etapa anaeróbica sirvió para conocer la relación de la ausencia de azufre con respecto a la acumulación de almidón y la producción de H₂.

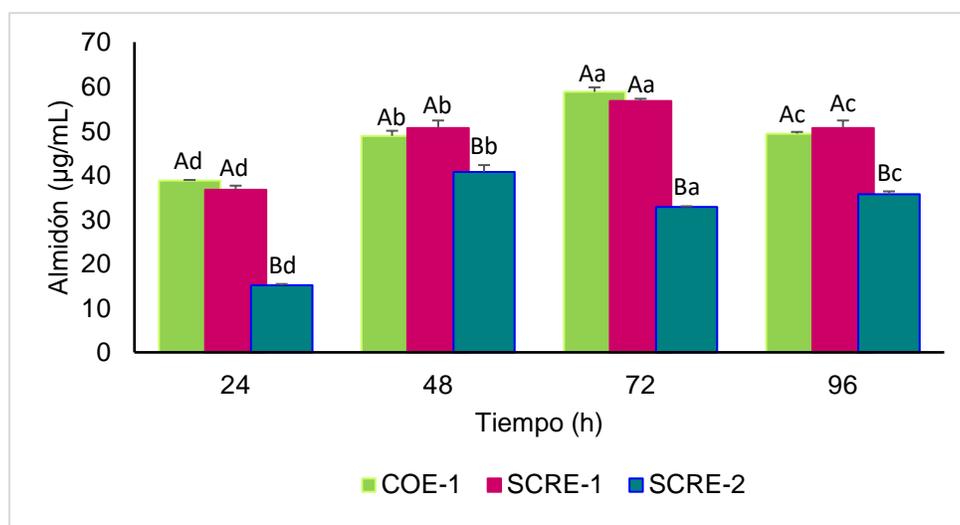


Figura 14. Concentración de Almidón de los cultivos en etapa anaeróbica de *Coelastrum* sp. (COE-1) y *Scenedesmus* sp. (SCRE-1 y SCRE-2). Valores con letras mayúsculas indican diferencias significativas entre especies. Letras minúsculas indican diferencias significativas entre tiempo de cultivo. ANOVA de dos vías y *a posteriori* prueba de Tukey ($\alpha=0.05$, $A > B$, $a > b > c > d$, valor promedio \pm DE, $n=3$).

En la figura 14, los cultivos en etapa anaeróbica de COE-1 y SCRE-1, mostraron al igual que en la etapa aeróbica concentraciones similares de almidón y mayores que SCRE-2

($p < 0.05$). Estadísticamente las tres especies presentaron en la etapa anaeróbica valores de almidón tendientes al incremento con respecto al tiempo en orden ascendente: 24 < 48 < 72 ($p < 0.05$).

Coelastrum sp. (COE-1) y *Scenedesmus* sp. (SCRE-1) presentaron mayor concentración de almidón en etapa anaeróbica que *Scenedesmus* sp. (SCRE-2). Esto posiblemente se deba a que, en la etapa aeróbica, *Coelastrum* sp. (COE-1) y *Scenedesmus* sp. (SCRE-1) almacenaron más cantidad de almidón que *Scenedesmus* sp. (SCRE-2).

Se ha evaluado en microalgas del grupo de las clorófitas que al mantener las células por 24 h con ausencia de azufre, aumenta el contenido de carbohidratos (almidón), disminución de la actividad del PSII, seguido de una pronta disminución de almidón en días siguientes, debido a que el almidón actúa como sumidero de electrones para la vía independiente del PSII [46, 71, 73, 89].

Por el contrario, los cultivos mostraron una disminución en la concentración de almidón entre la etapa aeróbica y anaeróbica. A las 48 h y hasta las 72 h los cultivos en etapa anaeróbica de COE-1 y SCRE-1, presentaron un aumento en la concentración de almidón. Posterior a las 96 h se mostró una disminución de concentración de almidón de 9.4 y 6.1 $\mu\text{g/mL}$ respectivamente, por lo que se esperaría que a las 96 h de tiempo de cultivo se produzca mayor producción de H_2 .

Por el contrario SCRE-2 presentó altibajos durante el tiempo de cultivo. Adicionalmente se espera que con la continuidad de cultivo se continúe la disminución de la concentración de almidón, como lo sugiere la literatura.

De igual forma, los incrementos en la concentración del almidón y la disminución en la concentración de clorofila se deben a los cambios metabólicos asociados a condiciones nutricionales limitantes en el cultivo de microalgas. El comportamiento diferencial de la concentración de almidón también puede deberse a que son especies diferentes, lo que demuestra que las concentraciones de los contenidos intracelulares varían según la especie y las condiciones de cultivo [46, 74,75].

3.8 Cuantificación en la producción de hidrógeno

La cuantificación de H₂ se analizó para conocer la producción de cada una de las especies de estudio bajo condiciones de ausencia de azufre y que consiste en la técnica más utilizada para inducir a la producción de hidrógeno con microalgas del grupo de las clorofíceas [85,86].

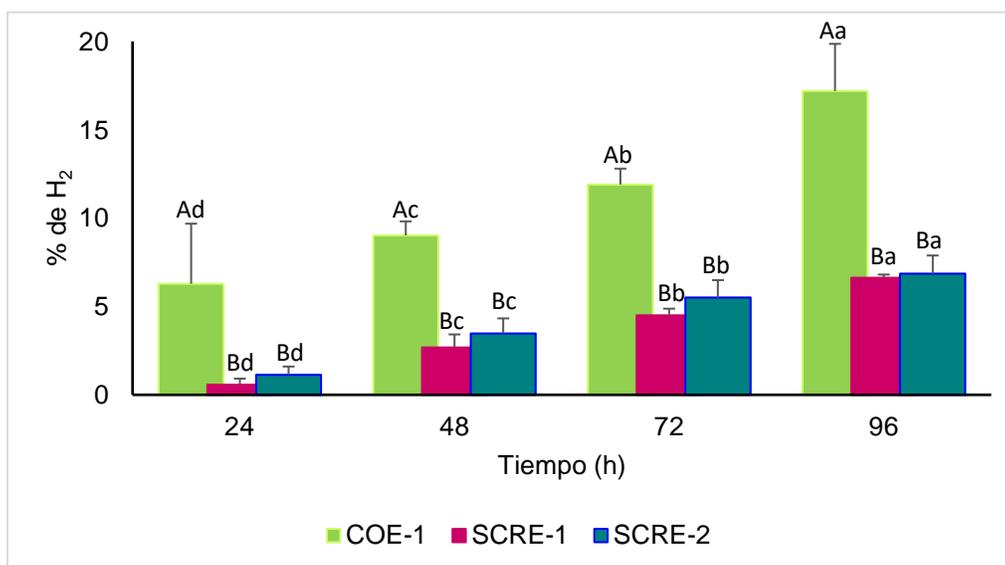


Figura 15. Porcentaje de H₂ de los cultivos en etapa anaeróbica de *Coelastrum* sp. (COE-1) y *Scenedesmus* sp. (SCRE-1 y SCRE-2). Valores con letras mayúsculas indican diferencias significativas entre especies. Letras minúsculas indican diferencias significativas entre tiempo de cultivo. ANOVA de dos vías y *a posteriori* prueba de Tukey ($\alpha=0.05$, $A > B$, $a > b > c > d$, valor promedio \pm DE, $n=3$).

La presencia de H₂ fue confirmada de forma cuantitativa por cromatografía de gases mediante la toma de 1 mL del gas generado en el espacio de cabeza de los cultivos anaeróbicos. En las tres especies de estudio *Coelastrum* sp. (COE-1) y *Scenedesmus* sp. (SCRE-1 y SCRE-2), se detectó un aumento de los valores del porcentaje de H₂ conforme al tiempo de cultivo en la etapa anaeróbica en orden descendente: 96 > 72 > 48 > 24 ($p < 0.05$). *Coelastrum* sp. (COE-1) registró la mayor producción de H₂ con 17.1 % a las 96 h, mientras que las especies de *Scenedesmus* sp. (SCRE-1 y SCRE-2) registraron valores máximos similares a las 96 h con 6.6 y 6.8% respectivamente ($p < 0.05$).

La presencia de H₂ en *Coelastrum* sp. (COE-1) fue mayor que en las especies de *Scenedesmus* sp. (SCRE-1 y SCRE-2). Lo cual indicó que *Coelastrum* sp. (COE-1) presentó mayor capacidad de síntesis de H₂ que las especies de *Scenedesmus* sp. (SCRE-1 y SCRE-2). *Scenedesmus* sp. (SCRE-1 y SCRE-2) no presentaron diferencias significativas de H₂, probablemente debido a que pertenecen al mismo género.

El porcentaje de H₂ obtenido puede estar referido a la concentración de clorofila en etapa anaeróbica, ya que en la concentración de clorofila se mantuvo conforme al tiempo de cultivo, lo que conlleva a un detenimiento de la actividad fotosintética y por consiguiente de oxígeno. Esto no permitió alcanzar una completa anaerobiosis y actividad de la enzima hidrogenasa, lo que resultaría en una mejor producción de H₂ [69,77].

Por otro lado, debido a que se analizó hasta las 96h, no se logró detectar si ocurrió la disminución en la concentración de almidón en horas posteriores de cultivo. Debido a que como indica Hemschemeier (2005), la disminución de almidón induce y mejora la producción de H₂, debido a que la degradación de almidón es el principal proveedor de electrones para la vía independiente del PSII. Sin embargo, los electrones del catabolismo de los carbohidratos no son los únicos empleados para la producción de H₂, sino también los electrones de la fotólisis del agua. Esto puede sugerir la participación de otra fuente de electrones durante la producción de H₂ en este estudio [39,81].

En este mismo sentido, en el trabajo de Melis et al. (2000), indicaron que el acetato y el almidón son indispensables para la respiración mitocondrial en *C. renhardtii*. Así también demostraron que el acetato y el almidón, no fueron la fuente de electrones. Las proteínas, fueron sustrato y proveedor de electrones, tanto para la vía independiente del PSII como la respiración mitocondrial y vías metabólicas utilizadas para la producción de H₂ [69]. Por lo que el almidón no necesariamente es la única fuente de electrones para la vía independiente del PSII. Esto sugiere que faltarían estudios para definir la relación existente entre la concentración de almidón y la producción de H₂ en *Coelastrum* sp. (COE-1) y *Scenedesmus* sp. (SCRE-1 y SCRE-2), ya que como se menciona en la literatura, cada especie microalgal tiene capacidad diferente, tanto para acumular almidón como para ser utilizado como fuente de electrones y donarlos a la hidrogenasa para la producción de H₂ [71].

El acetato en el medio de cultivo de las especies de estudio podría jugar un papel importante en la producción de H₂, debido a que se ha determinado que mejora la respiración celular por el consumo de oxígeno producto de la fotosíntesis para generar energía, y crear un ambiente anóxico [71]. En el trabajo de Ghirardi et al. (2000), el acetato se consumió muy lentamente, sugiriendo la presencia de otro grupo metabólico como la degradación de almidón para la eliminación del oxígeno. Por lo que sería interesante en estudios posteriores considerar el análisis del acetato en el cultivo de las especies microalgales.

Es sabido que la producción de hidrógeno puede verse afectada por diversos factores como el medio de cultivo, el tipo y la concentración de los nutrientes, el tipo de aporte de carbono, intensidad de luz, pH, temperatura y oxígeno, siendo este último el que ocasionaría la disminución de la actividad de la hidrogenasa o bien, afectar su expresión génica, lo que resultaría en un retraso o disminución en la producción de H₂ [47,61]. Conforme lo descrito por estos autores antes mencionados y a los resultados obtenidos en este estudio, se puede sugerir que las tres especies, *Coelastrum* sp. (COE-1) y *Scenedesmus* sp. (SCRE-1 y SCRE-2), presentaron un retraso en la producción de H₂, lo que impidió conocer cuál sería la máxima producción de H₂ en el periodo de tiempo evaluado.

CONCLUSIONES

Las concentraciones de clorofila en ambas etapas (aeróbica y anaeróbica) presentaron similar tendencia con la densidad celular en ambas etapas (aeróbica y anaeróbica) de las tres especies de estudio. SCRE-2 presentó mayor densidad celular y mayor concentración de clorofila en ambas etapas, con tendencia en el mantenimiento de concentración de clorofila durante el tiempo de cultivo en etapa anaeróbica.

La menor concentración celular que presentaron *Coelastrum* sp. (COE-1) y *Scenedesmus* sp. (SCRE-1) favoreció la concentración de almidón en la etapa aeróbica, respecto a los menores valores de concentración celular evaluados para *Scenedesmus* sp. (SCRE-2). Mientras en etapa anaeróbica, las tres especies de estudio, a pesar de presentar un aumento en la concentración de almidón respecto al tiempo de cultivo, mostraron una producción de H₂.

La ausencia de azufre promovió el mantenimiento del contenido de clorofila en *Coelastrum* sp. (COE-1) y *Scenedesmus* sp. (SCRE-1 y SCRE-2), lo cual resultó en mejor producción de H₂ en *Coelastrum* sp. (COE-1) que en las especies de *Scenedesmus* sp. (SCRE-1 y SCRE-2).

En este estudio se demostró que *Coelastrum* sp. (COE-1), puede llegar a ser un buen candidato para la producción de H₂, puesto que presentó mejores resultados que las especies de *Scenedesmus*. Sin embargo faltan más estudios para *Coelastrum* sp. (COE-1) para sustentar y mejorar la producción de H₂.

PERSPECTIVAS

- Evaluar el crecimiento y concentración de clorofila de las especies de estudio *Coelastrum* sp. (COE-1) y *Scenedesmus* sp. (SCRE-1 y SCRE-2) utilizadas en esta investigación mantenida a diferentes intensidades de luz.
- Continuar la experimentación para conocer la máxima producción de H₂ de cada una de las especies y la relación que tiene con las concentraciones de clorofila y almidón.
- Profundizar los análisis de almidón para conocer la relación de la concentración de almidón con la producción de H₂ y determinar si es la fuente de electrones de la vía independiente del PSII para las especies de estudio o conocer cuál fue la influencia que tuvo durante el proceso de producción de H₂.
- Medir la cantidad de acetato en el medio de cultivo para conocer cuál fue la participación y la influencia en el proceso de producción de H₂ de este estudio.

BIBLIOGRAFÍA:

1. Brennan, L., Owende, P. (2010). Biofuels from microalgae a review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 14(2), 557–577.
Doi:10.1016/j.rser.2009.10.009.
2. Singh, A., Sevda, S., Abu Reesh, I., Vanbroekhoven, K., Rathore, D., Pant, D. (2015). Producción de biohidrógeno a partir de biomasa lignocelulósica: tecnología y sostenibilidad. *Energies*, 8 (11), 13062–13080.
Doi: 10.3390 / en81112357.
3. Márquez-Reyes, L. (2016). Efecto de las condiciones ambientales y adición de consumidores de oxígeno sobre el crecimiento y la producción de hidrógeno en cultivos de clorofíceas. Tesis de doctorado. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California. 3-17.
4. Papazi, A., Gjindali, I., Kastanaki, E., Assimakopoulos, K., Stamatakis, K., Kotzabasis, K. (2014). Potassium deficiency a “smart” cellular switch for sustained high yield hydrogen production by the green alga *Scenedesmus obliquus*. *International Journal of Hydrogen Energy*, 39 (34), 19452–19464.
Doi:10.1016/j.ijhydene.2014.09.096.
5. Batyrova, K., Hallenbeck, P. C. (2017). Hydrogen Production by a *Chlamydomonas reinhardtii* Strain with Inducible Expression of Photosystem II. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(3), 647.
Doi: 10.3390/ijms18030647.
6. Bedoya, A., Castrillón, J., Ramírez, J., Vásquez, J., Zabala, M. (2007). Producción biológica de hidrógeno: una aproximación al estado del arte. *Dyna*. 154. 137-157.
7. Giraldo-Rave, A. (2013). Evaluación de cepas de microalgas para captura de CO₂. Tesis de licenciatura. Universidad, Medellín. 5-9.
8. Fernández-Linares, L., Montiel-Montoya, J., Millán-Oropeza, A., Badillo-Corona, A. (2012). Producción de biocombustibles a partir de microalgas. *Ra Ximhai* 8(3): 101-115.
9. Fraile-Ramos, H. (2017). Evaluación técnica de alternativas de pretratamiento y sacarificación de bagazo de cerveza. Tesis de licenciatura. Universidad de Valladolid Escuela de Ingenierías Industriales. España. 19-28.

10. Álvarez-Maciel, C. (2009). Biocombustibles: desarrollo histórico-tecnológico, mercados actuales y comercio internacional. *Economía Informa*. 369:63-89.
11. Sirajunnisa, A. R., Surendhiran, D. (2016). Algae- A quintessential and positive resource of bioethanol production: A comprehensive review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 66. 248–267.
Doi:10.1016/j.rser.2016.07.024.
12. Machado, C. (2010). Situación de los biocombustibles de 2da y 3 era generación en América Latina y Caribe. Organización Latinoamericana de Energía (OLADE) y el Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura (IICA). 1-63.
13. Aditiya, H. B., Mahlia, T. M. I., Chong, W. T., Nur, H., Sebayang, A. H. (2016). Second generation bioethanol production: A critical review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 66, 631–653.
Doi:10.1016/j.rser.2016.07.015.
14. Gutiérrez- Jorda, L. (2005). El hidrógeno, combustible del futuro. *Real Academia de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales (España)*. 99(1). 49-67.
15. Balat, H., Kirtay, E. (2010). Hydrogen from biomass – Present scenario and future prospects. *International Journal of Hydrogen Energy*, 35(14), 7416–7426.
Doi:10.1016/j.ijhydene.2010.04.137.
16. Rai P.K., Singh S.P. (2016). Integrated dark- and photo-fermentation: Recent advances and provisions for improvement. *International Journal of Hydrogen Energy* <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijhydene.2016.08.084>.
17. Khetkorn, W., Rastogi, R. P., Incharoensakdi, A., Lindblad, P., Madamwar, D., Pandey, A., Larroche, C. (2017). Microalgal hydrogen production –A review. *Bioresource Technology*, 243, 1194–1206.
Doi:10.1016/j.biortech.2017.07.085.
18. Dutta, D., De, D., Chaudhuri, S., Bhattacharya, S. (2005). *Microbial Cell Factories*, 4(1), 36.
Doi: 10.1186/1475-2859-4-36.
19. Gonzáles, D., Hernández, D., Rodríguez-Chaparro, A. (2016). Producción de Biohidrógeno a partir de Microalgas. *Energética*, (47), 51-64. Recuperado de <https://revistas.unal.edu.co/index.php/energetica/article/view/56846>.

20. Ku- González, A. (2012). Estudio del gen *hycE* y la estructura de la enzima [nife]-hidrogenasa de *Escherichia coli*. Tesis de maestría. Centro de Investigación Científica de Yucatán (CICY). México. 6-12.
21. Arias- González, E. (2012). Estudio de la producción de hidrógeno en regimen batch con agua residual proveniente de la industria cervecera. Tesis de licenciatura. Facultad de ingeniería. Bogotá. 16-21.
22. Mohan, S. V., Pandey, A. (2013). Biohydrogen Production. *Biohydrogen*. 1–24. Doi:10.1016/b978-0-444-59555-3.00001-5.
23. Vijayaraghavan, K., Karthik, R., Kamala, S.P. (2010). Hydrogen Generation from Algae: A Review. *Journal of Plant Sciences*, 5: 1-19. Doi: 10.3923/jps.2010.1.19.
24. Heinrich, M. (2016). Producción de microalgas con fines alimenticios y energéticos. Tesis de licenciatura. Universidad nacional del litoral. Argentina. 5-10.
25. Balsera, M. (2004). Análisis estructural de la proteína extrínseca PsbQ del fotosistema II de plantas superiores. Tesis de licenciatura. Universidad de Salamanca. España. 3-18.
26. Uberegui- Bernad, E. (2015). Caracterización funcional de las proteínas Executer en la señalización plastídica mediada por oxígeno singlete. Tesis de doctorado. Consejo Superior de Investigaciones Científicas (IRNASA-CSIC), Salamanca. 3-9.
27. Rahman, S., Masdar, M., Rosli, M., Majlan, E., Husaini T. (2015). Overview of Biohydrogen Production Technologies and Application in Fuel cell. *American Journal of Chemical* 5(3): 13-23.
28. Contreras Pérez, J., Scott, J., Mendoza, C., Espinal, G., Zapata, Z. (2008). Potencial de algas verdes para la producción fotobiológica de hidrógeno. *Ciencia y Sociedad*. Vol. XXXIII (3): 307-326.
29. Martínez, V. (2010). Fermentación oscura, fotofermentación y biofotólisis: análisis de su aplicación en secuencia para la producción de hidrógeno biológico. Dirección General de Investigación y Desarrollo (DGID), Armada Argentina. 2-7. Doi: 10.13140/RG.2.1.2415.9844.
30. Jorquera, O., Herrera, L. (2018). Producción biofotolítica de hidrógeno. Universidad de Chile. Chile. 2-21.

31. Nagarajan, D., Lee, J., Kondo, A., Chang, J. (2017). Recent insights into biohydrogen production by microalgae – From biophotolysis to dark fermentation. *Bioresource Technology*, 227, 373–387.
Doi:10.1016/j.biortech.2016.12.104.
32. Ghirardi, M. L., Posewitz, M. C., Maness, P. C., Dubini, A., Yu, J., Seibert, M. (2007). Hydrogenases and Hydrogen Photoproduction in Oxygenic Photosynthetic Organisms. *Annual Review of Plant Biology*, 58(1), 71–91.
Doi:10.1146/annurev.arplant.58.032806.103848.
33. Appel, J., Schulz, R. (1998). Metabolism of hydrogen in organisms with oxygenated photosynthesis: Hydrogenases as important regulatory devices for proper redox positioning? *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 47(1), 1–11.
Doi: 10.1016 / s1011-1344 (98) 00179-1.
34. Vignais, PM, Billoud, B., Meyer, J. (2001). Clasificación y filogenia de las hidrogenasas. *FEMS Microbiology Reviews*, 25 (4), 455–501.
Doi: 10.1111 / j.1574-6976.2001.tb00587.x.
35. Laurinavicheneva, T. V., Fedorova, A. S., Ghirardib, M.L., Seibertb, M., Tsygankova, A. (2006). Demonstration of sustained hydrogen photoproduction by immobilized, sulfur-deprived *Chlamydomonas reinhardtii* cells. *International Journal of Hydrogen Energy*. 659- 667.
36. Melis, A., Seibert, M., Happe, T. (2004). Genomics of green algae hydrogen research. *Research of Photosynthesis*, 82 (3), 277–288.
Doi: 10.1007 / s11120-004-2050-2.
37. Czech, I., Stripp, S., Sanganas, O., Leidel, N., Happe, T., Haumann, M. (2010). The [FeFe]-hydrogenase maturation protein HydF contains a H-cluster like [4Fe4S]-2Fe site. *FEBS Letters*, 585(1), 225–230.
Doi:10.1016/j.febslet.2010.11.052.
38. Giordano, M., Prioretti, L. (2016). Sulphur and Algae: Metabolism, Ecology and Evolution. Borowitzka et al. (eds.), the *Physiology of Microalgae*, *Developments in Applied Phycology* 6. 185-187.
Doi: 10.1007/978-3-319-24945-2 9.
39. Kosourov, S. N., Batyrova, K. A., Petushkova, E. P., Tsygankov, A. A., Ghirardi, M. L., Seibert, M. (2012). Maximizing the hydrogen photoproduction yields in *Chlamydomonas reinhardtii* cultures: The effect of the H₂ partial pressure.

- International Journal of Hydrogen Energy, 37(10), 8850–8858.
Doi:10.1016/j.ijhydene.2012.01.082.
40. Williams, C. R., Bees, M. A. (2013). Mechanistic modeling of sulfur-deprived photosynthesis and hydrogen production in suspensions of *Chlamydomonas reinhardtii*. Biotechnology and Bioengineering, 111(2), 320–335.
Doi:10.1002/bit.25023.
41. Nagy, V., Vidal-Meireles, A., Tengölics, R., Rákhely, G., Garab, G., Kovács, L., Tóth, S. Z. (2016). Ascorbate accumulation during sulphur deprivation and its effects on photosystem II activity and H₂ production of the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. Plant, Cell y Environment, 39(7), 1460–1472. Doi:10.1111/pce.12701.
42. Wu, S., Xu, L., Wang, R., Liu, X., Wang, Q. (2011). A high yield mutant of *Chlamydomonas reinhardtii* for photoproduction of hydrogen. International Journal of Hydrogen Energy, 36(21), 14134–14140.
Doi:10.1016/j.ijhydene.2011.05.001.
43. Fedorov, A. S., Kosourov, S., Ghirardi, M. L., Seibert, M. (2005). Continuous Hydrogen Photoproduction by *Chlamydomonas reinhardtii*: Using a Novel Two-Stage, Sulfate-Limited Chemostat System. Applied Biochemistry and Biotechnology, 121(1-3), 403-412.
Doi: 10.1385/abab:121:1-3:0403.
44. Larkum, A.W. (2016). Photosynthesis and Light Harvesting in Algae. The Physiology of Microalgae, Developments in Applied Phycology 6. 67-70.
Doi: 10.1007/978-3-319-24945-2_3.
45. Rivera, C. Zapata, Á. Pinilla, G. Donato, J. Chaparro, B., Jiménez P. (2005). Comparación de la estimación de la clorofila-a mediante los métodos espectrofotométrico y fluorométrico. Acta Biológica Colombiana, 10 (2). 95- 103.
46. Hemschemeier, A.C. (2005). The anaerobic life of the photosynthetic alga *Chlamydomonas reinhardtii* Photofermentation and hydrogen production upon sulphur deprivation. Doktorarbeit. Naturwissenschaften der Fakultät für Biologie an der Internationalen Graduiertenschule Biowissenschaften der Ruhr-Universität Bochum. Germany. 6-10.
47. Gabrielyan, L., Hakobyan, L., Trchounian, A. (2017). Characterization of light-dependent hydrogen production by the new green microalga *Parachlorella kessleri*

- under various conditions. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 175, 207-210.
Doi: 10.1016 / j.jphotobiol.2017.09.006.
48. Barajas-Hernández, L. A., Sierra-Castellanos, E.A. (2017). Evaluación de procesos necesarios para captación y/o almacenamiento de CO₂ como una medida de reducción al impacto ambiental. *Revista Fuentes: El reventón energético*, 15 (2), 79-88.
Doi: <http://dx.doi.org/10.18273/revfue.v15n2-2017007>.
49. Alalayah, W.M., Alhamed, Y.A., Al-Zahrani, A., Gaber, E. (2014). Experimental Investigation Parameters of Hydrogen Production by Algae *Chlorella vulgaris*. *International Conference on Chemical, Environment y Biological Sciences*. 41-43
<http://dx.doi.org/10.15242/IICBE.C914010>.
50. Alalayah, W. M., Al-Zahrani, A., Edris, G., Demirbas, A. (2017). Kinetics of biological hydrogen production from green microalgae *Chlorella vulgaris* using glucose as initial substrate. *Energy Sources, Part A: Recovery, Utilization, and Environmental Effects*, 39(12), 1210–1215.
Doi:10.1080/15567036.2017.1315755.
51. Barsanti, L., Gualtieri, P. (2006). *Algae. Anatomy, Biochemistry, and Biotechnology*. Taylor y Francis group. 301. Faltan datos de la cita
52. Oncel, S., Sukan, F. V. (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(3), 1066–1074.
Doi:10.1016/j.biombioe.2010.11.017.
53. Beltrán-Rocha, J. C., Guajardo-Barbosa, C., Barceló-Quintal, I. D., López-Chuken, U. J. (2017). Biotratamiento de efluentes secundarios municipales utilizando microalgas: Efecto del pH, nutrientes (C, N y P) y enriquecimiento con CO₂. *Revista de Biología Marina y Oceanografía*, 52(3), 417–427.
Doi: 10.4067/s0718-19572017000300001.
54. Rashid, N., Lee, K., Han, J., Gross, M. (2012). Hydrogen production by immobilized *Chlorella vulgaris*: optimizing pH, carbon source and light. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 36 (7), 867–872.
Doi: 10.1007 / s00449-012-0819-9.

55. Fang, H.P. Liu, H. (2002). Effect of pH on Hydrogen production from glucose by a mixed culture. *Bioresource Technology*. (82): 87-93.
56. Papazi, A., Andronis, E., Ioannidis, N., Chaniotakis, N., Kotzabasis K. (2012). High yields of hydrogen production induced by meta-substituted dichlorophenols Biodegradation of green alga *Scenedesmus obliquus*. *PLoS ONE* 7 (11): e49037. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0049037>.
57. Cheirsilp B., Torpee S. (2012). Enhanced 51 carbon and lipid production of microalgae under mixotrophic cultura condition: effect of light intensity, glucose concentration and fed-batch cultivation. *Bioresource Technology* 110: 510-516. Doi: 10.1016 / j.biortech.2012.01.125.
58. Tolstygina, I.V., Antal, T.K., Kosourov, S.N., Krendeleva, T.E., Rubin, A.B., Tsygankov. A.A. (2008). Hydrogen Production by Photoautotrophic Sulfur-Deprived *Chlamydomonas reinhardtii* Pre Grown and Incubated under High Light. *Biotechnology and Bioengineering*. 102: (4). 1-7. Doi: 10.1002/bit.22148.
59. Serrano-Vázquez, R. (2017). Análisis del perfil lipídico de la microalga *Coelastrum* sp. Para la producción de biocombustibles. Tesis de maestría. Centro de Investigación Científica de Yucatán (CICY). México. 2-6.
60. Gallino, A., Castro, A., Bernaus, M., Gaioli, F. (2014). Estudio de potencial de mitigación. *Coraliae S.R.L. y BA Energy Solutions S.A. Argentina*. (1). 2-16.
61. Duangjan, K., Nakkhunthod, W., Pekkoh, J., Pumas, C. (2017). Comparison of hydrogen production in microalgae under autotrophic and mixotrophic media. *Botanica Lithuanica*, 23(2), 169–177. Doi: 10.1515/botlit-2017-0018.
62. Hernández-Pérez, A., Labbé, J. (2014). Microalgas, cultivo y beneficios. *Revista de Biología Marina y Oceanografía*, 49 (2), 157-173. Doi: 10.4067 / s0718-19572014000200001.
63. Hernández-Medina, M., Torruco-Uco, J. G., Chel-Guerrero, L., Betancur-Ancona, D. (2008). Caracterización fisicoquímica de almidones de tubérculos cultivados en Yucatán, México. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 28(3), 718–726. Doi: 10.1590/s0101-20612008000300031.

64. Arias-Peñaranda, M.T., Martínez-Roldán, A.J., Cañizares-Villanueva, R.O. (2013). Producción de biodiesel a partir de microalgas: parámetros del cultivo que afectan la producción de lípidos. *Acta Biológica Colombiana*. 18, (1), p. 43-68.
65. Martín-Sánchez, M., Martín-Sánchez, M. T., Pinto, G. (2013). Reactivo de Lugol: Historia de su descubrimiento y aplicaciones didácticas. *Educación Química*, 24(1), pp.31–36.
Doi: 10.1016/s0187-893x (13)73192-6.
66. Ajcip-Xuyá, M.D. (2017). Evaluación del comportamiento de la electroreología del almidón a través de campos eléctricos inducidos por una corriente eléctrica. Universidad de San Carlos de Guatemala. Facultad de Ingeniería. 17-18.
67. Antal, T.K., Krendeleva, T.E., Laurinavichene, T.V., Makarova, V.V., Tsygankov, A.A., Seibert, M., Rubin, A.B. (2001). The Relationship between the Photosystem 2 Activity and Hydrogen Production in Sulfur Deprived *Chlamydomonas reinhardtii* Cells. *Biochemistry, Biophysics, and Molecular Biology*, (381):1, pp. 119-122.
68. Cortés-Gutiérrez, D.A. (2016). Evaluación de un almidón catiónico como floculante para el proceso de separación de biomasa microalgal. Fundación Universidad de América. Facultad de Ingenierías. Colombia.22.
69. Markou, G., Angelidaki, I., Georgakakis, D. (2012). Microalgal carbohydrates: an overview of the factors influencing carbohydrates production, and of main bioconversion technologies for production of biofuels. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 96(3), 631–645.
Doi: 10.1007/s00253-012-4398-0.
70. Wang, C., Kong, H., He, S., Zheng, X., Li, C. (2009). The inverse correlation between growth rate and cell carbohydrate content of *Microcystis aeruginosa*. *Journal of Applied Phycology*, 22(1), 105–107.
Doi: 10.1007/s10811-009-9421-1.
71. Fouchard, S., Hemschemeier, A., Caruana, A., Pruvost, J., Legrand, J., Happe, T., Peltier, G., Laurent C. (2005). Autotrophic and Mixotrophic Hydrogen Photoproduction in Sulfur-Deprived *Chlamydomonas* Cells. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(10). p. 6199–6205.
Doi:10.1128/AEM.71.10.6199–6205.2005.
72. Doucha, J., Lívanský, K. (2011). Production of high-density *Chlorella* culture grown in fermenters. *Journal of Applied Phycology*, 24(1), 35–43.

- Doi: 10.1007/s10811-010-9643-2.
73. Brányiková, I., Maršáľková, B., Doucha, J., Brányik, T., Bišová, K., Zachleder, V., Vítová, M. (2010). Microalgae-novel highly efficient starch producers. *Biotechnology and Bioengineering*, 108(4), 766–776.
Doi:10.1002/bit.23016.
74. Yuan, Y., Liu, H., Li, X., Qi, W., Cheng, D., Tang, T., Sun, Y. (2017). Enhancing Carbohydrate Productivity of *Chlorella* sp. AE10 in Semi-continuous Cultivation and Unraveling the Mechanism by Flow Cytometry. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 185(2), 419–433.
Doi: 10.1007/s12010-017-2667-1.
75. Cheng, D., Li, D., Yuan, Y., Zhou, L., Li, X., Wu, T., Sun, Y. (2017). Improving carbohydrate and starch accumulation in *Chlorella* sp. AE10 by a novel two-stage process with cell dilution. *Biotechnology for Biofuels*, 10(1). 2-14.
Doi: 10.1186/s13068-017-0753.
76. Ghirardi, M. L., Zhang, L., Lee, J., Flynn, T., Seibert, M., Greenbaum, E., Melis, A. (2000). Microalgae: a green source of renewable H₂. *Trends Biotechnology*. 18:506–511.
Doi: 10.1016 / s0167-7799 (00) 01511-0.
77. Melis, A., Zhang, L., Forestier, M., Ghirardi, M., Seibert, M. (2000). Producción sostenida de gas de hidrógeno fotobiológico tras la inactivación reversible de la evolución del oxígeno en el alga verde *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiology* 122 (1): 127-136.
78. Chen, M., Li, Y., Li, P., Wang, W., Qi, L., Li, P., Li, S. (2019). A novel native bioenergy green alga can stably grow on waste molasses under variable temperature conditions. *Energy Conversion and Management*, 196, 751–758.
Doi:10.1016/j.enconman.2019.06.017.
79. Martín, J. López, E. (2009). Modificación física del almidón de yuca y evaluación de la susceptibilidad a la hidrólisis enzimática por una alfa amilasa. *Revista Colombiana de Química*, 38(3): 395-408.
<http://dx.doi.org/10.15446/rev.colomb.quim>.
80. Ronaldson, M. y schoonees, B. (2004). A basic method for the analysis of starch in clear juice. University of KwaZulu-Natal. South Africa. pp: 561-564.

81. Zhang, L., Happe, T., y Melis, A. (2002). Biochemical and morphological characterization of sulfur-deprived and H₂-producing *Chlamydomonas reinhardtii* (green alga). *Planta*, 214(4), 552–561.
Doi: 10.1007/s004250100660.
82. Lozano, T. Reconocimiento y diferenciación de carbohidratos. Universidad de Bogotá. Laboratorio de química orgánica. pp:1-7.
83. Fernández-Alvarez, F., Rodríguez-Acosta, A. y Perdomo-Morales, A. (1996). Comparación de dos métodos para determinar almidón en azúcar crudo. Instituto Cubano de Investigaciones Azucareras (ICINAZ). pp: 47-51.
84. Oncel, S. y Sabankay, M. (2012). Microalgal biohydrogen production considering light energy and mixing time as the two key features for scale-up. *Bioresource Technology*, 121, 228–234.
Doi: 10.1016 / j.biortech.2012.06.079.
85. Hemschemeier, A., Melis, A., Happe, T. (2009). Analytical approaches to photobiological hydrogen production in unicellular green algae. *Photosynthesis Research*, 102 (2-3), 523–540.
Doi: 10.1007 / s11120-009-9415-5.
86. Hemschemeier, A., Happe, T. (2011). Alternative photosynthetic electron transport pathways during anaerobiosis in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1807(8), 919–926.
Doi:10.1016/j.bbabi.2011.02.010.
87. Márquez- Figueroa, A. (2020). Proceso fotosintético. Recuperado y modificado de <https://slideplayer.es/slide/13938171/>. Consultado: mayo 2020.
88. Barzola-García, E., Granados-Cirilo, A., Moreno-Reyes, Y. (2014). Reconocimiento de carbohidratos. Instituto Superior Daniel Alcides Carrión. Recuperado de <https://es.slideshare.net/agc1992/reconocimiento-de-carbohidratos>. Consultado: 27 de junio de 2020.
89. Cota-quintero, K. (2019). Efecto de la limitación de nutrientes en la composición bioquímica de *Ettlia oleabundans* y su potencial en la producción de compuestos de alto valor agregado. Tesis de maestría. Centro de Investigaciones Biológicas del Noreste, S.C. La Paz, Baja California Sur. 67-68.

90. Arredondo- Vega, B. y Voltolina, D. (2007). Método y herramientas analíticas en la evaluación de la biomasa microalgal. Centro de investigaciones Biológicas del Noreste, S.C. La Paz, Baja california Sur. 17-24.
91. Rodríguez- Vargas, M. (2016). Variabilidad de la inactivación microbiana y de la fase de latencia de los microorganismos supervivientes a un proceso de acidificación. Tesis doctoral. Universidad Complutense de Madrid. España. 68-69.
92. Sánchez-Martín del Campo, J. (2013). Producción de hidrógeno molecular: fotosíntesis anóxica de *Chlamydomonas reinhardtii* y degradación de xilosa por una ruta enzimática sintética. Tesis doctoral. Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional. Mérida, Yucatán. 23-30.

ANEXOS

Tabla 2. Composición del medio TAP

Solución stock	Para 1L
Tris base 1M	20 mL
Buffer de fosfato II	1 mL
Metales traza Hutner	1 mL
Solución A	10 mL
Ácido acético glacial	1 mL

Tris base	
Reactivos	Cantidad para 200 mL
Tris base 1 M	24.228 gr

Buffer de fosfatos	
Reactivos	Para 100 ml
K_2HPO_4	10.8 gr
KH_2PO_4	5.6 gr

Metales traza Hutner	
Reactivos	Para 1L
BO_3H_3	11.4 gr
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	22.0 gr
$MnCl_2 \cdot 4H_2O$	5.06 gr
$FeSO_4 \cdot 6H_2O$	4.99 gr
$CoCl_2 \cdot 6H_2O$	1.61 gr
$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	1.57 gr
$Mo_7O_{24}(NH_4)_6 \cdot 4H_2O$	1.1 gr

Solución A	
Reactivos	Para 1 L
NH ₄ Cl	40 gr
Mg SO ₄ . 7 H ₂ O	10 gr
CaCl ₂ . 2 H ₂ O	5 gr

El medio se ajustó el pH a 7 y se esterilizó en la autoclave a 120°C por 20min a 1.26 kg/cm² de presión.

Tabla 3. Composición medio TAP (tris-acetato-fosfato) modificado

Solución stock		Cantidad para 1 L
	Tris base 1M	20 mL
	Buffer de fosfato II	1 mL
	Metales traza Hutner	1 mL
	Solución A	10 mL
	Ácido acético glacial (pH 7)	1 mL

Tris base 1 M		
Compuesto	Cantidad para 200 mL	
Tris base 1 M	24.228 g	

Buffer de fosfato II		
Compuesto	Cantidad para 100 mL	
Na ₂ HPO ₄	10.8 g	
NaH ₂ PO ₄	5.6 g	

Metales traza de Hutner (Modificado)		
Compuesto	Cantidad para 1 L	
	BO ₃ H ₃	11.4 g
●	ZnCl ₂	10.44 g
	Mn.Cl ₂ . 4H ₂ O	5.06 g
●	FeCl ₃	2.92 g
	CoCl ₂ . 6H ₂ O	1.61 g
●	CuCl ₂ . 2 H ₂ O	1.08 g
	MO ₇ O ₂₄ (NH ₄) ₆ . 4 H ₂ O	1.1 g

Solución A (Modificado)		
Compuesto	Cantidad para 1 L	
	NH ₄ Cl	40 g
●	MgCl ₂ . 6H ₂ O	4.12 g
	CaCl ₂ .2H ₂ O	5 g

● Modificación para la ausencia de azufre.