



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE CIENCIAS

PRODUCCIÓN BIOLÓGICA DE HIDRÓGENO MEDIANTE
MICROORGANISMOS FOTOSINTÉTICOS; MICROALGAS
VERDES (*Scenedesmus acutus*) Y BACTERIAS
FOTOSINTÉTICAS (*Rhodobacter sphaeroides*)

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

**MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
(BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)**

P R E S E N T A

BIOL. DAVID CHICALOTE CASTILLO

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: Dr. Manuel Jiménez Estrada

COMITÉ TUTOR: Dr. Georges Dreyfus Cortes
Dr. Blas Lotina Henssen
Dr. Pedro Ramírez García
Dra. Nathalie Cabirol

MÉXICO, D.F.

Enero, 2011



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
FACULTAD DE CIENCIAS
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

OFICIO FCIE/DEP/587/10

ASUNTO: Oficio de Jurado

Dr. Isidro Ávila Martínez
Director General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 26 de octubre de 2009, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS (BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)** del (la) alumno (a) **CHICALOTE CASTILLO DAVID** con número de cuenta **97333500** con la tesis titulada **"PRODUCCION BIOLÓGICA DE HIDROGENO MEDIANTE MICROORGANISMOS FOTOSINTÉTICOS; MICROALGAS VERDES Y BACTERIAS FOTOSINTÉTICAS."**, realizada bajo la dirección del (la) **DR. MANUEL JIMENEZ ESTRADA:**

Presidente: DR. GEORGES DREYFUS CORTES
Vocal: DR. BLAS LOTINA-HENNSEN
Secretario: DR. MANUEL JIMENEZ ESTRADA
Suplente: DR. PEDRO RAMIREZ GARCIA
Suplente: DRA. NATHALIE CABIROL

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, D.F., a 19 de noviembre de 2010.

Dr. Juan Núñez Farfán
Coordinador del Programa



AGRADECIMIENTOS

Al Programa de Maestría en Ciencias Biológicas, UNAM, por acrecentar mi interés en el conocimiento científico, logrando ser cada día, una mejor persona.

Al CONACYT, por brindarme los recursos en la realización y culminación de mis estudios de Maestría. Beca No. 225898.

Al Dr. Manuel Jiménez Estrada, por creer en este proyecto y dirigirlo hasta su término, por el apoyo constante, interés y sobretodo por la confianza brindada, Muchas Gracias.

Al Dr. Blas Lotina Hensen, por concederme su valiosa ayuda en la realización de la fase experimental del presente trabajo mediante el programa DGAPA – PAPIIT IN211304. Al Dr. agradezco su atención y asesoría en el tema de la fluorescencia de la clorofila “a”.

Al Dr. Pedro Ramírez García, por su apoyo y ser en gran medida parte en este proyecto, al brindarme las instalaciones del Laboratorio de Bacteriología de la UIICSE, FESI.

Al Dr. Georges Dreyfus Cortes, al proporcionarme parte del material biológico utilizado en fase experimental y por sus consejos y comentarios críticos que enriquecieron el contenido de esta tesis.

A la Dra. Nathalie Cabirol, por ser parte del jurado, su adecuada revisión y opiniones sobre este trabajo y principalmente por su calidez humana.

A la M. en C. Beatriz King Díaz, por su tiempo y dedicación en la elaboración y revisión de este proyecto. Gracias por su colaboración.

A Lilia Jimenez Solis, responsable del área de becas y a la Secretaria Técnica del Posgrado de Ciencias Biológicas, por la atención y asesoría brindada en los trámites del programa.

A la Dra. Isabel Saad Villegas, por su participación en el desarrollo de la parte experimental.

A mis padres, Maria Felix Castillo y Carlos Chicalote García, por brindarme su apoyo, cariño y comprensión, por ser un ejemplo de perseverancia y compromiso.

A mis hermanos. Carlos, Roxana y Ricardo, siempre atentos a mis intereses, estimulando e impulsándome a concluirlos, por ser una guía de superación y permitirme retribuirles en cuanto pueda.

A mis grandes amigas, que me han acompañado en esta travesía, con ustedes los momentos se vuelven los mejores!!!. Mago, Bety, Jane e Itzel a ustedes gracias por ser parte de mi vida.

A Berenice Cabrera Martínez, con su cariño y apoyo me alienta a continuar adelante, gracias por compartir mi ser a tu lado.

A mis compañeros en esta etapa de la Maestría, al Malandro, Perla Texocotitla, Judith Mejia Rubin, Alejandra Sánchez, Marlen Fuentes, con su compañía nunca faltaron las risas en esas amenas charlas.

CON AMOR
A MIS PADRES

MARÍA FELIX CASTILLO
CARLOS CHICALOTE GARCÍA

SI NO CONOZCO UNA COSA, LA INVESTIGARÉ.

Louis Pasteur

Índice General

Índice General.....	I
Contenido.....	I
Lista de Figuras.....	III
Lista de Tablas.....	V
Lista de Diagramas.....	V
Abreviaturas.....	VI
Resumen.....	VII
Abstract.....	IX

Contenido

Introducción.....	1
Marco Teórico.....	4
<i>Microorganismos fotosintéticos productores de H₂</i>	4
<i>Proceso de fotosíntesis en Scenedesmus acutus y Rhodobacter sphaeroides</i>	8
<i>Producción biológica de hidrógeno</i>	14
<i>Clasificación de los procesos biológicos en la generación del hidrogeno</i>	19
<i>Fluorescencia in vivo de la clorofila "a"</i>	23
Antecedentes.....	31
Objetivos.....	41
Hipótesis.....	42
Materiales y Método.....	43
<i>Estado del arte</i>	44
<i>Obtención de cepas</i>	44

<i>Curva de crecimiento por absorbancia</i>	49
<i>Curva de crecimiento por medio de la tinción de DAPI</i>	50
<i>Eficiencia fotosintética y respiratoria</i>	53
<i>Fluorescencia in vivo en Scenedesmus acutus</i>	54
<i>Diseño y elaboración del sistema de generación de H₂</i>	55
Resultados.....	56
<i>Curva de crecimiento</i>	56
<i>Tinción de DAPI</i>	60
<i>Tasa de crecimiento</i>	61
<i>Eficiencia fotosintética</i>	62
<i>Eficiencia respiratoria</i>	63
<i>Fluorescencia in vivo en Scenedesmus acutus</i>	64
Discusión.....	77
Conclusiones.....	86
Bibliografía.....	88
Anexo.....	92

Lista de Figuras

Figura 1: Resumen del proceso de la fotosíntesis en el alga verde que utiliza dos fotosistemas, el PSII y el PSI, durante el flujo electrónico lineal. Las flechas en azul indican el flujo de electrones, las flechas en rojos, los protones.....	11
Figura 2: Flujo de electrones, formación y liberación del oxígeno en el cloroplasto del PSII.....	12
Figura 3: Representación esquemática del aparato fotosintético en la membrana intracitoplasmática de la bacteria púrpura <i>R. sphaeroides</i>	13
Figura 4: Proceso de producción de hidrógeno en algas verdes unicelulares.....	15
Figura 5: Esquema general de producción de hidrógeno en la célula del alga verde <i>C. reinhardtii</i>	16
Figura 6: Proceso de producción de hidrógeno en <i>R. sphaeroides</i>	17
Figura 7: Proceso de biofotólisis. Dibujo esquemático de las reacciones de luz – oscuridad que ocurren en el cloroplasto de la microalga verde.....	21
Figura 8: Esquema simplificado de la cascada de energía del aparato fotosintético.....	23
Figura 9: Incremento polifásico de la fluorescencia de la clorofila a (OJIP) exhibida en plantas.....	26
Figura 10: Cinética de la fluorescencia de la clorofila a.....	28
Figura 11: Transiente, tiempo e información en que se presenta cada banda en la cinética de fluorescencia de la clorofila a.....	28
Figura 12: Curva de crecimiento de <i>S. acutus</i> en Medio Basal Bold y Medio Modificado BoldMgCl ₂	56
Figura 13: Curva de crecimiento de <i>S. acutus</i> en Medio Modificado BoldZnCl ₂ y Medio Modificado BoldsinZnSO ₄	57
Figura 14: Comparación de los cuatro medios de cultivo para <i>S. acutus</i>	57
Figura 15: Análisis estadístico ANOVA para <i>S. acutus</i> comprado en los cuatro medios de cultivos.....	58
Figura 16: Curva de crecimiento para <i>R. sphaeroides</i> en Medio Sistrof's y Medio Modificado Sistrof's en un periodo de 30 hrs.....	59
Figura 17: Comparación en crecimiento de <i>R. sphaeroides</i> cuando se cultiva en Medio Sistrof's y Medio Modificado Sistrof's.....	60

Figura 18: Comparativa del desprendimiento en nanoátomos de oxígeno en los distintos medios de cultivo Bold.....	63
Figura 19: Comparativa del consumo en nanoátomos de oxígeno en los distintos medios de cultivo Bold.....	64
Figura 20: Curvas OJIP de los distintos medios de cultivo para <i>Scenedesmus acutus</i> a los 7, 14, 21 y 28 días de crecimiento.....	65
Figura 21: Radar Plot de <i>Scenedesmus acutus</i> de 7 y 14 días de crecimiento con Medio Modificado BoldMgCl ₂ , Medio Modificado BoldZnCl ₂ y Medio Modificado BoldsinZnSO ₄ ..	68
Figura 22: Radar Plot de <i>Scenedesmus acutus</i> de 21 y 28 días de crecimiento con Medio Modificado BoldMgCl ₂ , Medio Modificado BoldZnCl ₂ y Medio Modificado BoldsinZnSO ₄ ..	70
Figura 23: Radar Plot de <i>Scenedesmus acutus</i> de 28 días de crecimiento con Medio Basal Bold, Medio Modificado BoldMgCl ₂ , Medio Modificado BoldZnCl ₂ y Medio Modificado BoldsinZnSO ₄	72
Figura 24: Resumen comparativo de los parámetros fotosintéticos mediante fluorescencia <i>in vivo</i> en <i>Scenedesmus actus</i> , de 7 a 28 días de crecimiento con Medio Basal Bold, Medio Modificado BoldMgCl ₂ , Medio Modificado BoldZnCl ₂ y Medio Modificado BoldsinZnSO ₄ ..	74
Figura 25: Cinética de la fluorescencia variable relativa de la clorofila a en <i>S. acutus</i> en 7 días de crecimiento.....	75
Figura 26: Cinética de la fluorescencia variable relativa de la clorofila a en <i>S. acutus</i> en 21 días de crecimiento.....	75
Figura 27: Cinética de la fluorescencia variable relativa de la clorofila a en <i>S. acutus</i> en 28 días de crecimiento.....	76

Lista de Tablas

Tabla 1: Microorganismos usados en la producción de hidrógeno.....	19
Tabla 2: Conteo de células por mililitro mediante la técnica de tinción por DAPI para <i>Scenedesmus acutus</i>	60
Tabla 3: Valores del conteo células por mililitro mediante tinción por DAPI para <i>R. sphaeroides</i> cuando se cultiva en Medio Sistrom´s y Medio Modificado Sistrom´s.....	61
Tabla 4: Valores de velocidad de crecimiento y tasa generacional de <i>Scenedesmus acutus</i> en 7 días de crecimiento.....	61
Tabla 5: Valores sobre velocidad de crecimiento y tasa generacional de <i>Rhodobacter sphaeroides</i> en un periodo de 24 horas.....	62
Tabla 6: Producción de nanoátomos de oxígeno durante la fotosíntesis mediante inducción de luz por electrodo tipo Clark.....	63
Tabla 7: Consumo de nanoátomos de oxígeno durante la respiración mediante inducción de oscuridad por electrodo tipo Clark.....	64

Lista de Diagramas

Diagrama 1: Diagrama de flujo referente al trabajo realizado en la generación biológica de hidrógeno.....	43
Diagrama 2: Diagrama del método de preparación cuando se sustituye $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ por $MgCl_2$. Primer ensayo.....	47
Diagrama 3: Diagrama del método de preparación cuando se sustituye $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ por $MgCl_2$. Segundo ensayo.....	48
Diagrama 4: Diagrama de flujo de la técnica de Tinción de DAPI utilizada en <i>S. acutus</i> y <i>R. sphaeroides</i>	52

ABREVIATURAS

δR	Eficiencia del electrón para moverse hacia el fotosistema I
ABS/RC	Absorción por Centro de Reacción (Absorption per Reaction Center)
CL	Centro de captación de luz
Chl a	Clorofila a
DAPI	4',6-Diamidino-2-fenil indol diclorhidrato
DI/RC	Disipación por Centro de Reacción (Heat Dissipation per Reaction Center)
ET	Transporte de electrones (Electron Transport)
F	Fluorescencia
F_0	Fluorescencia mínima
F_m	Fluorescencia máxima
Fd	Ferredoxina
Fe-S	Proteína hierro-azufre
Kn	Constante no fotosintética
Kp	Constante fotosintética
OEC	Complejo productor de oxígeno (Oxygen Evolving Complex)
MBB	Medio Basal Bold
MMB	Medio Modificado Bold $MgCl_2/ZnCl_2/sinZnSO_4$
MS	Medio Sistrom's
MMS	Medio Modificado Sistrom's
PI/ABS	Índice Fotosintético sobre la base de Absorción de energía
PSI	Fotosistema I (Photosystem I)
PS II	Fotosistema II (Photosystem II)
PQ	Plastoquinona
Q_A	Quinona A
Q_B	Quinona B
QH_2	Quinona reducida
Sum K	Suma de la contante no fotosintética y fotosintética
TR/RC	Energía atrapada por Centro de Reacción (Trapping per Reaction Center)
V_i	Fluorescencia variable relativa en el paso I
V_j	Fluorescencia variable relativa en el paso J

RESUMEN

En la realización de la presente tesis se aborda el tema que sustentan los estudios en el conocimiento sobre el uso de microorganismos fotosintéticos tales como *Scenedesmus acutus*, microalga verde y *Rhodobacter sphaeroides* una bacteria fotosintética. Ambos organismos son capaces de convertir la energía lumínica en energía química en la forma de hidrógeno.

Enfocados en el estudio de la fluorescencia *in vivo* de la clorofila “a” en *S. acutus* permitió evaluar el efecto que producen los distintos sustratos utilizados en la generación de H₂ durante la fotosíntesis. El método de la fluorescencia *in vivo* fue empleado como un indicador de todos los niveles funcionales del proceso y reacciones fotosintéticas que participan en la producción de H₂. El presente trabajo tiene como objetivo el análisis en la eficiencia de producción de hidrógeno a partir de sustratos diseñados en obtener una baja producción de oxígeno en las microalgas verdes, ocasionada por la privación de azufre en los medios de cultivo. Otras variables analizadas fueron; la velocidad de crecimiento y tasa generacional, la eficiencia fotosintética en el consumo y desprendimiento de oxígeno, por el microalga *S. acutus*.

El crecimiento de *R. sphaeroides* en Medio Sistro (MS) y Medio Modificado Sistro (MMS) empieza a partir de la hora 0 a la hora 6, donde se da la fase de latencia. A partir de las 8 y hasta las 14 horas, la fase exponencial y de 15 horas en adelante se muestra la fase estacionaria. La velocidad de crecimiento contempla un periodo de 0.2073 para MS y 0.2070 horas⁻¹ en MMS, una tasa generacional de 3.34 horas en ambos medios.

En *S. acutus* la fase de latencia sucede del día 0 al día 2 de incubación, la fase exponencial tiene una duración de dos días, del día 3 al día 5, a partir del día 6 al 8 se encuentra la fase estacionaria, estos resultados están caracterizados para los cuatro medios de cultivos; Medio Basal Bold (MBB), Medio Modificado BoldMgCl₂ (MMBMgCl₂), Medio Modificado BoldZnCl₂ (MMBZnCl₂) y Medio Modificado BoldsinZnSO₄ (MMBsinZnSO₄).

La velocidad de crecimiento comprende un tiempo de 0.55, 0.56, 0.56 y 0.56 días⁻¹, la tasa generacional se da en un tiempo de 1.26, 1.23, 1.24 y 1.23 días para los medios de cultivos; MBB, MMBMgCl₂, MMBZnCl₂ y MMBsinZnSO₄, respectivamente.

Los resultados en la eficiencia fotosintética de *S. acutus* a los 14 días de crecimiento muestran un decremento en la producción de oxígeno del 20 y 40% en MMBZnCl₂ y MMBsinZnSO₄, cuando son comparados con el Medio Basal Bold. En la eficiencia respiratoria en MMBMgCl₂ y MMBZnCl₂ no se aprecia consumo de oxígeno, mientras que en MMBsinZnSO₄ se presenta un decremento del 33.33% con respecto al Medio Basal Bold.

En las cuatro semanas de crecimiento de *S. acutus* la supresión de azufre en los medios de cultivo desacopla el complejo de escisión del agua y reduce la eficiencia del fotosistema II. La conectividad entre el PSII y el PSI se ve afectada en las dos primeras semanas de crecimiento de *S. acutus* con los tres medios de cultivo modificados.

Se determinó que a los 21 días de crecimiento de *Scenedesmus acutus*, el medio de cultivo MMBZnCl₂ no muestra decremento en el transporte de electrones a través de los fotosistemas II y I en comparación con los otros dos medios de cultivos probados, MMBMgCl₂ y MMBsinZnSO₄. Así, el MMBZnCl₂ es considerado como el mejor sustrato selectivo en la generación de hidrógeno.

ABSTRACT

This thesis is focused on the theme underlying the studies in knowledge about the use of photosynthetic microorganisms such as *Scenedesmus acutus*, green microalgae and *Rhodobacter sphaeroides*, photosynthetic bacteria. Both organisms are capable of converting light energy into chemical energy in the hydrogen form.

The polyphasic OJIP fluorescence transient was used to evaluate photosystem II criteria and the effect produced by the different substrates used in hydrogen generation during photosynthesis. This method of fluorescence *in vivo* was used as an indicator of all functional levels of the photosynthetic process and reactions involved in the production of H₂.

The main objective of this study was to analyze the efficiency of hydrogen production from substrates designed to get a low production of oxygen by green microalgae, caused by deprivation of sulfur in the media culture. Other variables analyzed were: the growth rate and generation rate, photosynthetic efficiency in the consumption and release of oxygen by the microalgae *S. acutus*.

The growth of *R. sphaeroides* on Sistrom Medium (MS) and Sistrom Modified Medium (MMS) start from 0 to 6 hours, which gives the lag phase. From 8 to 14 hours, the exponential phase and 15 hours later, the stationary phase. The growth rate covers a period of 0.2073 hours in MS and 0.2070 hours in MMS, a generation rate of 3.34 hours for both culture mediums.

In *S. acutus* the lag phase occurs from day 0 to day 2 of incubation, the exponential phase is comprised of 48 hours, from day 3 to day 5, from day 6 to 8 is the stationary phase, it is characterized for four culture mediums, Bold Basal Medium (MBB), Bold Modified MediumMgCl₂ (MMBMgCl₂), Bold Modified MediumZnCl₂ (MMBZnCl₂) and Bold Modified MediumsinZnSO₄ (MMBsinZnSO₄).

The growth rate includes a time of 0.55, 0.56, 0.56 and 0.56 day⁻¹. The generation rate occurs in a time of 1.26, 1.23, 1.24 and 1.23 days for the culture mediums MBB, MMBMgCl₂, MMBZnCl₂ and MMB_{sin}ZnSO₄, respectively.

The result in the photosynthetic efficiency of *S. acutus* after 14 days of growth show a decrease in the production of oxygen from 20 to 40% in MMBZnCl₂ and MMB_{sin}ZnSO₄, when compared with MBB. In the respiratory efficiency with MMBMgCl₂ and MMBZnCl₂ no seen oxygen consumption, whereas in MMB_{sin}ZnSO₄ presents a decrease of 33.33% over the MBB.

Within four weeks of growth of *S. acutus* with private sulfur mediums there is a decoupling on the water splitting complex and reduces the efficiency of photosystem II. The connectivity between PSII and PSI is affected in the first two weeks of growth of microalgae with three culture modified mediums.

It was determined that at 21 days of growth in *Scenedesmus acutus*, the MMBZnCl₂ does not shown a decrease in electron transport through photosystems II and I, when it is compared versus the MMBMgCl₂ and MMB_{sin}ZnSO₄. Thus, the culture medium MMBZnCl₂ is considered to be the best selective substrate in the generation of hydrogen.

1. INTRODUCCIÓN

La utilización del hidrógeno ha sido universalmente aceptada como un combustible ambientalmente seguro, pues en su combustión solo se produce agua, además no genera gases de tipo invernadero hacia la atmósfera y su generación puede provenir a partir de fuentes renovables. Así, el hidrógeno hoy en día es considerado como el más prometedor de los biocombustibles que pueden sustituir a los energéticos de origen fósil (Das y Veziroglu, 2008).

El biohidrógeno, obtenido a partir de fuentes renovables, ha llamado la atención en una sociedad económicamente lastimada, debido a su alto potencial como una alternativa sostenible a los métodos convencionales de generación del hidrógeno. Los procesos biológicos, a diferencia de sus homólogos, químicos o electroquímicos, son catalizados por microorganismos fotosintéticos o bien fermentativos, en medio acuoso, a presión atmosférica y temperatura ambiente (Momirlan y Veziroglu, 2002).

Los métodos de producción del biohidrógeno presentan otra ventaja sobre los métodos convencionales, y es que los primeros pueden ser técnicas de producción de energía bien diseñadas y preparadas para que estos se construyan de manera descentralizada, de dimensiones pequeñas, donde esté disponible la biomasa o los sustratos a utilizar. Por lo tanto, estos factores evitan los gastos de energía y reducen los costos en transporte (Johnston *et. al.*, 2004).

La principal intención en la promoción de los procesos biológicos del hidrógeno, es la mejora en los métodos de generación, obtener el máximo rendimiento de los microorganismos responsables de la producción de este energético. Además, se intenta demostrar que es posible una viabilidad económica, que satisfaga las necesidades energéticas de la población (Das y Veziroglu, 2001).

En los sistemas biológicos, el proceso de fotosíntesis, por un lado, y el proceso de producción de hidrógeno por el otro, son procesos que combinados pueden ser empleados como una fuente de energía renovable. Sin embargo, ambos mecanismos tienen su origen

bajo distintas presiones evolutivas, sin la necesidad que en un momento dado se hayan adaptado el uno del otro (Esper *et. al.*, 2006).

El hidrógeno fue una fuente de energía vital para organismos en eras tempranas de nuestro planeta, pero esto sólo fue posible bajo condiciones de una atmósfera reductora. Este proceso fue perdiendo importancia gradualmente con el desarrollo de una maquinaria fotosintética, capaz de explotar la energía lumínica de manera más eficiente, particularmente cuando el fotosistema II y el fotosistema I se combinaron en una cadena fotosintética transportadora de electrones. Este proceso fue capaz de oxidar el agua en el fotosistema II usando la energía solar, proporcionando energía suficiente hacia el medio (Appel y Schulz, 1998).

Así, los procesos dependientes de hidrógeno fueron perdiendo su rol principal como una necesidad para la supervivencia de muchas células. En consecuencia, no había una fuerte presión evolutiva para el diseño de hidrogenasas resistentes al oxígeno, aunado a esto, el incremento en el contenido de oxígeno de la atmósfera producido por el proceso de separación del agua dio lugar a que estas enzimas se encontraran en un estado inactivo o apagado (Tamagnini *et. al.*, 2006).

Hoy día, las hidrogenasas aún existen en las microalgas y en las bacterias fotosintéticas, pero sus genes son normalmente activados bajo condiciones anaeróbicas, su principal función está dividida por dos vías: la primera es proporcionar una fuente alterna de electrones como ayuda para la supervivencia bajo condiciones subóptimas, la segunda, es capturar electrones como una válvula de seguridad para prevenir el peligro de sobre reducción de la cadena transportadora de electrones. En adición a estas reacciones, el hidrógeno también puede ser producido por la función de las nitrogenasas, encargadas de fijar nitrógeno atmosférico y presentes de igual forma en las bacterias fotosintéticas (Kruse *et. al.*, 2005).

Es así, como los sistemas biológicos fotoproductores de hidrógeno ofrecen una gran variedad de métodos y tecnologías en la generación de energía renovable. Los principales procesos comúnmente utilizados en la producción de hidrógeno suelen emplear a las bacterias fotosintéticas anaeróbicas, que tienen la habilidad de capturar emisiones de luz

cercanas al infrarrojo, mientras que el sustrato utilizado en la generación de H₂ son ácidos orgánicos como glucosa, almidón, celulosa, acetato, malato, etc (Nandi y Sengupta, 1998).

Las algas verdes unicelulares, también son organismos empleados en la fotoproducción de H₂, estas presentan la capacidad de capturar la porción visible del espectro de emisión de la luz solar. Estas algas, parecen ser muy prometedoras, pues el mecanismo de generación de este gas energético, se lleva a cabo utilizando elementos completamente renovables como lo son el agua y la luz solar, el resultado de su participación, logran romper la molécula de agua, formando por separado hidrógeno y oxígeno atmosférico (Prince y Kheshgi, 2005) .

Considerando lo anterior, la producción de biohidrógeno se ha establecido como una posible alternativa integral, un componente primordial en la sustentabilidad energética renovable. Sin embargo, se presenta un gran reto por afrontar, la generación de grandes cantidades de gas hidrógeno. Este problema puede ser resuelto optimizando los procesos biológicos y empleando los sustratos adecuados cuyo origen sea de fuentes renovables (Levin *et. al.*, 2005).

2. MARCO TEÓRICO

2.1. MICROORGANISMOS FOTOSINTÉTICOS PRODUCTORES DE H₂

Se ha utilizado a la alga verde (*Scenedesmus acutus*) y a la bacteria fotosintética (*Rhodobacter sphaeroides*) como los microorganismos fotosintéticos representantes para la elaboración de este trabajo. En ambas especies, se han enfocado las presentes investigaciones con respecto al metabolismo de cada una de ellas que hagan posible la generación del biohidrógeno.

Clasificación taxonómica de la microalga verde *Scenedesmus acutus*

División: Chlorophyta

Clase: Chlorophyceae

Subclase: Chlorophycidae

Orden: Chlorococcales

Familia: Scenedesmaceae

Genero: Scenedesmus

Especie: *Scenedesmus acutus*

Las algas verdes, como también se les conoce a las Chlorophyceae, son organismos unicelulares o coloniales, pueden ser móviles o no, las móviles tienen dos flagelos, aunque algunas de ellas pueden presentar cuatro o hasta más flagelos.

En general, estas algas pueden ser reconocidas por su color verde pasto muy característico, debido a la presencia de la clorofila *a* y *b*, así como por algunos carotenoides. Estos pigmentos están ubicados en los cloroplastos, de los cuales puede haber uno o más en cada célula.

En el interior del cloroplasto puede hallarse una estructura en forma de grano llamada pirenoide, existiendo la posibilidad de encontrar más de uno dentro del cloroplasto; rodeando al pirenoide se encuentran los granos de almidón, un polisacárido utilizado como

fuelle de reserva energética para la célula. Dentro del cloroplasto también encontramos unas estructuras celulares llamadas tilacoides, que están agrupadas en forma de laminas o granas (empaques columnares de tilacoides conectados unos con otros).

Alrededor del 90% de las especies de las Chlorophyceas son de agua dulce, el restante 10% son grupos planctónicos que viven en agua salada. Algunos organismos pueden vivir en los dos ambientes, entre ellos se encuentran las Chlamydomonas.

Esta división incluye algas planctónicas, que habitan en lagos donde el agua no es muy clara y pueden llegar a crecer en gran número, formando una capa de un par de centímetros de grosor en las aguas donde se desarrollan. Otras clorofíceas viven en el bentos, creciendo fijas a rocas u otro tipo de sustrato sobre la costa, generalmente estas algas son microscópicas. En ocasiones las algas verdes llegan a cubrir totalmente las rocas donde se encuentran fijas (Whitford y Schumacher, 1984).

El orden Chlorococcales incluye organismos unicelulares o coloniales no flageladas, algunas colonias son cenóbicas (el número de células es fijo), su reproducción es asexual por esporas móviles o inmóviles. Estos organismos son de vida sésil.

La familia Scenedesmaceae comprende colonias de 2, 4 8 y hasta 16 células, aplanadas, con ejes longitudinales de células en paralelo, adosadas lateralmente y dispuestas en una única serie lineal o alternada. Las células son elipsoidales, ovoides o en forma de media luna o estrechándose hacia cada extremo. La pared celular es lisa y carente de espinas. El cloroplasto es parietal y usualmente con un pirenoide. Son organismos que se encuentran en el fitoplancton de ríos, estanques y lagos, son abundantes en aguas con un alto contenido en nutrientes, especialmente en nitrógeno inorgánico. Su distribución es amplia y han sido reportadas desde Norte America y hasta Sudamérica en ambientes árticos y tropicales (Wehr y Sheath, 2003).

Clasificación taxonómica de la bacteria púrpura no-sulfurosa *Rhodobacter sphaeroides*
(Garrity et al., 2001)

Filum: Proteobacteria

Clase: Alphaproteobacteria

Orden: Rhodobacterales

Familia: Rhodobacteraceae

Genero: Rhodobacter

Especie: *Rhodobacter sphaeroides*

Dentro del mundo de los microorganismos existen dos tipos de procesos fotosintéticos bien diferenciados. Uno de ellos se encuentra en las algas verdes y en cianobacterias: genera oxígeno, emplea clorofila a, presenta dos fotosistemas y utiliza el agua como donador de electrones. El segundo proceso no genera oxígeno, presenta pigmentos ligeramente diferentes, las bacterioclorofilas, poseen solamente un fotosistema y no emplea H₂O como donador de electrones. Este proceso es típico de las bacterias fotótrofas o fotosintéticas (bacterias verdes y bacterias púrpuras) que realizan la fotosíntesis en condiciones estrictamente anaerobias (Stolp, 1996).

Como se menciona arriba, las bacterias fotosintéticas se diferencian de las cianobacterias y de los fotosintetizadores eucariotas por no utilizar el agua como fuente de electrones ni producir oxígeno. En la reacción luminosa de la fotosíntesis de las bacterias púrpuras no se produce NADPH directamente.

Las bacterias fotosintéticas no pueden reducir el NAD⁺ directamente durante la reacción luminosa. Para sintetizar NADH o NADPH, las bacterias púrpuras y verdes deben usar donadores de electrones tales como el hidrógeno, el sulfuro de hidrógeno o compuestos orgánicos que tienen potenciales de reducción más negativos que el agua y que por tanto, son más fáciles de oxidar, debido a que son mejores donadores de electrones.

La bacterioclorofila de las bacterias fotosintéticas tiene máximos de absorción en longitudes de onda más largas. Debido a que estas bacterias crecen en zonas anaerobias profundas de los hábitats acuáticos, no son capaces de utilizar con eficiencia partes del

espectro visible que usan normalmente los organismos fotosintéticos. Los pigmentos de la bacterioclorofila pueden absorber luz en la región del rojo lejano, que no utilizan los otros microorganismos fotosintetizadores (Pares y Juárez, 1997).

Las Rhodobacteraceae incluyen representantes que parecen tener un metabolismo muy flexible: todos ellos utilizan sustratos orgánicos como donadores de hidrógeno para la fotosíntesis, algunos de ellos utilizan compuestos reducidos de azufre. Además crecen aeróbicamente en la oscuridad en función de la materia orgánica presente en el medio (Atlas, 2001).

Las bacterias púrpuras no sulfurosas del género *Rhodobacter* pueden ser móviles o no, las móviles presentan flagelos polares, estos organismos utilizan la fotosíntesis anoxigénica. El sistema fotosintético está contenido en complejos de membrana de forma circular o vesicular, que se continúa con la membrana plasmática. La célula se divide por fisión binaria, de la cual se producen células en cápsula o en forma de cadena.

Las bacterias púrpuras no-sulfurosas son extraordinariamente flexibles en cuanto a la fuente de energía que utilizan. Normalmente crecen de forma anaeróbica como microorganismos fotoorganoheterótrofos; esto es, que captan energía lumínica y utilizan moléculas orgánicas como fuente de electrones y carbono. Aunque reciben el nombre de bacterias no-sulfurosas, algunas especies oxidan niveles muy bajos, no tóxicos de sulfuro a sulfato, creciendo en forma aeróbica, aunque no oxidan azufre elemental a sulfato. En ausencia de luz, las bacterias púrpuras no-sulfurosas crecen de forma aeróbica como quimioorganoheterótrofos.

La morfología de estas bacterias fotosintéticas es muy variable, algunas son espirales, con formas de bacilo, semicirculares o circulares e incluso forman yemas. Debido a su metabolismo, este tipo de bacterias predominan más en el lodo y en el agua de lagos y estanques ricos en materia orgánica y con niveles bajos de sulfuro (Harley y Prescott, 2004).

Los ejemplares de *Rhodobacter sphaeroides* son bacterias cuya morfología es esférica a ovoide, generalmente se encuentran en pares o como una serie de gotas, las cuales están conectadas por un filamento delgado y ligeramente desigual en tamaño. Los cultivos de esta

bacteria púrpura no-sulfurosa son de un color café verdoso oscuro, cuando estos crecen bajo condiciones anaeróbicas al estar presente la luz. Los cultivos que crecen en presencia de luz y aire se tornan de color rojo.

El crecimiento óptimo de *Rhodobacter sphaeroides* se da entre los 30°C y los 35°C. Esta bacteria tiene la habilidad de crecer anaeróticamente en condiciones de oscuridad empleando nitrato como donador de electrones y fuente de nitrógeno, fija N₂, sintetiza bacterioclorofila y reduce metales. *R. sphaeroides* ha sido utilizada como modelo de estudio para el análisis de aspectos genéticos, fotosíntesis y en los procesos de producción de energía (Staley y Bryant, 1989).

2.2 PROCESO DE FOTOSÍNTESIS EN

Scenedesmus acutus y *Rhodobacter sphaeroides*

Fotosíntesis en *Scenedesmus acutus*

Para que la energía luminosa sea utilizada por los seres vivos, primero es absorbida por pigmentos. Un pigmento es cualquier sustancia, o para el proceso de la fotosíntesis, una molécula que absorba luz. La clorofila es un pigmento que absorbe luz en longitudes de onda violeta, azul y rojo; dado que refleja la luz verde parece verde. Diferentes pigmentos absorben energía luminosa a distintas longitudes de onda.

La clorofila *a* es el principal pigmento involucrado directamente en la transformación de la energía luminosa en energía química. Las células fotosintéticas además contienen otro grupo de pigmentos que absorben luz, como la clorofila *b* y los carotenoides, que son rojos, anaranjados o amarillos. Tanto la clorofila *b* como los carotenoides absorben longitudes de onda diferentes de las que absorbe la clorofila *a* (Curtis, 2000).

La fotosíntesis se lleva a cabo en los cloroplastos, grandes organelos ubicados en la parte interior de la microalga. Los cloroplastos están limitados por dos membranas, la membrana externa y la membrana interna, que no participan de manera directa en la fotosíntesis, pues no contienen clorofila. Una tercera membrana, la tilacoidal, es el sitio de la fotosíntesis. En cada cloroplasto la membrana tilacoidal constituye una lámina única interconectada, que

forma numerosas y pequeñas vesículas aplanadas, los tilacoides, que comúnmente se disponen en pilas denominadas granas. El espacio dentro de todos los tilacoides constituye un solo compartimento continuo, la luz tilacoidal.

La absorción de la energía luminosa y su conversión en energía química tiene lugar en complejos proteicos, llamados fotosistemas (II y I, respectivamente), ubicados en la membrana tilacoidal. Un fotosistema posee dos componentes íntimamente vinculados: un centro de reacción y un complejo antena.

El centro de reacción consiste en un complejo de proteínas y un par especial de moléculas de clorofila *a* que captan la energía solar convirtiéndola en energía química. Son dos centros de reacción que están involucrados en el proceso de la fotosíntesis. El P680 en el fotosistema II o PSII y el P700 en el fotosistema I o PSI (los nombres de los centros de reacción están basados en la longitud de onda que absorben los pigmentos de clorofila).

El complejo antena, importante para el aprovechamiento de la luz, consiste en agrupaciones de varios cientos de moléculas de clorofila unidas entre sí por proteínas que las fijan fuertemente sobre la membrana tilacoidal. En cada complejo también existen cantidades variables de pigmentos accesorios, los carotenoides, que se encuentran localizados en cada complejo.

Dentro del complejo antena hay varias proteínas cuya función es mantener las moléculas de pigmento en la orientación y posición precisas óptimas para la absorción de la luz y la transferencia de energía (Paniagua y Nistal, 1999).

Cuando una molécula de clorofila del complejo antena es excitada, la energía es rápidamente transferida desde una molécula a la otra, mediante transferencia energética por resonancia, hasta que alcanza al par especial de clorofilas del centro de reacción. Por lo tanto cada complejo antena actúa a modo de “embudo”, que recoge la energía luminosa y la dirige hacia un único centro de reacción específico, donde se utiliza con eficiencia.

La absorción de un cuanto de luz de 680 nm de longitud de onda por el PSII hace que una molécula de clorofila *a* entre en un estado excitado, haciendo que un electrón se mueva

desde el centro de reacción P680 hacia un aceptor plastoquinona (Q_B) en la superficie estromal; la carga positiva resultante en P680 extrae electrones del H_2O para formar O_2 , que se difunde hacia el exterior, y protones, que permanecen en la luz tilacoidal y contribuyen a incrementar la fuerza protón- motriz utilizada en generar las moléculas de ATP (Alberts *et. al.*, 1996).

Después de que P680 absorbe un segundo fotón, la Q_B acepta un segundo electrón y capta dos protones del espacio estromal para generar quinona reducida (QH_2). Esta última se disocia de su sitio de unión, en el centro de reacción del PSII y es remplazada por Q oxidada. La QH_2 , se difunde al azar en la membrana tilacoidal hasta que encuentra su sitio de unión en el lado luminal del complejo citocromo b/f, en donde libera sus dos electrones y sus dos protones hacia la luz tilacoidal, estos protones se agregan a la fuerza protón- motriz, impulsando así el proceso de síntesis de ATP en el estroma.

La transferencia de electrones desde el PSII hacia el PSI requiere plastocianina, una pequeña proteína que funciona como un transportador electrónico soluble, ya que los dos fotosistemas están separados espacialmente por la membrana tilacoidal. Entonces la plastocianina se difunde en la luz tilacoidal y transporta el electrón al P700 en el PSI (Figura 2.1).

El PSII contiene dos clorofilas de centro reactivo, otras dos clorofilas, dos feofitinas, dos quinonas (llamadas Q_A y Q_B) y un átomo de hierro no hemo. Estas moléculas están unidas a dos proteínas de PSII llamadas D1 y D2. Cuando el PSII absorbe un fotón con una longitud de onda de 680 nm, desencadena la pérdida de un electrón de una molécula de clorofila a P_{680} por lo que se genera P_{680}^+ .

La escisión del H_2O , que provee los electrones para la reducción de P_{680}^+ es catalizada por un complejo de tres proteínas extrínsecas (33,23 y 17 kDa) que integran el complejo productor de oxígeno. Este complejo contiene cuatro iones manganeso (Mn) al igual que iones Cl^- y Ca^{2+} unidos. Los iones de Mn unidos al complejo productor de oxígeno realizan un ciclo a través de cinco estados de oxidación diferentes, S_0 - S_4 .

En este ciclo S, un total de dos moléculas de H_2O se escinden en cuatro protones, cuatro electrones y una molécula de O_2 . Los electrones del H_2O son transferidos de a uno por vez, a través de los iones Mn y una cadena lateral de tirosinas cercada (Z en la figura 2.3.) en el complejo D1, al centro de reacción con P_{680} , en donde regeneran la clorofila reducida (Lodish *et al.*, 2005).

Como en el PSII, la absorción de un fotón por P_{700} del PSI conduce a la extracción de un electrón. La clorofila P_{700} oxidada resultante es reducida por un electrón transferido desde el PSII a través de la plastocianina. El electrón cedido en la superficie luminal por la P_{700} se mueve hacia la superficie estromal de la membrana tilacoidal, en donde es aceptado por la ferredoxina, una proteína de hierro-azufre (Fe-S). Los electrones liberados por el PSI son transferidos desde la ferredoxina a través del transportador de electrones FAD, hasta el NADP^+ para formar, junto con un protón captado desde el estroma, la molécula reducida NADPH, que se utiliza como fuente de energía y poder reductor, respectivamente, para impulsar la transformación de CO_2 en almidón (Larkum *et al.*, 2003).

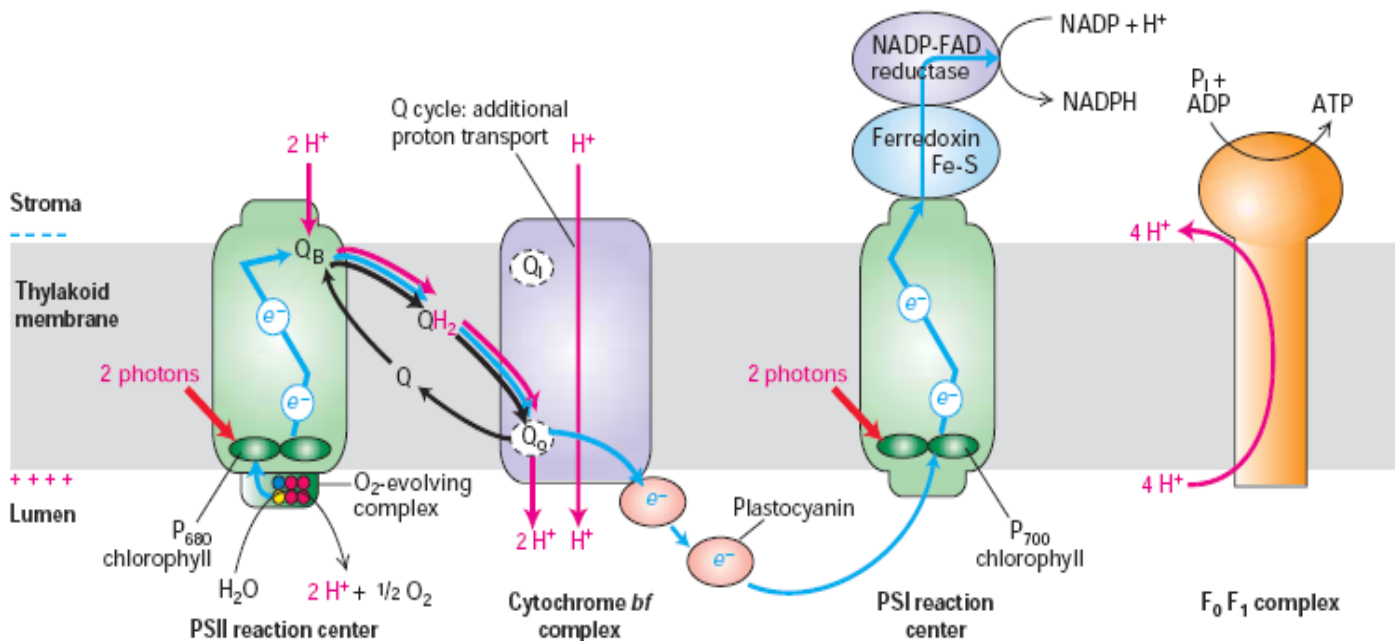


Figura 2.1. Resumen del proceso de la fotosíntesis en el alga verde que utiliza dos fotosistemas, el PSII y el PSI, durante el flujo electrónico lineal. Las flechas en azul indican el flujo de electrones, las flechas en rojos, los protones (Lodish *et al.*, 2005).

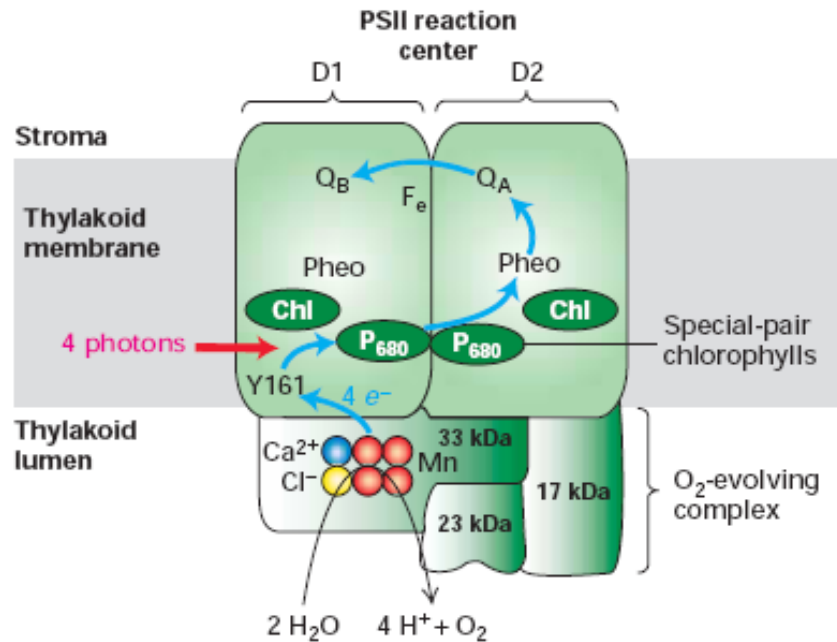


Figura 2.2. Flujo de electrones, formación y liberación del oxígeno en el cloroplasto del PSII (Lodish *et al.*, 2005).

Fotosíntesis en *Rhodobacter sphaeroides*

Las bacterias púrpuras presentan bacterioclorofila *a* o *b*, absorben luz en la banda correspondiente a la bacterioclorofila (400-950 nm), también absorben luz de una segunda región entre los 400 y 500 nm, debido a la presencia de los carotenoides responsables del color rojo, púrpura o marrón de las bacterias fotótrofas. Estos pigmentos protegen a las bacterias del efecto tóxico de la foto-oxidación y además transfieren la energía absorbida a la bacterioclorofila. Invaginaciones de la membrana proporcionan espacio para la localización del aparato fotosintético.

Un elemento esencial del aparato fotosintético es el centro de captación de la luz (CL), que incluye más del 90% de la bacterioclorofila, conjuntamente con carotenoides y muchas proteínas. Estos centros transfieren la energía luminosa a los centros de reacción. Cada centro de reacción está asociado entre 20 y 40 centros de captación de la luz.

El centro de reacción denominado P870, es un complejo que incluye 4 moléculas de bacterioclorofila, de las cuales dos de ellas son activas fotoquímicamente, 2 moléculas de bacteriofeofitina (bacterioclorofila libre de magnesio) y una proteína con tres subunidades diferentes.

Este centro de reacción se encuentra asociado a un complejo de hierro-ubiquinona, estos dos complejos integrados en la membrana, se encuentran asociados a otro complejo, también anclado en la membrana, denominado citocromo bc_1 . Al aparato fotosintético pertenece también la ubiquinona y el citocromo c_2 , moléculas que se mueven libremente en la membrana (Margalith, 1992).

En presencia de luz, cada cuanto absorbido provoca que un electrón se transloque del par de bacterioclorofilas activas del centro de reacción a la bacteriofeofitina, vía una bacterioclorofila secundaria, pasando posteriormente al complejo ubiquinona-hierro. De aquí, el flujo de electrones sigue vía complejo citocromo bc_1 y citocromo c_2 , el cual vuelve a reducir otra vez al complejo P870.

Este transporte de electrones cíclico genera un gradiente de protones en la membrana, estimándose que por cada electrón que circula son expulsados al exterior dos protones que son utilizados para generar ATP mediante la ATP sintetasa (Figura 2.3).

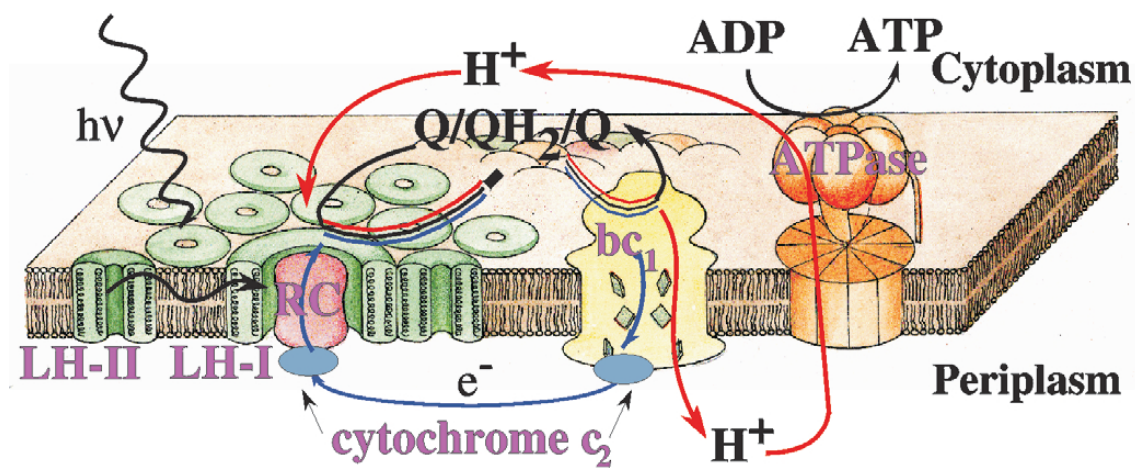


Figura 2.3. Representación esquemática del aparato fotosintético en la membrana intracitoplasmática de la bacteria púrpura (Schulten K, 1999).

La utilización de la luz por la bacteria fotosintética no-sulfurosa tiene como resultado la generación de ATP y no la de poder reductor. Por ello la necesidad de una fuente de poder reductor usada en NAD^+ para generar NADH, la fuente de poder reductor puede ser un compuesto inorgánico reducido de azufre o compuestos orgánicos como donadores de electrones (White, 2000).

2.3 PRODUCCIÓN BIOLÓGICA DE HIDRÓGENO

Microalgas verdes

La habilidad del alga verde de generar fotosintéticamente hidrógeno molecular fue descubierta a principios de 1940 por Hans Gaffron, quien observó que bajo condiciones anaerobias en oscuridad, el alga verde usa el H_2 como donador de electrones en el proceso de fijación de CO_2 o desarrollar hidrógeno en condiciones de luz. Las observaciones de Gaffron se han extendido a varias especies más de algas, entre ellas *Chlamydomonas reinhardtii* y *Scenedesmus obliquus* entre otras (Gaffron y Rubin, 1942)

La producción de hidrógeno por medio de las algas verdes requiere de un periodo de minutos a un par de horas en condiciones de anaerobiosis en oscuridad. Estas adaptaciones aparentemente inducen la biosíntesis o activación de una enzima, la hidrogenasa, la cual realiza una reacción química reversible en donde reduce los protones (H^+) a hidrogeno molecular. Esta se localiza y lleva a cabo su función en el estroma del cloroplasto en el interior del alga verde (Melis y Happe, 2001).

La hidrogenasa es una enzima muy sensible al oxígeno; una concentración $<2\%$ de este gas ocasiona su desactivación y por consiguiente impide se lleve a cabo el proceso de producción de hidrógeno. La privación del nutriente azufre en el alga verde causa una inhibición reversible en la actividad de la producción de oxígeno durante la fotosíntesis (Figura 2.4).

La falta de azufre en el medio de crecimiento afecta de manera negativa la biosíntesis de proteínas D1/33 kDa provocando un desacoplamiento en las funciones de oxidación del agua. Esta privación de azufre reduce la actividad fotoquímica del PSII ocasionando que la

cantidad de oxígeno disminuya y sea consumido en el proceso de la respiración del alga. Por lo tanto, se obtiene un cultivo de algas en condiciones anaerobias en donde se efectúa la producción de hidrógeno (Happe *et al.*, 2002).

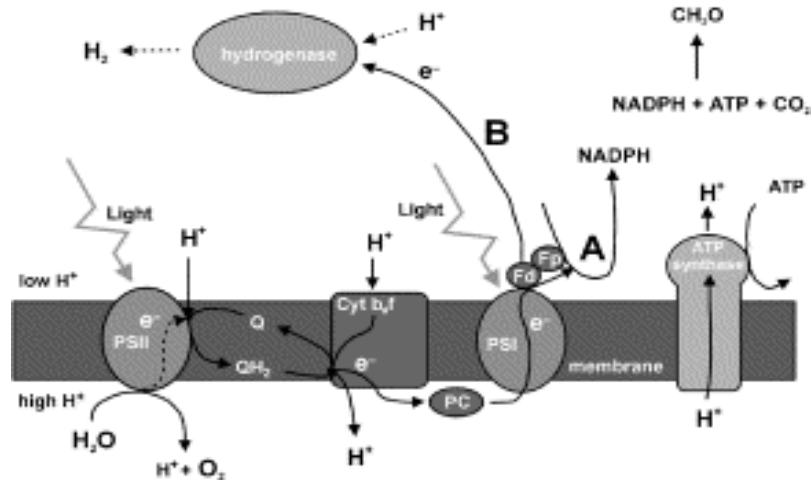


Figura 2.4. Proceso de producción de hidrógeno en algas verdes unicelulares (Akkerman *et al.*, 2002).

El proceso de privación de azufre con producción de hidrógeno se mantiene por un periodo de 60 horas aproximadamente, al parecer es un evento reversible y reproducible en los cultivos de *C. reinhardtii*, organismo en donde se han realizado los ensayos. Posteriormente las algas vuelven a condiciones normales de fotosíntesis, donde se genera el almidón, el cual se cree que sostiene la producción de hidrógeno. Después el cultivo de algas regresa de nuevo a condiciones anaerobias para continuar con dicha producción (Melis *et al.*, 2002).

Entonces, el proceso de producción de hidrógeno fotosintético emplea los electrones generados por la oxidación del agua en el fotosistema II (proceso también llamado “biofotólisis”). Con la energía luminosa estos electrones son transferidos a través de la membrana tilacoidal por la cadena transportadora de electrones hasta la ferredoxina, quien es el donador fisiológico de electrones para la hidrogenasa, que se encarga de combinar estos electrones con protones (H^+) del estroma para formar y liberar el hidrógeno molecular (H_2). Durante este proceso también se genera ATP, asegurando así las funciones en el interior de la célula (Figura 2.5).

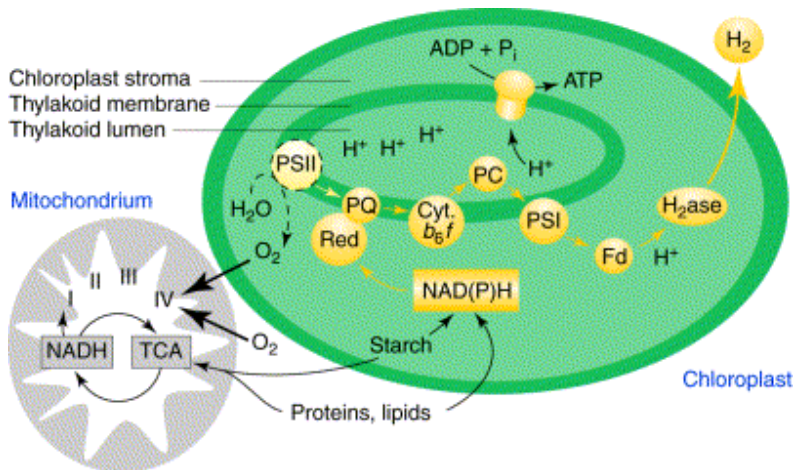


Figura 2.5. Esquema general de producción de hidrógeno en la célula del alga verde *Chlamydomonas reinhardtii* (Happe *et al.*, 2002).

Además la ausencia de CO_2 favorece la producción de H_2 mediada por la luz, debido a que los electrones normalmente usados para la fijación del bióxido de carbono son empleados en el proceso de generación de gas hidrógeno (Melis, 2002).

Bacterias fotosintéticas

La habilidad de fijar nitrógeno en *Rhodobacter sphaeroides* es debido a la presencia de una enzima llamada nitrogenasa. Además esta enzima esta asociada principal o completamente con la producción de hidrógeno, siempre y cuando no este presente el nitrógeno molecular. El nitrógeno molecular es el sustrato natural de la nitrogenasa, pero inhibe la producción de hidrógeno por esta enzima. Cuando esta presente el N_2 , la reacción de fijación del nitrógeno predomina y la producción de hidrógeno no se realiza (Cammack y Frey, 2001).

La eficiencia de operación en la nitrogenasa requiere de ATP como poder reductor y de ciertos controles que regulen su actividad. Un represor o inhibidor de la nitrogenasa es el oxígeno, el cual provoca una destrucción irreversible de la enzima.

El amonio es el segundo inhibidor, utilizado frecuentemente como fuente de nitrógeno en los medios de cultivo de bacterias púrpuras no sulfurosas. Este reprime tanto la síntesis

como la actividad de la nitrogenasa. La inhibición es reversible y la enzima recobra su actividad una vez que el amonio sea consumido o removido. La síntesis de la nitrogenasa es fuertemente estimulada por la luz, resultando en un incremento en la actividad. Se ha observado que el diseño con luz natural (es decir, ciclos alternos de luz–obscuridad), provoca una mayor estabilidad en la actividad de la enzima (Eroglu *et al.*, 1999).

La presencia de la hidrogenasa es una característica común en las bacterias fotosintéticas. Estudios *in vitro* muestran que la hidrogenasa de este tipo de bacterias es capaz tanto de producir como de consumir H_2 . Sin embargo la producción de hidrógeno es atribuida principalmente a la nitrogenasa, por lo que la actividad de la hidrogenasa es insignificante en la producción del gas. La actividad de la hidrogenasa esta en función al consumo de hidrógeno, de tal manera que ha sido aceptada generalmente como un antagonista metabólico de la nitrogenasa. Por tal motivo se ha intentado crear organismos mutantes de bacterias fotosintéticas, en los que se elimina la capacidad de sintetizar la enzima, dichos experimentos tienen como objetivo mejorar la producción de hidrógeno (Vignais *et.al.*, 1985).

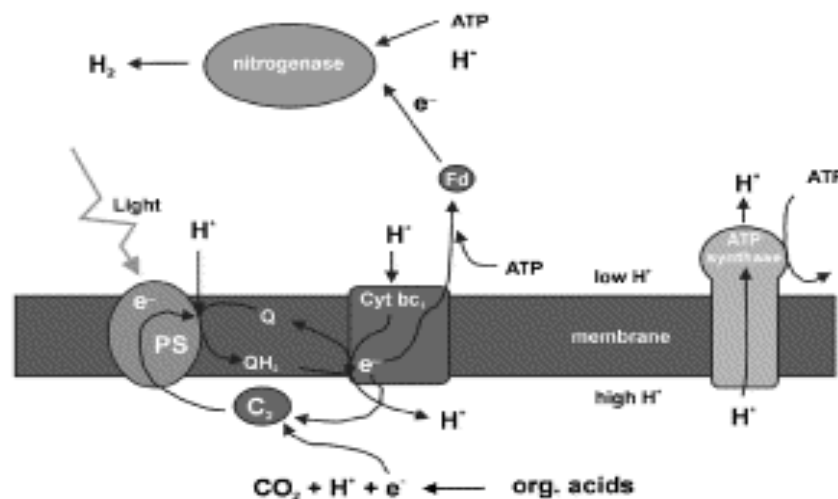


Figura 2.6. Proceso de producción de hidrógeno en *Rhodospira rubra* (Akkerman *et.al.*, 2002).

Con respecto al proceso de la producción biológica de hidrógeno mediante *R. sphaeroides* se realiza de la siguiente manera; como ya se ha mencionado, esta bacteria púrpura no-sulfurosa utiliza compuestos orgánicos, que al ser oxidados producen CO₂ y electrones, estos últimos se incorporan en la cadena transportadora de electrones del fotosistema, el cual convierte la energía luminosa en ATP.

Posteriormente el citocromo bc₁ transfiere los electrones a la ferredoxina y esta a su vez a la nitrogenasa, la cual utiliza parte de la energía del ATP para reducir los protones a hidrógeno molecular. Los protones también son suministrados en parte por la oxidación de los compuestos orgánicos y otros tantos son proporcionados por la acción de la ATP sintetasa. En este caso la hidrogenasa funciona principalmente en dirección del consumo de hidrogeno, es decir, produciendo protones (H⁺) y electrones (Figura 2.6). Por tanto, la cantidad neta de producción de hidrógeno es la cantidad producida por la nitrogenasa menos la consumida por la hidrógenasa (Miyake y Kawamura, 1987).

2.4 CLASIFICACIÓN DE LOS PROCESOS BIOLÓGICOS EN LA GENERACIÓN DEL HIDROGENO

Distintos grupos de microorganismos participan en la generación del hidrógeno. Abajo se muestra una lista con los grupos de organismos involucrados en la producción de este energético.

CLASIFICACIÓN	NOMBRE DE LOS MICROORGANISMOS		
Algas verdes	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i> <i>Scenedesmus obliquus</i>	<i>Chlamydomonas moewusii</i>	<i>Chlorella fusca</i>
Cianobacterias	<i>Anabaena azollae</i> <i>Nostoc muscorum</i>	<i>Anabaena variabilis</i> <i>Nostoc spongiaeforme</i>	<i>Anabaena cylindrica</i> <i>Westiellopsis profilica</i>
Bacterias Fotosintéticas	<i>Rhodobacter sphaeroides</i> <i>Rodopseudomonas sphaeroides</i> <i>Rhodospirillum rubnum</i> <i>Chloroflexu aurantiacus</i>	<i>Rhodobacter capsulatus</i> <i>Rodopseudomonas palustres</i> <i>Chromatium sp. Miami PSB 1071</i> <i>Thiocapsa roseopersicina</i>	<i>Rhodobacter sulidophilus</i> <i>Rodopseudomonas capsulata</i> <i>Chlorobium limicola</i> <i>Halobacterium halobium</i>
Bacterias Fermentativas	<i>Enterobacter aerogenes</i> <i>Clostridium pasteurianum</i> <i>Citrobacter intermedius</i>	<i>Enterobacter cloacae</i> <i>Desulfovibrio vulgaris</i> <i>Escherichia coli</i>	<i>Clostridium butyricum</i> <i>Magashaera elsdentii</i>

Tabla 2.1. Microorganismos usados en la producción de hidrógeno (Das y Veziroglu, 2001).

Los microorganismos involucrados en la producción de hidrógeno biológico son clasificados en dos grupos:

Microorganismos Fermentativos: Comprende bacterias anaerobias facultativas u obligadas. La producción de hidrógeno por estas bacterias se efectúa en condiciones de oscuridad y requieren de un sustrato rico en carbohidratos para tal producción (Hawkes *et. al.*, 2002).

Microorganismos Fototróficos: Se encuentran las algas verdes, capaces de utilizar la luz como fuente de energía y el bióxido de carbono como fuente de carbón y las bacterias fotosintéticas, consideradas fotoheterotróficas, ya que además de aprovechar la energía luminosa requieren de compuestos orgánicos como fuente de carbono para llevar a cabo la producción de hidrógeno (Miura *et al.*, 1995).

La clasificación de los procesos en este último grupo se explica de la siguiente manera:

- 1.- Biofotólisis del agua por medio de algas verdes.
- 2.- Fotodescomposición de compuestos orgánicos por bacterias fotosintéticas.
- 3.- Sistemas híbridos usando grupos distintos de microorganismos.

- 1.- Biofotólisis del agua por medio de algas verdes

Este método usa el proceso de fotosíntesis de las algas verdes, pero adaptado en parte a la generación de gas hidrógeno. La fotosíntesis involucra la absorción de la luz por dos fotosistemas que trabajan en serie: El fotosistema II (PSII) que rompe la molécula del agua y libera oxígeno y el fotosistema I (PSI) en donde se reduce el CO₂ en forma de almidón. Ambos fotosistemas trabajan en conjunto y dos fotones provenientes de la luz (uno por fotosistema) son usados para remover cada electrón del agua y usarlo en la reducción del CO₂ o mediante la ferredoxina (Fd), un transportador de electrones que los lleva hacia la enzima hidrogenasa para la formación de hidrógeno, como se muestra en la figura 2.7.

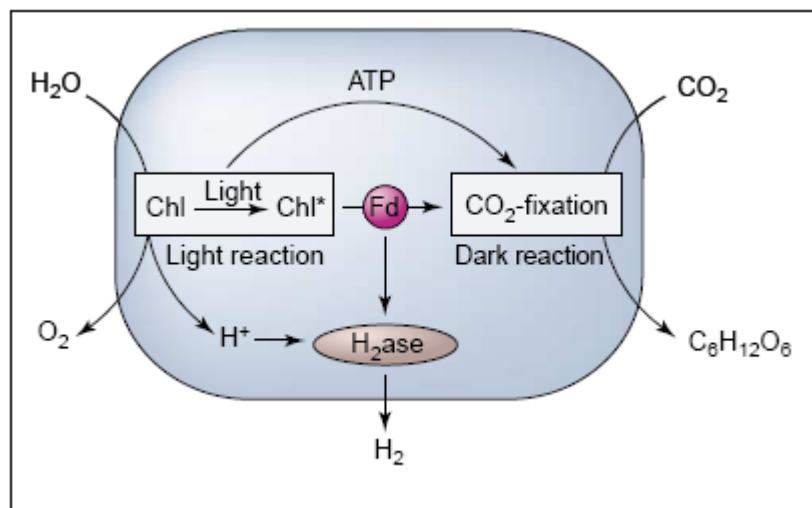
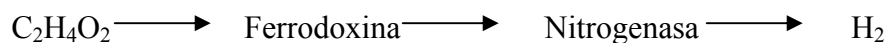


Figura 2.7. Proceso de biofotólisis. Dibujo esquemático de las reacciones de luz – oscuridad que ocurren en el cloroplasto de la microalga verde (Mertsen y Liese, 2004).

2.- Fotodescomposición de compuestos orgánicos por bacterias fotosintéticas

Las bacterias fotosintéticas utilizan la energía luminosa para romper los enlaces de carbono, liberando electrones que son transportados por la ferredoxina hasta la nitrogenasa que es la enzima encargada de formar el hidrógeno, como se muestra a continuación, usando acetato como ejemplo de sustrato:



La bacteria fotoheterótrofa es considerada como un sistema biológico óptimo para la producción de hidrógeno debido que posee las siguientes características:

- Alta producción teórica en la conversión de los sustratos.
- Utiliza un amplio espectro de luz.
- Consume una gran variedad de sustratos.

3.- Sistemas híbridos usando grupos distintos de microorganismos

Los sistemas híbridos enfocados en incrementar la producción de hidrógeno, se caracterizan por el uso de microorganismos pertenecientes a grupos taxonómicos diferentes. Hasta ahora, se han empleado sistemas híbridos comprendidos por bacterias fotosintéticas y bacterias no fotosintéticas. El proceso consiste en el uso de bacterias no fotosintéticas para degradar los carbohidratos usados como sustrato sin necesidad de luz por medio de digestión anaerobia, el producto obtenido de dicha degradación son ácidos orgánicos como el acetato o el malato que son usados como fuente de electrones en la producción de hidrógeno por las bacterias fotosintéticas (Hallen y Benemann, 2002).

3.- FLUORESCENCIA *in vivo* DE LA CLOROFILA a

La fotosíntesis es el proceso mediante el cual plantas, algas, cianobacterias y bacterias fotosintéticas convierten la energía radiante a una forma química estable. El proceso de esta transducción es complejo, involucra diversos mecanismos físicos y químicos, además de muchos componentes. El proceso inicia cuando un pigmento absorbe la energía de un fotón y entra a un estado electrónico de excitación, existen esencialmente cuatro rutas para regresar a un estado basal o estable; i) reacciones fotoquímicas en las cual el electrón excitado abandona la molécula de pigmento y entra en la cadena transportadora de electrones, como ocurre en las clorofilas específicas de las clorofilas en el centro de reacción. ii) disipación de calor, el electrón excitado regresa a su estado basal liberando calor. iii) transferencia de la energía de excitación a los pigmentos adyacentes como el complejo antena. iv) emisión de un fotón de fluorescencia, de una longitud de onda mucho menor al fotón que inicialmente fue absorbido (Butler, 1978).

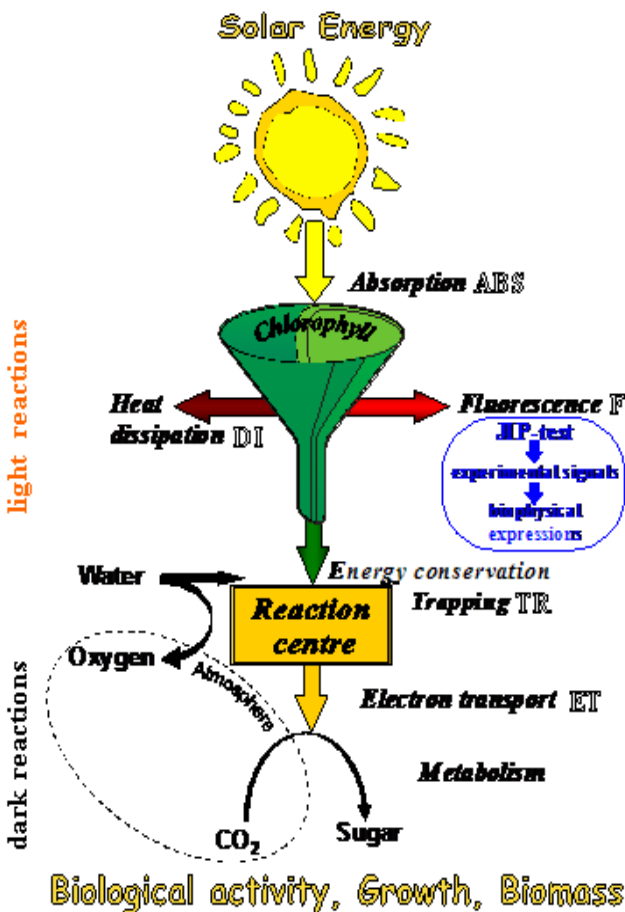


Figura3.1. Esquema simplificado de la cascada de energía del aparato fotosintético. La luz absorbida (ABS) crea la clorofila excitada. Parte de la energía de excitación es disipada, principalmente como calor (DI) y en menor medida como fluorescencia (F); otra parte es canalizada hacia el centro de reacción (TR) para ser convertida en energía redox (energía de conservación) con la simultánea producción de oxígeno a partir de la separación del agua. La energía redox crea el transporte de electrones (ET), los cuales vía fotosistema I, conducen finalmente a la fijación del CO₂ en azúcares a través del metabolismo (Strasser y Michael, 2005).

By Joerges, F., Eggensberg, I., & Strasser, R.J.
Use of fast chlorophyll a fluorescence technique to discuss drought and salinity tolerance criteria for *Citrus aurantium L.* var. *aurantium*
Archivos de Botánica (2003) 56, 79-93

Estos cuatro procesos se encuentran en constante competencia, cuando una molécula es excitada, el camino con la constante en la tasa de primer orden mas grande, es la ruta que predomina. Para los sistemas biológicos, el rendimiento global de la fluorescencia de la clorofila a es usualmente bajo, *in vivo* la fluorescencia del fotosistema II es mayor.

Las características de la emisión de fluorescencia están básicamente determinadas por los pigmentos de absorción, la energía de excitación transferida y la naturaleza y orientación de los pigmentos fluorescentes. Sin embargo, la fluorescencia también es afectada por el estado redox de los centros de reacción y de los donadores y aceptores del fotosistema II, también es sensible a distintos eventos fotosintéticos provocados por variaciones de estrés en el ambiente. Las mediciones de fluorescencia han sido utilizadas como un monitor para la caracterización y determinación de una gran variedad de eventos fotosintéticos.

La fluorescencia de la clorofila a describe transientes exhibidos por los organismos fotosintéticos bajo diferentes condiciones, que en su análisis proporcionan información acerca de la estructura, conformación y función del aparato fotosintético, en especial del PSII (Krause y Weis, 1991).

Transientes de la fluorescencia *in vivo*

Las primeras mediciones de la fluorescencia de la clorofila a se efectuaron en muestras de hojas en presencia de DCMU o con baja temperatura, estos primeros ensayos proporcionaron la información, de manera seccionada, acerca de la distribución de la energía en el aparato fotosintético. Sin embargo, en un sistema vivo todo el tiempo se emite fluorescencia, cuando la muestra es excitada, la emisión es llevada a un flujo de información energética. Hasta ese entonces, se sabía que en una curva *in vivo* de la inducción de la fluorescencia, muestra un aumento inicial llamado paso O-P, en un tiempo menor de 1 segundo, por encima de varios segundos dependiendo de la intensidad lumínica, se tenía un decremento subsecuente llamado paso P-S, ocurriendo en el mismo rango de tiempo, de segundos a minutos con distintos pasos intermedios.

La parte del paso O-P se acepta como transientes, donde refleja que los centros de reacción se encuentran cerrados (considerados como equivalentes de la reducción de la Q_A) y no hay cambios conformacionales, es decir, sin cambios en las constantes de la tasa de des-excitación de las clorofilas del complejo antena, que se asume ocurre en este corto tiempo (Dau, 1994).

En el paso de los transientes P-S refleja un estado de transición, hay cambios conformacionales inducidos por la prolongación de la iluminación y se afectan las constantes de la tasa de des-excitación, así como también ocurren cambios de la fracción de los centros de reacción que se encuentran cerrados.

Se ha reconocido que el incremento de la fluorescencia en el paso O-P no es monofásica, sino que se presentan uno o dos intermediarios entre el paso de O y P. Sin embargo, la forma detallada sobre las señales de un transiente polifásico en la fluorescencia, fue reconocida con un instrumento de alta resolución llamado fluorómetro-PEA (Plant Efficiency Analyser, construido por Hansatech Instruments Ltd. King's Lynn Norfolk.), el cual proporciona datos muy bajos en tiempo, de cada 10 μ s en los primeros 2 ms y cada 1 ms posteriormente, que fueron ubicados en una escala de tiempo logarítmica (Srivastava *et al.*, 1995).

El aumento de la fluorescencia de la clorofila a exhibe al inicio de la fase O (F_0) un paso J a los 2 ms y un paso I alrededor de los 20 a 30 ms y un máximo denominado paso P (F_p), así, la secuencia de los transientes anteriores son etiquetados como O-J-I-P. En ciertos casos se han observados más pasos y han sido etiquetados según el orden alfabético, por ejemplo, un paso K o un paso H, como se ha encontrado en corales y foraminíferos, cada paso es seguido temporalmente por un decremento en la fluorescencia.

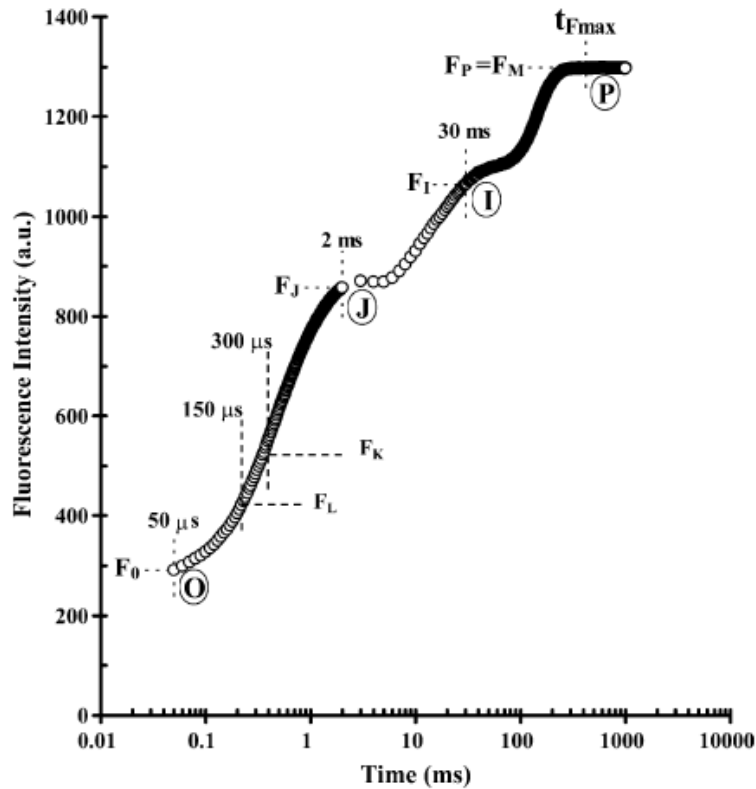


Figura 3.2. Incremento polifásico de la fluorescencia de la clorofila a (OJIP) exhibida en plantas. Los transientes se encuentran en una escala de tiempo logarítmica de $50 \mu\text{s}$ a 1 s . Los puntos señalados son los parámetros usados en el test de JIP. Las señales; intensidad de la fluorescencia F_0 a los $50 \mu\text{s}$, intensidad de la fluorescencia F_L a los $150 \mu\text{s}$, intensidad de la fluorescencia F_K a los $300 \mu\text{s}$, intensidad de las fluorescencias F_J y F_I a los 2 y 30 ms , respectivamente y la intensidad de la fluorescencia máxima $F_P = F_M$ en tiempo denotada como t_{Fmax} (Sraaser, *et al.*, 2000).

Los transientes de la clorofila a conocidos como los transientes de Kautsky consisten en un aumento completo en menos de un segundo y subsecuentemente en una lenta disminución a un estado estable. Este rápido aumento, es generalmente aceptado como la acumulación de la forma reducida del aceptor primario quinona, Q_A , es decir, es el cierre de los centros de reacción, los cuales son el resultado neto de la reducción de Q_A debido a la actividad del fotosistema II y la reoxidación de Q_A^- a causa de la actividad del fotosistema I (Lazár, 1999).

Cuando la muestra fotosintética permanece en la oscuridad por unos minutos, las quinonas A están oxidadas, por lo tanto, todos los centros de reacción están abiertos, entonces, el rendimiento de la fluorescencia al inicio de la iluminación se denota como F_0 (fluorescencia mínima).

Al iluminar los cloroplastos el rendimiento máximo F_p al final del incremento rápido de la fluorescencia de la clorofila a, depende del balance alcanzado de la oxido-reducción, esta adquiere el valor máximo posible, denotado como F_M , si la iluminación es lo suficientemente fuerte para asegurar que todos los centros de reacción se cierren (Scheiber *et al.*, 1995)

Se ha observado que los transientes (OJIP) reflejan el estado de reducción de la cadena transportadora de electrones, esquema Z en la Figura 3.3. La fase OJ es la parte fotoquímica de los transientes hasta la reducción de Q_A , esta cinética depende fuertemente de la intensidad luminosa. La fase JI es una reducción paralela del pool de plastoquinona (PQ), y la fase IP depende de la actividad del fotosistema I, que representa la reducción del pool de ferredoxina (fd) en presencia de la reductasa inactiva Ferredoxina-NADP⁺ (Joshi y Mohanty, 1995).

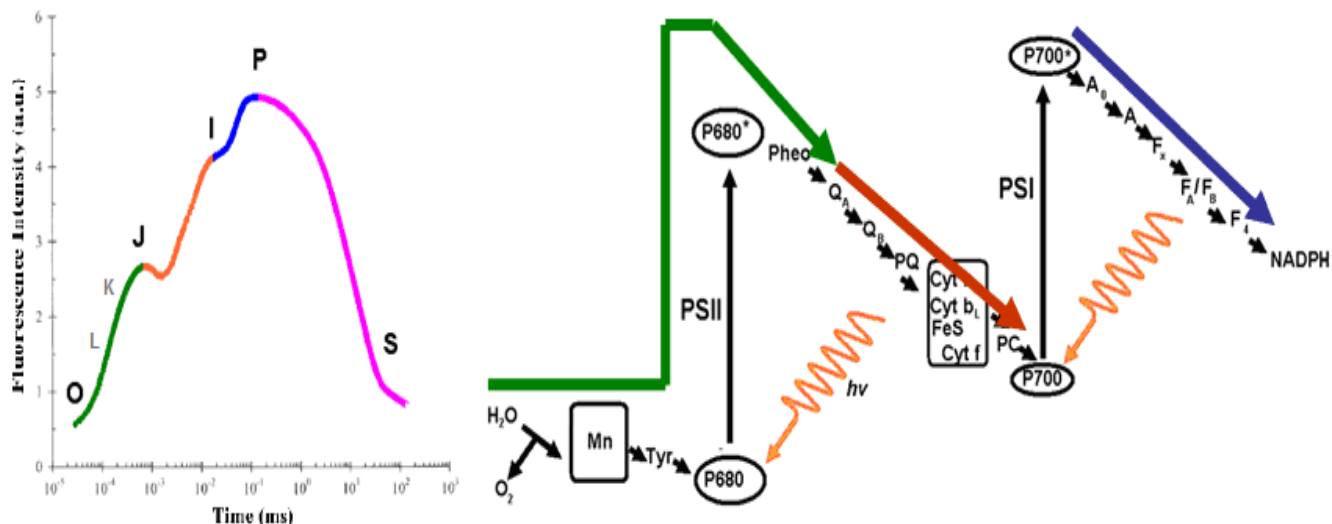


Figura 3.3. Cinética de la fluorescencia; la primer fase (O-J) corresponde a la completa reducción del aceptor primario, Q_A , la segunda fase comprende la liberación de la fluorescencia durante la fase J-I que es controlada por el lado donador del PSII (capacidad de separación del agua), la fase I-P es la liberación de la fluorescencia por el pool de plastoquinonas oxidadas (Joshi y Mohanty, 1995).

Los transientes OJIP también revelan distintas bandas encubiertas en la cinética de fluorescencia, las cuales proporcionan de mucha más información que el OJIP original. La principal información derivada de cada banda es concerniente a; la Q_A , el aceptor quinona primario que se encuentra oxidado; p_{2G} , la probabilidad total de agrupamiento dentro de la antena del PSII; OEC, el complejo productor de oxígeno; Q_B^- el aceptor de quinona secundario que se encuentra reducido (con un electrón); Q_{B2}^{2-} , el aceptor de quinona secundario que esta reducido (con dos electrones); Q_BH_2 , el aceptor de quinona secundario protonado; EC_{red} , el transportador de electrones completamente reducido.

	Single-turnover events				Multiple-turnover events			
STEPS	O		J		I		P	
	≈ 0.02		2		30		≈ 300	ms
BANDS	O	L	K	J	I	H	G	F_t
	≈ 0.02	0.15	0.3	2	5	20	100	ms
INFOS	Q_A	p_{2G}	OEC	Q_A^-	Q_B^-	Q_B^{2-}	Q_BH_2	EC_{red}

Figura 3.4. Se muestra el transiente, el tiempo y la información en que se presenta cada banda en la cinética de fluorescencia de la clorofila a (Srasser, *et al.*, 2000).

El principio de la inducción de la fluorescencia, esta basado en los siguientes parámetros biofísicos, referidos en tiempo cero; a) el flujo específico de energía (por centro de reacción, RC) por absorción (ABS/RC), la energía atrapada (TR_0/RC), disipación ($DI_0/RC = ABS/RC - TR_0/RC$) y el transporte de electrones (ET_0/RC), b) la proporción de flujo o rendimiento, nombrada como rendimiento máximo de energía de la fotoquímica primaria ($\phi_{P0} = TR_0/ABS$), la eficiencia ($\psi_0 = ET/TR_0$) con el cual, un excitón atrapado puede mover un electrón a la cadena transportadora de electrones más allá de Q_A^- y el rendimiento energético del transporte de electrones ($\phi_{E0} = ET_0/ABS = \phi_{P0} \times \psi_0$), c) el flujo de energía fenomenológico (excitado por cross-section, CS) por absorción (ABS/CS), la energía atrapada (TR_0/CS), disipación (DI_0/CS) y el transporte de electrones (ET_0/CS).

La cantidad de centros de reacción activos del PSII excitados por cross-section (RC/CS) también se deriva del test de JIP. Los cálculos del flujo fenomenológico están basados sobre el flujo de ABS/CS, el cual se determina directa (como Chl/área o Chl/peso seco o Chl/proteína) o aproximadamente por F_0 o F_M .

Estudios han comprobado que la forma OJIP de los transientes cambia drásticamente después de un tratamiento de calor, especialmente si la producción de oxígeno es inhibida, de esta forma, los pasos J e I pueden o no desaparecer, y se observa el paso K en un pico de 300 a 400 μs . Después del paso K la intensidad de la fluorescencia decrece, al parecer este resultado proviene solamente de la posible separación de cargas cuando el complejo productor de oxígeno es completamente destruido, debido a que la tirosina (Tyr_z) es capaz de proporcionar sólo un electrón (Guissé *et al.*, 1995).

Se ha sugerido que el paso K esta relacionado con la inactivación del complejo productor de oxígeno, conduciendo a un desequilibrio entre el flujo de electrones dejados por el lado aceptor del centro de reacción y el flujo de electrones que provienen del lado donador, esto ha sido asociado en especies con alta producción de fluorescencia (se especula que puede ser la feofitina, $Pheo^-$) actuando como precursor de la quinona A (Q_A).

En muestras de algas verdes *Haematococcus lacustris* sin tratamiento de calor, en donde fueron extraídos los complejos productores de oxígeno y previo dos eventos de destellos al estado S_3 antes de iniciar con la iluminación, se presenta un aumento de la fluorescencia,

dando como resultado la aparición del paso K. Se sabe que el estado S_3 es un menor donador de electrones que el estado S_1 , el cual es predominante en muestras adaptadas en oscuridad (el estado S_3 y S_4 es 15 veces más lento que el estado S_1 y S_2).

De acuerdo con los resultados del experimento, las simulaciones de los transientes O-K-J-I-P, muestra que el flujo de electrones del agua a Yz es mucho menor que de Yz al $P680^+$, limitando el paso del flujo que se encuentra en el complejo productor de oxígeno. Con la escisión del complejo productor de oxígeno, la donación de electrones se ve facilitada, sin embargo, existe una limitación debida a la disponibilidad altamente reducida de electrones (Srivastava *et al.*, 1997).

Parece que la activación e inactivación del complejo productor de oxígeno es un mecanismo común de regulación *in vivo* en determinadas condiciones, esto se deduce por la manera en como el manganeso se une a este complejo. La información del paso K en el lado donador y el periodo de 4 oscilaciones S en el complejo productor de oxígeno, son señales de los transientes de fluorescencia de la clorofila a y son utilizados para posteriores investigaciones del PSII empleando la prueba de JIP (Strasser y Strasser, 1998).

3. ANTECEDENTES

Los trabajos abajo mostrados han sido revisados, presentados en este apartado para que el lector se familiarice con la importancia y el desarrollo tecnológico alrededor del biohidrógeno. Esta sección se encuentra dividida en tres partes, la primera se refiere a trabajos con respecto a investigaciones en las microalgas verdes, la segunda comprende ensayos que corresponden a trabajos con la bacteria fotosintética *Rhodobacter sphaeroides* y para finalizar, trabajos revisados sobre el uso de la fluorescencia *in vivo* de la clorofila a para el estudio del proceso fotosintético.

Weaver y colaboradores (1980) al realizar una compilación de trabajos sobre la fotoproducción biológica de hidrógeno, encuentran que las bacterias fotosintéticas son capaces de utilizar compuestos orgánicos o sulfurosos como dadores de electrones para dicha producción. También realizaron un estudio donde se experimento con el alga verde del genero *Scenedesmus*, la cual fue incubada en condiciones anaerobias y presencia de hidrogeno por varias horas en oscuridad, se observó que las células se adaptaban a estas condiciones y posteriormente producían hidrógeno.

Ghirardi y Liping (2000) examinaron los procesos biológicos por los cuales el alga verde *Chlamydomonas reinhardtii* efectua la producción de hidrógeno. Lo cual implica la separación temporal y espacial del hidrógeno y el oxigeno provenientes del agua. En una primera etapa las algas son manejadas en condiciones normales en donde producen carbohidratos como el almidón, posteriormente son llevadas a sistemas de fotobioreactores donde realizan la generación del gas hidrógeno mediada por la luz en condiciones anaeróbicas y sostenida, según los autores por los carbohidratos producidos y acumulados por el alga verde. Los investigadores sugieren un segundo proceso para producción de hidrógeno, en el cual el oxigeno y el hidrógeno se podrían generar simultáneamente, en este caso la hidrogenasa, enzima que se encarga de formar el hidrógeno, requiere ser modificada molecularmente para que fuera tolerante al oxigeno y el que se va produciendo se utiliza de modo inmediato para la generación o producción constante de hidrógeno.

Laurinavichene y colaboradores (2002) modificaron el proceso tradicional de privación de azufre para el alga verde *Chlamydomonas reinhardtii*, en este proceso el cultivo de algas pasa por centrifugación, luego por un proceso de enjuague para eliminar al azufre contenido en el medio de cultivo, posteriormente el cultivo se trasladaba a un medio sin azufre. En este trabajo se prueban dos procedimientos de privación de azufre en el alga verde. El primero consta de una disolución del cultivo utilizado para que se desarrollen las algas, este paso se realiza hasta eliminar por completo el azufre. Un segundo método que fue más eficiente que el anterior, es un medio libre de azufre en donde se usa $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ en vez de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, de esta manera se logra sustituir de la molécula el azufre por el cloro, posteriormente las algas fueron depositadas en este cultivo y se observó que ellas podían producir el hidrógeno. Con este último proceso se efectuó un desarrollo en la producción de hidrógeno de manera económica y en un menor tiempo.

Dante y colaboradores (2004) trabajaron con la microalga verde *Chlamydomonas reinhardtii* bajo condiciones de estrés, se realizó una serie de cuatro experimentos que consistían en modificar el tiempo de exposición a los factores de iluminación y oscuridad en presencia o ausencia de aire. Los resultados fueron que en el experimento tres en donde el alga fue sometida a condiciones de oscuridad por 48hrs sin oxígeno produjo 1.3 ml de hidrógeno por litro de medio de cultivo de algas, cantidad que superó a los demás experimentos. Los autores de este trabajo hacen notar que el resultado obtenido bajo dichas condiciones podría deberse a la participación de otros factores que se desconocen del metabolismo en la oscuridad del alga o también puede deberse por un incremento de almidón contenido en las células durante las primeras 24 hrs después de la privación de azufre, agregando así el autor que es posible que este polisacárido participe en regular la producción de hidrógeno.

Dante (2005) investigó la posibilidad de aplicar de manera directa la energía del hidrógeno producido por el alga verde *Chlamydomonas reinhardtii* mediante una celda de combustible. Esta celda de combustible fue utilizada en primer lugar como detector del gas hidrógeno que producía el alga, posteriormente el gas producido sería transformado en electricidad a través de la celda de combustible. En los resultados se obtuvo que 100 m³ de medio de cultivo proporcionaron en promedio 240 W durante un periodo de 100 hrs.

Basado en sus resultados el autor argumenta sobre mejorar la eficiencia de conversión de la energía solar a energía química de hidrógeno presente en el alga verde, de ser así se podrían obtener mejores resultados en dicha producción para ser aprovechada como electricidad.

Melis y Melnicki (2006) realizaron un ensayo en el cual desarrollaron un sistema de producción de hidrógeno de manera integral, basados en la intensidad lumínica, donde el alga unicelular *Chlamydomonas reinhardtii* utiliza la porción visible del espectro solar, acoplada en un co-cultivo, con la bacteria púrpura *Rhodospirillum rubrum*, que emplea la porción cercana al infrarrojo del espectro solar. Los autores proponen que los productos metabólicos de ambas especies y la biomasa de estas, pueden utilizar para la posterior generación de hidrógeno por la bacteria fermentativa *Clostridium pasteurianu*. Los resultados fueron que en 30 $\mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$ *R. rubrum* acumula biomasa más rápido que la microalga. En 90 $\mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$ *R. rubrum* de nuevo acumula biomasa de manera más rápida en comparación con *C. reinhardtii*, sin embargo la bacteria fotosintética se torna de un color amarillento, debido a que la bacteria adquiere cromatóforos asociados con el aparato fotosintético. A 150 $\mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ahora *C. reinhardtii* acumula biomasa más rápido que la bacteria fotosintética. De esta manera, se concluye que es posible obtener un co-cultivo de ambas especies en un mismo medio, considerando que solo se pretende obtener biomasa donde se produzcan ácidos orgánicos que sean empleados en la fermentación con *C. pasteurianu* y sean utilizados en la generación de hidrógeno.

Esper y colaboradores (2006) publican un ensayo, donde plantean dos estrategias a través de las cuales es posible la generación biofotolítica de hidrógeno. La primera, consiste en una ingeniería natural, la reproducción en si de los sistemas biológicos. Las algas verdes pueden ser consideradas como un importante modelo donde se pueden acoplar los procesos fotosintéticos y generadores de hidrógeno. Sin embargo, esta integración presenta una alta ineficiencia, debida a que la separación del agua se presenta en condiciones anaeróbicas, que no son condiciones naturales para las algas unicelulares. La segunda estrategia, mecanismos semi-artificiales, su objetivo esta dirigido en la inmovilización de los componentes en el proceso fotosintético, llevando a cabo modificaciones en el PSII, donde se realice sin complicaciones la separación del oxígeno y el hidrógeno. Estos mecanismos ayudarían a diseñar y optimizar los componentes en el flujo de electrones entre el PSI y el PSII.

Kosourov y colaboradores (2007) realizan una comparación en la producción de hidrógeno mediante la privación de sulfuros en *Chlamydomonas reinhardtii*. Se demuestra que la ausencia de compuestos azufrados en *C. reinhardtii* es capaz de prolongar la fotoproducción de hidrógeno bajo condiciones de crecimiento fotoautótrofo, fotoheterótrofo y fotomixotrofo. En este último caso la presencia de acetato y bióxido de carbono son indispensables para una rápida inactivación del fotosistema II e incrementar los niveles de la fotoproducción del hidrógeno. Para el crecimiento fotoheterótrofo, el bióxido de carbono es importante para la acumulación de almidón, el acetato sirve de sustrato directo para el proceso de respiración durante la fase aerobia en condiciones de privación del azufre. Finalmente, en el crecimiento autótrofo, la eficiencia en la producción de H₂ puede ser incrementada por la alta acumulación de almidón durante la fase aerobia y utilizado durante la fase de consumo de oxígeno y producción de hidrógeno.

Ust'ak y colaboradores en 2007, compararon dos distintos métodos de producción de hidrógeno: fermentativo y fotosintético ambos basados en la modalidad en tandem. Se probaron cuatro medios de cultivo para la producción de biohidrógeno fermentativo por medio de *Clostridium sp.* La eficiencia de transformación está en un rango de 1.65 mol H₂/mol de glucosa en un medio de pectina. Los ensayos fotosintéticos con *Scenedesmus obliquus* presentaron una eficiencia de 1.5 mol H₂/mol de glucosa en un medio específico para algas verde. Sin embargo, el proceso fermentativo además produce CO₂ en cantidades bastas como 1.5-2 H₂/ 1 CO₂. Reiterando así, que los sistemas fotosintéticos en la producción de hidrógeno son más considerados con el ambiente.

Das Debabrata y Veziroglu en 2008 revisaron los avances existentes en el proceso de producción biológica de hidrógeno. Estos tipos de procesos ofrecen técnicas a través de las cuales se puede utilizar biomasa para la generación de un combustible limpio como es el hidrógeno. Los estudios recientes están enfocados en la comprensión de los procesos metabólicos y modificación genética de los microorganismos participantes, así como en el diseño de los sistemas de biorreactores y el incremento en la tasa de producción de hidrógeno. La producción máxima de H₂ se encuentra en 7.1 moles de H₂/moles de glucosa. Sin embargo, esta cantidad aún es insuficiente para ser comercializada. La posible solución puede lograrse en fomentar los estudios a pequeña escala que posteriormente den paso a la

creación y desarrollo de plantas pilotos, con el fin de que a corto plazo esta sea una opción competitiva con respecto a los combustibles tradicionales.

Enseguida se presentan los trabajos que abordan estudios de la bacteria púrpura no sulfurosa *Rhodobacter sphaeroides*.

Miyake y colaboradores (1987) realizaron un trabajo en el cual se utilizó iluminación artificial en ciclos de 12 horas de iluminación – oscuridad, que simulaba la radiación de la luz solar, estos métodos fueron probados en la bacteria fotosintética *Rhodobacter sphaeroides* RV para llevar a cabo la producción de hidrógeno. Como control se contaba con un fotobioreactor para exterior que se mantuvo trabajando durante un periodo de tres días en una ciudad de Japón y en el cual se observó una producción de hidrógeno de 14 a 28 l/m² por día, así también los investigadores notaron que este sistema depende directamente de la intensidad de la luz. En los fotobioreactores diseñados para laboratorio se demostró la posibilidad de producir hidrógeno mediante la simulación de la luz natural, pues se obtuvo 3.3 l/m² por día. El estudio hace referencia sobre la importancia en las investigaciones que consideren la luz solar en relación a la bioproducción de hidrógeno para llegar a establecer modelos de fotobioreactores aplicados en exteriores que incrementen su eficiencia.

Nakada y colaboradores (1999) realizaron una investigación donde utilizaron un fotobioreactor tipo panel plano, en el cual emplearon a *Rhodobacter sphaeroides* en la producción de hidrógeno, el gas obtenido se utilizó posteriormente en una celda de combustible para generar electricidad. El volumen del medio de cultivo en el fotobioreactor fue de 11 m³. El total de producción de hidrógeno fue de 140 l/m² bajo iluminación a 107 W/m² durante un periodo de 100 horas y se obtuvo una salida de electricidad de 80 W. La eficiencia de conversión de luz a electricidad fue de 1.9%. En el trabajo se menciona que al desarrollar estos sistemas biológicos que conviertan el H₂ a electricidad, se logrará producir una energía limpia y amable con el ambiente.

Kondo y Arakawa (2002) realizaron una investigación donde utilizaron un fotobioreactor tubular de doble capa, el cual está compuesto por dos cámaras separadas entre sí dentro del mismo sistema, en este reactor se trabajó con dos tipos distintos de bacterias fotosintéticas,

cada especie se colocó en una cámara, estas fueron: *Rhodobacter sphaeroides* RV y su mutante MTP4. La bacteria mutante fue desarrollada para demostrar el incremento en la producción de hidrógeno. Ambos tipos de bacterias tienen características diferentes como la eficacia en la conversión de energía y el índice de producción de hidrógeno. Los resultados fueron que MTP4 produjo hidrógeno con mayor eficacia bajo condiciones de alta luminosidad, mientras que *Rhodobacter sphaeroides* RV lo hizo en condiciones de baja luminosidad. La modificación genética de los organismos productores de hidrógeno es una vía mediante la cual se pretende mejorar el proceso de generación de H₂.

En el estudio realizado por Koku H. y su grupo de trabajo (2002) sobre el metabolismo de *Rhodobacter sphaeroides*, observaron que esta bacteria púrpura sin azufre es capaz de llevar a cabo varias rutas metabólicas alternativas como es la respiración aeróbica, la fermentación y el fotoautotrofismo. La versatilidad en el consumo de sustratos es una característica distintiva de *R. sphaeroides*. Sin embargo no todos los sustratos pueden ser útiles a la hora de emplearlos en la producción de hidrógeno. La investigación sugiere que los sustratos convenientes para tal fin solo son algunos como el lactato, malato entre otros ácidos orgánicos y la glucosa, se cree que derivados de esta como la fructosa, almidón y celulosa también podrían ser utilizados como sustrato en la generación de este gas como energético.

En 2006 Redwood D. y colaboradores realizaron un ensayo para determinar si es posible la producción de hidrógeno en dos etapas, la primera comprende la fermentación de la glucosa por medio de *Escherichia coli* HD701, la segunda corresponde a la fotofermentación de los productos de residuo de la primera etapa por *Rhodobacter sphaeroides* O.U. 001. La fermentación por *E. coli* produce 0.12 l/l/h (litros H₂/litros cultivo/hora), sin embargo, no ocurrió la generación de H₂ con fotofermentación de *R. sphaeroides*, debido a la alta concentración de nitrógeno (inhibiendo a la nitrogenasa) contenida en los compuestos orgánicos finales de la fermentación.

Eroglu I. y colaboradores en 2008 investigaron que tipos de sustratos orgánicos son los más convenientes para la producción de hidrógeno y la acumulación de poli-β-hidroxibutarato (PHB) en *Rhodobacter sphaeroides* O.U.001, por medio de bioreactores planos iluminados con luz natural. En el estudio se determinó que el malato como fuente de carbón presenta la

mayor producción de H_2 , con 0.1 l/1/h, el acetato resulto ser el sustrato de menor eficiencia con 0.008 l/1/h y una mayor acumulación de PHB. Los resultados obtenidos en este trabajo son mayores con respecto a la elevada acumulación de PHB y carotenoides en condiciones externas al compararlos con ensayos en laboratorio, según los autores, los microorganismos tienden a protegerse a si mismos de las altas intensidades lumínicas formando estos compuestos energéticos en periodos de oscuridad.

A continuación se muestran algunos trabajos revisados a cerca de la aplicación de la fluorescencia *in vivo* de la clorofila a para el estudio del sistema fotosintético en plantas y microalgas verdes.

Strasser en 1997 menciona que las mediciones de fluorescencia *in vivo* en las plantas da como resultado una curva típica de O-J-I-P. Sin embargo, bajo ciertas condiciones de estrés en tratamientos con calor, se puede observar un aumento de la fluorescencia alrededor de los 300 μs , es decir, el transiente K, relacionado con la inactivación del complejo productor de oxígeno. Bajo esta hipótesis, Strasser estudió cultivos de la microalga verde *Scenedesmus obliquus* en condiciones de 44 °C durante una hora, el resultado muestra un decremento de F_M y un incremento en F_0 , así como la completa supresión de oxígeno. El paso K se presenta claramente y consiste en un rápido aumento a los 300 μs , seguido por un decremento al finalizar F_0 . Se concluye entonces, que la presencia del paso K depende de la duración y la temperatura del tratamiento para obtener un incremento significativo en la fluorescencia inicial por el efecto del calor en *S. obliquus* y el efecto obtenido es estrechamente parecido con el de las plantas superiores.

En 2008 Dewez y colaboradores utilizan los parámetros fotosintéticos de la fluorescencia *in vivo* para estudiar la densidad celular de *Scenedesmus obliquus*, los cultivos de la alga verde fueron expuestos durante 24 horas a distintas concentraciones de isoproturon (7, 15, 30 y 500 mg/l^{-1}).

Con 30 mg/l^{-1} de isoproturon, el rendimiento de la fluorescencia en el transiente J incrementa, mostrando una inhibición en el transporte de electrones del lado aceptor del PSII. Sin embargo, cuando se expone a *S. obliquus* a concentraciones mayores de 30 mg/l^{-1} se encuentra un decremento en el rendimiento de la fluorescencia en el paso P. Esto podría indicar que el herbicida también induce la inhibición en el sistema de escisión del agua.

Esta idea se apoya además en la información que muestra un incremento a los 300 μ s en la fluorescencia, donde se observa el paso K. Esta interpretación esta de acuerdo con los resultados de los autores, mostrando que el isotruturon incrementa el transiente J (V_j) y decrece el transiente P (F_{P0}).

Pospísil y Dau en 2000 estudiaron la producción de oxígeno fotosintético por medio de los transientes de la fluorescencia de la clorofila en membranas del PSII. El modelo fue la espinaca *Spinacia oleracea*, de cuales se obtuvieron las membranas del PSII (partículas BBY). Se realizaron dos tratamientos experimentales (basados en la inhibición parcial de las membranas del PSII); el primero, donde se redujeron drásticamente las proteínas 17, 23 kDa, el segundo, un tratamiento de calor a 47 °C y la disminución del calcio, manganeso y cloro, además de las proteínas 17, 23 y 33 kDa. El resultado obtenido demuestra que se obtiene un transiente bifásico O-J y J-P, como en las curvas típicas de cianobacterias y algas verdes (ausentes del paso I). Donde la fase O-J permanece sin cambios para ambos tratamientos y la fase J-P, decrece más para el tratamiento con calor y la reducción de los cofactores inorgánicos. Durante la fase O-J las Q_A de todos los PSII llegan a estar (individualmente) reducidas. La fase subsecuente de J-P refleja, probablemente, la reducción del pool de PQ debido al transporte de electrones -inducidos por la luz- del agua hacia la plastoquinona. De acuerdo con este razonamiento, el incremento en el rendimiento de J-P esta estrechamente relacionado (directamente proporcional) al flujo de electrones del agua hacia la PQ y con la producción de oxígeno mediada por luz.

Tóth y colaboradores en 2007 investigaron el transporte de electrones en hojas de cebada, en las cuales la producción de oxígeno fue completamente inhibida por medio de pulsos de calor (48 °C, 40s). Bajo estas circunstancias apareció el paso K a los 400 μ s en los transientes OJIP de la fluorescencia de la clorofila, reflejando la parcial reducción de Q_A , que es debida a una separación estable de cargas resultado de una donación de un electrón por la tirosina Z.

Seguido del paso K, se presenta un incremento adicional en la fluorescencia ocurrido en un rango de tiempo entre 0.2 y 2 s (indicando la acumulación de Q_A^-). Se realiza un ensayo simultaneo de fluorescencia de la clorofila a con una transmisión de 820 nm (para el estudio del PSI), los resultados demuestran que esta acumulación de Q_A^- se debe a que existen naturalmente fuentes alternas de electrones, que los ceden hacia el lado donador del

fotosistema II. Los autores concluyen que las fuentes donantes alternas pueden tener un papel protector también para el PSI en condiciones de estrés producidas por calor.

En 2007 Tóth y colaboradores usaron la anaerobiosis como una herramienta para manipular el estado redox del pool de plastoquinona a través de la cinética de fluorescencia de la clorofila *a* en hojas de chícharo (*Pisum sativum*). En los resultados se muestra que F_J (intensidad de la fluorescencia a 3 ms) esta linealmente relacionada con el área que se encuentra por encima de la fase OJ (los primeros 3 ms), representando la reducción del lado aceptor del PSII, así también F_J esta relacionada con el área sobre la fase JI (3-30 ms), que es equivalente a la reducción del pool de PQ. Esto significa que F_J depende de la disponibilidad de moléculas oxidadas de plastoquinonas unidas al sitio de Q_B . La relación lineal entre F_J y las dos áreas indicadas previamente, indican que F_J no es sensible a la energía de transferencia entre el PSII y el complejo antena (conectividad).

Oukarroum y su equipo de trabajo evaluaron los efectos de la sequía y el riego en 10 variedades de cebada (*Hordeum vulgare* L.) originarias de Marruecos. Después de 2 semanas de crecimiento, el estrés por sequía fue iniciado por 2 semanas ausentes de agua y seguidas por una semana de riego. Los transientes polifásicos de la fluorescencia de la clorofila *a* fueron usados para evaluar el estado del PSII, los criterios fueron al final de la primera semana (sequía moderada), al final de la segunda semana (sequía severa) y al final de la fase de riego-recuperación. Los parámetros de la fluorescencia inicial incrementaron entre 50 y 300 μ s (exactamente a los 150 μ s), encontrándose una banda L (sequía severa), que proporciona información sobre una disminución de la conectividad energética entre las unidades del PSII y las unidades del complejo antena. También se presentaron cambios en el incremento durante los primeros 2 ms (Banda K), lo que coincide con una limitación sobre el lado donador del PSII.

Otro parámetro analizado fue el contenido relativo de agua, este disminuyó durante el tratamiento en sequía variando entre 61 y 78.2 % al finalizar este periodo. Durante el periodo de recuperación subsecuente se encontró un incremento 65.1 y 94.1%. Los cambios en los transientes OJIP y respectivamente con las bandas K y L, muestran tener un valor predictivo con respecto a la vitalidad de las hojas y la tolerancia de las variedades al estrés por sequía

En 2008 Jiang y colaboradores evaluaron el efecto del aluminio sobre plántulas de *Citrus grandis*, donde fueron regadas diariamente durante un periodo de 5 meses con una solución de nutrientes en concentraciones de 0. 0.2, 0.6 o 1.6 mM de aluminio usando $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$. El crecimiento de los brotes fue mas sensible a la toxicidad del aluminio que la raíz, así como el intercambio gaseoso, la concentración de clorofila y los transientes de la fluorescencia de la clorofila a. El análisis de la inducción de la fluorescencia sobre las hojas sometidas a estrés por aluminio mostraron un gran aumento en la fase O y una gran depresión en el paso P, acompañada por dos bandas a los 300 μs (banda K) y alrededor de los 150 μs (banda L). La fase IP y el índice fotosintético se encontraron disminuidos, sin embargo hubo un incremento en el paso I, J y en la energía disipada. En base a estos resultados, los autores proponen que la capacidad del transporte de electrones se vio deteriorada por la falta de reducir equivalentes, estos fueron los principales factores en el decremento en la asimilación de CO_2 en plantas tratadas con aluminio. La fotoinhibición inducida por aluminio ocurre en ambos lados del PSII (lado aceptor y donador) y esta asociada con la inhibición del crecimiento. Además hay una disminución de la absorción de la luz debida a la reducida concentración de clorofila inducida por la energía de disipación enfocada en proteger las hojas del daño foto-oxidativo en condiciones altas de luz.

4. OBJETIVO GENERAL

Análisis en la eficiencia del proceso fotosintético en la generación de hidrógeno por *Scenedesmus acutus* y *Rhodobacter sphaeroides*.

OBJETIVOS PARTICULARES

1. Obtención de las cepas; *Scenedesmus acutus* y *Rhodobacter sphaeroides* (WS8-N), microalga verde y bacteria fotosintética respectivamente.
2. Obtención de la curva de crecimiento patrón para *Scenedesmus acutus* en Medio Basal Bold y *Rhodobacter shaeroides* en Medio Sistrom's.
3. Modificación del Medio del Medio Basal Bold y Medio Sistrom's para la microalga verde y la bacteria fotosintética, respectivamente.
4. Obtención de la curva de crecimiento para *Scenedesmus acutus* en los distintos medios de cultivos selectivos y *Rhodobacter shaeroides* en Medio Sistrom's modificado.
5. Obtención de la tasa de crecimiento y generacional de *Scenedesmus acutus* y *Rhodobacter sphaeroides*, establecidos en medios basales de cultivo y medios modificados.
6. Diseño de una metodología que permita el estudio del los fotosistema II y I de *Scenedesmus acutus* en la generación de hidrógeno.
7. Determinación de la eficiencia fotosintética y respiratoria, a través del método de desprendimiento de oxígeno inducido por luz para *Scenedesmus acutus*.
8. Análisis del estado del aparato fotosintético de *Scenedesmus acutus* a través de la prueba de JIP, a través de la fluorescencia *in vivo* de la clorofila a y medición de otros parámetros fotosintéticos.

HIPÓTESIS

Las microalgas verdes como *Scenedesmus acutus* y las bacterias fotosintéticas tal como *Rhodobacter sphaeroides* obtienen su energía metabólica a partir de la cadena transportadora de electrones, este flujo de electrones puede ser aprovechado en la generación de hidrógeno, con el estudio de los fotosistemas (enfocado primordialmente en al PSII de las microalgas) a través de la fluorescencia *in vivo*, la velocidad de crecimiento y tasa generacional, la eficiencia fotosintética en el consumo y desprendimiento de oxígeno, se podrá determinar la eficiencia en la producción de hidrógeno.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

El presente trabajo está enfocado en la utilización de la microalga verde *Scenedesmus acutus* y *Rhodobacter sphaeroides*, ambos, microorganismos fotosintéticos capaces de generar hidrógeno. De esta manera, la metodología empleada está contemplada en dos secciones, cada una abarca estudios, ensayos y análisis con respecto a los organismos arriba mencionados. A continuación se muestra un diagrama de flujo, donde se resumen las actividades realizadas.

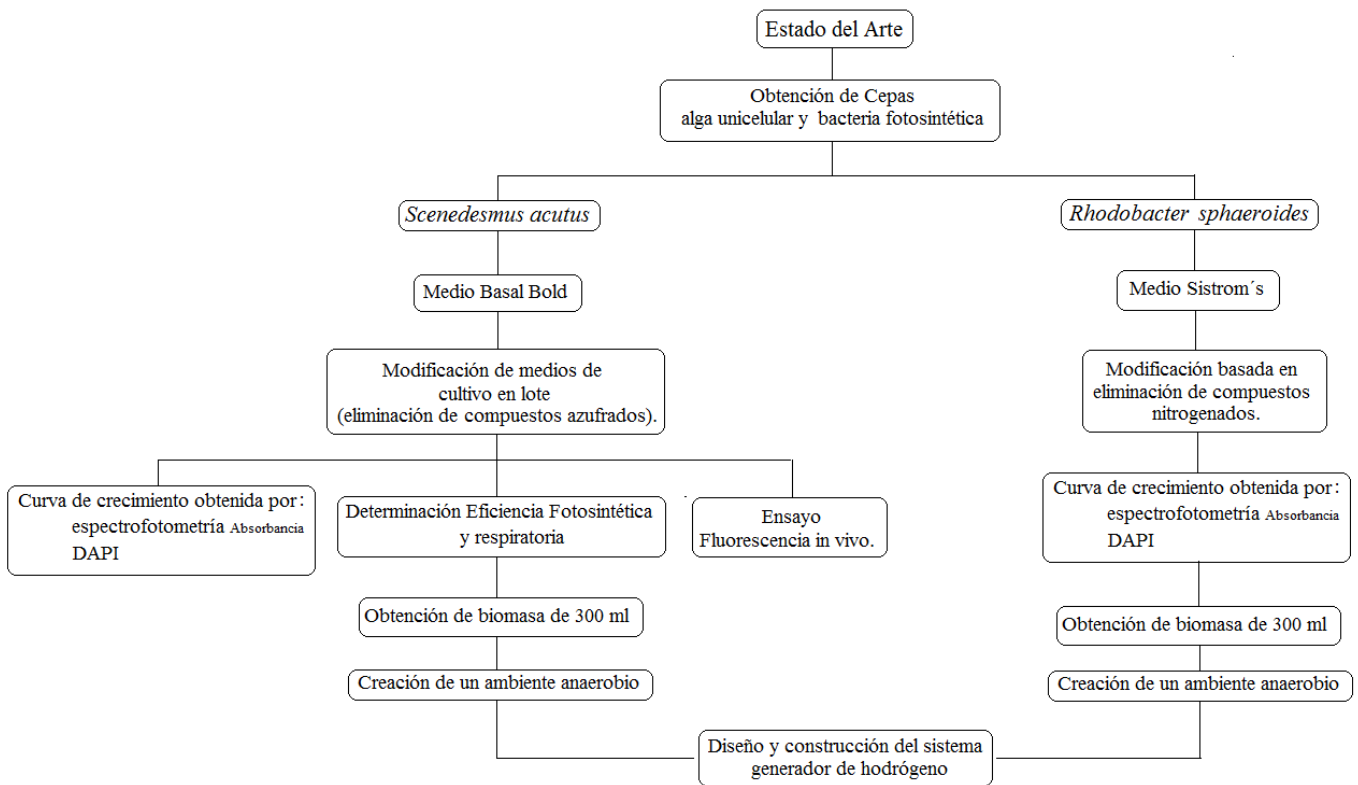


Figura 5.1. Diagrama de flujo referente al trabajo realizado en la generación biológica de hidrógeno.

5.1. ESTADO DEL ARTE

Consistió en la revisión bibliográfica de libros, revistas, artículos de congresos y artículos en relación con: El hidrógeno, su producción y utilización, la biología de las microalgas verdes y bacterias fotosintéticas y como estas son capaces de producir hidrógeno.

Se analizaron los trabajos con respecto a los procesos metabólicos que permiten la producción de hidrógeno tanto de microalgas verdes como de bacterias fotosintéticas, con base en ella se pudo diseñar un sistema de generación biológica de hidrógeno que utiliza la energía lumínica mediante el uso de ambos microorganismos fotosintéticos.

Se revisaron los estudios sobre la bacteria púrpura sin azufre: *Rhodobacter sphaeroides*, que proporcionaron datos sobre los sustratos que la bacteria fotosintética puede utilizar en la generación de gas hidrógeno.

5.2. OBTENCIÓN DE CEPAS

Obtención de cultivo axénico de la cepa: *Scenedesmus acutus*

La muestra de microalgas *Scenedesmus acutus* que fue proporcionada por el laboratorio de Zoología acuática de la Unidad de Morfosisiología de la FES Iztacala, esta se encontraba contaminada por la microalga del género *Chlorella*, y por bacterias de género desconocido.

Para la obtención de un cultivo axénico de *S. acutus*, primeramente se partió del conocimiento sobre la proporción del género *Chlorella* (forma circular) con respecto a *S. acutus* (forma ovoide) en la muestra dada. Esto se realizó a partir de una serie 4 de diluciones decimales de 10^{-1} , mezclando 1 ml de la muestra con 9 ml de Medio Basal Bold.

Así, se obtuvo una dilución de 10^{-4} , en donde la serie 3, la proporción de *Chlorella* con respecto a *S. acutus* era de 2 por 15 células en el campo visual a 40X del microscopio óptico. La serie 4 de dilución presentaba con dificultad y tras barrer el objetivo sobre la muestra en el portaobjetos, de 2 a 3 células de *S. acutus* por campo visual a 40X.

Posteriormente se decidió aislar las células de *S. acutus* de la serie 3 de dilución, a partir del método de siembra por extensión en capa. En este método se utilizó 0.1 ml de inóculo de la serie 3, que fue vertido sobre Medio Basal Bold sólido en una caja de Petri, posteriormente este inóculo fue extendido con un asa de siembra sobre la superficie de la capa sólida de Medio Basal Bold. La placa se incubó una vez que aparecieron las colonias características de un color verde intenso (de 13 a 15 días).

Una vez formadas las colonias de microalgas, también se pudo observar la presencia de colonias bacterianas de color rosa claro a blancas (su identificación no era necesaria para efectos del presente proyecto), por lo que en ensayo previos se agregó 5 ml de Penprocilina (Bencilpenicilina procaínica bencilpenicilina sódica) de 800,000 unidades a 250 ml de Medio Basal Bold. Con lo cual se logró tener placas libres de colonias bacterianas.

Después, se tomó parte de una colonia con un asa siembra y fue analizada al microscopio óptico a 40X, la células en su totalidad eran de forma ovoide, lo que nos indicaba que se trataba de *S. acutus*. Así, la colonia de donde se había tomado esta muestra fue sembrada en Medio Basal Bold líquido. Posteriormente se confirmó que se trataba de un cultivo de axénico de *S. acutus*.

Obtención de la cepa: *Rhodobacter sphaeroides*

La cepa de la bacteria fotosintética fue proporcionada por el laboratorio del Dr. George Dreyfus del departamento de Genética Molecular del Instituto de Fisiología de la UNAM. Se entregó una caja Petri con medio sólido Sistrom's en donde crecieron colonias de *Rhodobacter sphaeroides* (WS8-N). Posteriormente se la muestra de llevada al laboratorio de Bacteriología en la Unidad de Investigación Interdisciplinaria en Ciencias de la Salud y la Educación (UIISCE), en la Facultad de Estudios Superiores Iztacala, UNAM.

Una vez en el laboratorio de Bacteriología la cepa de *R. sphaeroides* fue propagada en medio Sistrom's líquido, el crecimiento se efectuó en tubos eppendorf con iluminación de lámparas incandescentes de $40 \mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$ en periodos de luz-oscuridad de 12-12 horas respectivamente.

Modificación del Medio Basal Bold

La modificación del Medio Basal estuvo basada en la sustitución del macronutriente $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ por MgCl_2 en las mismas cantidades que requería su preparación. Con esto se consigue desacoplar el fotosistema II, reduciendo casi en su totalidad la producción de oxígeno, pues es necesaria la ausencia de O_2 para que se active la enzima hidrogenasa responsable de la producción de hidrógeno en el sistema (Das D. y N. Veziroglu. 2001).

Posteriormente los micronutrientes también tuvieron modificaciones en cuanto a la ausencia de compuestos azufrados. La intención en la eliminación de estos compuestos está dada en la comprobación del incremento en el desacople del PSII, considerando la referencia arriba mencionada.

Un tercer medio de cultivo que fue probado consistió en la sustitución del micronutriente ZnSO_4 por ZnCl_2 . El cuarto medio de cultivo está basado en la eliminación del micronutriente ZnSO_4 , de esta forma se logra la completa ausencia de los compuestos azufrados en el medio basal.

En resumen, se designan a estos cuatro medios de cultivo de la siguiente manera: Medio Basal Bold (MBB), considerado como el medio control. Medio Modificado Bold MgCl_2 (MMBMgCl₂). Medio Modificado Bold ZnCl_2 (MMBZnCl₂) y Medio Modificado Bold sin ZnSO_4 (MMBsinZnSO₄).

El medio no presentó cambio o problema en su elaboración, así como tampoco después de su esterilización. De esta manera, se prosiguió a realizar un ensayo con un inóculo de la muestra de 1 ml sobre 25 ml de este medio modificado en un matraz Erlenmeyer de 125 ml, se dejó incubar en las mismas condiciones de intensidad de luz, periodo de luz-oscuridad y rpm. Se pudo observar que el cultivo se tornaba de un verde intenso a un tiempo muy similar (8 días) que el cultivo en Medio Basal Bold (ver anexo).

Modificación del Medio Sistrom's para *Rhodobacter sphaeroides*

La modificación de este medio consistió en sustituir el macronutriente $(\text{NH}_4)\text{SO}_4$ por MgCl_2 , y $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ por MgCl_2 , pues la presencia de derivados de nitrógeno inhibe a la hidrogenasa en estas bacterias fotosintéticas. Los compuestos de sulfatos fueron sustituidos por la razón antes mencionada y un posterior crecimiento mutuo tanto de microalgas como de bacterias fotosintéticas.

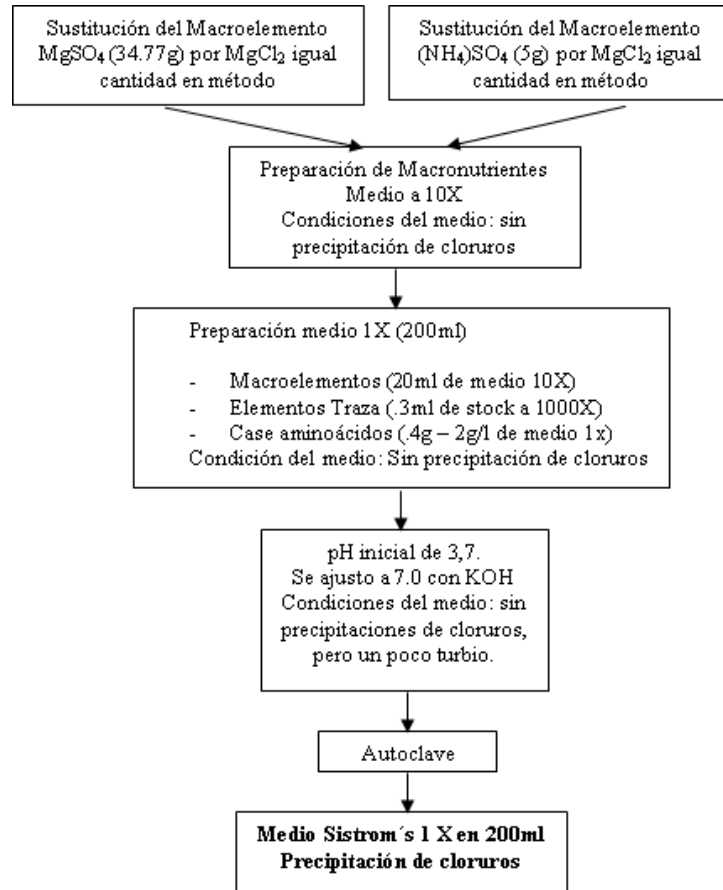


Figura 5.2. Diagrama del método de preparación cuando se sustituye $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ por MgCl_2 . En este primer ensayo los cloruros son precipitados en el matraz Erlenmeyer después de la esterilización del medio de cultivo.

La preparación de este medio no tuvo complicación alguna, sin embargo después de la esterilización los compuestos de cloruros se precipitaban al fondo del matraz (Diagrama 5.2 y 5.3).

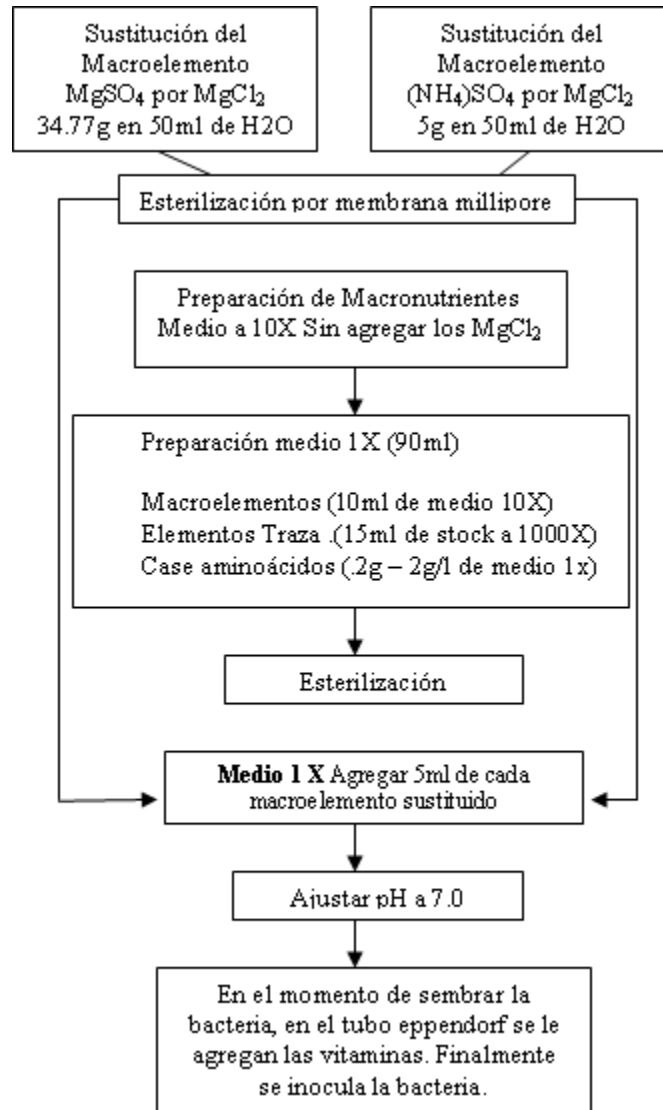


Figura 5.3. Diagrama del método de preparación cuando se sustituye $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ por MgCl_2 . Segundo ensayo, los macronutrientes son esterilizados por membrana millipore, los micronutrientes se esterilizan por el método convencional. Sin embargo, la técnica resulto complicada y propensa a contaminación del medio.

Se realizo también un medio donde sólo se sustituyo $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ por MgCl_2 en las mismas cantidades que se requieren para el crecimiento y el $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ fue eliminado. Se realizó una prueba con este medio y *R. sphaeroides* creció favorablemente con este ultimo medio elaborado (ver anexo).

5.3. CURVA DE CRECIMIENTO POR ABSORBANCIA

Curva de crecimiento para *Scenedesmus acutus* en Medio Basal Bold

El desarrollo de la curva de crecimiento para *S. acutus* contempló que los ensayos fueran de la siguiente manera: Se tomó del cultivo axénico un inóculo de 1 ml (cuando este se encontraba de un color verde intenso, 10 días) y fue vertido en 25 ml de Medio Basal Bold, se utilizaron 24 matraces Erlenmeyer de 125 ml, cada uno con la cantidad de inóculo y Medio Basal Bold anteriormente mencionada y con un tapón de algodón recubierto por gasa (bajo condiciones de asepsia y aeróbicas). Esto completa una serie tres repeticiones por día en un periodo de ocho días.

Los matraces fueron iluminados con dos lámparas fluorescentes de 30 Watts cada una, dispuestas a 30 cm de distancia, en un ciclo de 12:12 hrs luz-oscuridad, respectivamente. Los matraces estaban en condiciones de agitación a 110 rpm durante las 24 horas del día.

Para la obtención de curva de crecimiento se empleó la técnica de turbidez, empleando un espectrofotómetro modelo termospectronic Helios λ . Se realizó un primer ensayo en donde el espectrofotómetro hizo un barrido sobre cual era la mejor longitud de onda de absorción del medio de cultivo de *S. acutus*. El espectrofotómetro mostró tres picos de absorción, los cuales fueron a 645, 663 y 680 nm. La longitud de onda utilizada fue de 680 nm, misma que se reporta en general para las microalgas.

Curva de crecimiento para *Scenedesmus acutus* en Medios Modificados MMBMgCl₂, MMBZnCl₂ y MMBsinZnSO₄

Las condiciones de crecimiento para llevar a cabo estos ensayos y poder realizar la curva de crecimiento para los Medios Modificados Bold, se realizaron en las mismas condiciones de incubación, así como igual número de repeticiones que el Medio Basal Bold.

Se realizó un lote de tres medios modificados de cultivo para que *S. acutus* creciera en cada uno de ellos. Se utilizó igualmente un espectrofotómetro modelo termospectronic Helios λ .

Curva de crecimiento para *Rhodobacter sphaeroides* en Medio Sistrom's

Para llevar a cabo la curva de crecimiento de *R. sphaeroides*, se requirió de incubar a la bacteria fotosintética en tubos eppendorf. En un tubo se agregó 1.6 ml de Medio Sistrom's y 1.6 µl de vitaminas necesarias para el crecimiento de la bacteria, posteriormente se añadió al tubo un inóculo de 20 µl, finalmente el tubo fue cerrado.

Las condiciones de crecimiento óptimas para las bacterias, comprende condiciones de intensidad lumínica con 4 lámparas incandescentes de 40 Watts cada una a una distancia del cultivo de 30 cm. El periodo de luz se mantuvo durante las 24 horas del día.

Se llevaron a cabo 15 series con tres repeticiones cada una, lo cual contempla que se efectuaron 3 mediciones con el espectrofotómetro cada 2 horas, durante un periodo de 30 hrs.

Se realizó un barrido de absorbancia a muestras anteriores en mismas condiciones, esto determinó cuál fue la mejor longitud de onda para efectuar la curva. El barrido de absorbancia arrojó que la mejor longitud de onda es de 660 nm, misma que es reportada en ensayos donde se trabaja con esta bacteria fotosintética.

5.4. CURVA DE CRECIMIENTO POR MEDIO DE LA TINCIÓN DE DAPI

La técnica de DAPI (4',6-Diamidino-2-fenil indol diclorhidrato) permite llevar a cabo cuentas de microorganismos más exactas por la nitidez que ofrece la tinción y el mayor tiempo de almacenamiento del material biológico. Esta técnica es altamente específica para ADN nuclear, mitocondrial y cloroplastos.

El material biológico a teñir, se fija con formol a 2% previamente. Lo que permite que los organismos queden inmóviles a la hora de realizar el conteo en el microscopio de epifluorescencia.

Posteriormente, se toma una muestra en suspensión y es depositada en un embudo de filtración, el cual contiene una membrana de policarbonato oscuro, con un poro de 20 µm.

La muestra se filtra mediante el uso de vacío, después se agrega 50 μ ml del colorante DAPI, se deja reposar la membrana durante un periodo de 5 minutos.

A continuación, se retira la membrana de policarbonato y es depositada sobre un portaobjetos, al cual se le añade previamente una gota de aceite de inmersión de baja fluorescencia. La membrana de policarbonato es bañada con otra gota de aceite de inmersión y cubierta con un cubre objetos.

Si la muestra a teñir contiene una elevada densidad de microorganismos, se recomienda diluir la muestra con el propósito de obtener una distribución adecuada de los ejemplares en el embudo de filtración, se sugiere extraer una pequeña cantidad de muestra y agregar agua destilada estéril en proporción como se desee la dilución, según la densidad de microorganismos.

El número final de microorganismos por campo óptico del microscopio debe ser óptimo, con una buena distribución sobre la membrana de policarbonato, para facilitar el conteo de los organismos.

Se realizó una visualización previa de la muestra antes de efectuar el conteo, con la finalidad de corroborar la correcta densidad y no contaminación con otros microorganismos en la muestra.

El conteo se realizó por el método de recuento por campo, donde la cuadrícula del ocular es un campo cuadrado o una rejilla. De la rejilla, se selecciona un pequeño cuadro, en el interior de este se cuenta el número de individuos, cada vez que, el campo cambia se cuenta en el mismo cuadrado de la rejilla.

La muestra fue revisada en movimientos de arrastre en forma de zig-zag, con el propósito de cubrir toda la membrana y que el conteo sea estadísticamente representativo. De esta manera, se estable el conteo de un número determinados de campos ópticos elegidos al azar, hasta obtener un total de 300 a 500 individuos por muestra.

Las suspensiones utilizadas fueron cultivos de *Scedesmus acutus*, donde fueron cultivadas en Medio Basal Bold y en lote por los Medios Modificados Bold. Las muestra empleadas

en los conteos por la tinción de DAPI, fueron cultivos por día hasta cubrir un total de ocho días. Se tomó una muestra inicial de 1 ml y a partir de esta se realizaron diluciones desde 1:10 hasta 1:1000.

Por otro lado, las muestras empleadas de *Rhodobacter sphaeroides*, fueron cultivos de crecimiento de un periodo de 0 a 24 horas. Se fijó una muestra inicial de 3 ml, contenidas en un tubo eppendorf donde las bacterias fueron cultivadas. En este caso, se realizaron diluciones de 1:10 hasta 1: 10000.

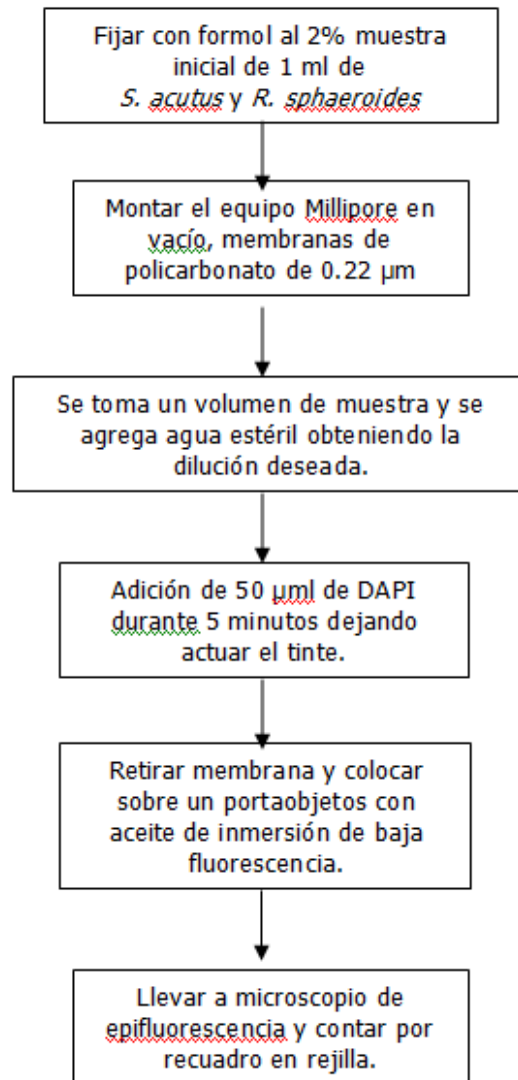


Figura 5.4. Diagrama de flujo de la técnica de Tinción de DAPI utilizada en *S. acutus* y *R. sphaeroides*.

5.5. EFICIENCIA FOTOSINTÉTICA Y RESPIRATORIA

En la fotosíntesis, la energía luminosa es absorbida por la clorofila y usada en la reducción de bióxido de carbono a carbohidratos. Si los complejos fotosintéticos son sometidos en una cámara provista con bióxido de carbono e iluminación, entonces se produce oxígeno. El proceso respiratorio, por el contrario, da lugar a un consumo de oxígeno en la oscuridad. Cuando el oxígeno se acumula en fase gaseosa durante la fotosíntesis, este puede ser detectado polarográficamente con un electrodo tipo Clark (Walker D.1990).

De este modo, se determinó la actividad fotosintética como desprendimiento de oxígeno, así como la actividad respiratoria como consumo de oxígeno en la microalga *S. acutus*.

Los cuatro medios de cultivo analizados comprendieron densidades celulares de *S. acutus*, que iban desde 10^3 hasta 10^7 células/ml. Se logró estandarizar el método de análisis de eficiencia fotosintética y respiratoria por desprendimiento y consumo de oxígeno de la siguiente manera: Se empleó material celular de 10^7 células/ml, del cual se tomó un mililitro y se agregó a la cámara de reacción del electrodo tipo Clark, posteriormente se añadió 2 ml de Medio Basal Bold fresco (o según el caso, MMBMgCl₂, MMBZnCl₂ o MMBsinZnSO₄), se cerró la cámara de reacción con un embolo ajustando el volumen a 3 ml. Se realizaron tres repeticiones para cada muestra y se trabajó con el promedio de los ensayos.

El ensayo inicia midiendo la cantidad de oxígeno consumido en la respiración, esta parte del ensayo se realizó en oscuridad, tapando la cámara de reacción con un paño de tela de color negro, el consumo de oxígeno se sigue por 15-20 minutos. Posteriormente la muestra se ilumina con luz saturante ($3000 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$) a partir de una luz fría. El desprendimiento de oxígeno se sigue por 15-20 minutos aproximadamente.

Para el análisis de la eficiencia fotosintética y respiratoria por desprendimiento y consumo de oxígeno respectivamente, se emplea la siguiente formula:

$$\frac{1200 \text{ nanoátomos de O}_2}{20 \text{ cm}} \times \frac{60 \text{ min}}{1 \text{ hr}} \times \frac{\gamma}{1 \text{ min}}$$

El resultado se expresa como: nanoátomos de O₂ x hr⁻¹.

5.6. FLUORESCENCIA IN VIVO EN *Scenedesmus acutus*

El estudio de la fluorescencia in vivo de la Chl a en *Scenedesmus acutus* permite evaluar el efecto que producen los distintos sustratos utilizados en la generación de H₂ en la fotosíntesis. Este método es empleado como un indicador de todos los niveles funcionales de la fotosíntesis y reacciones fotosintéticas que participan en la producción de H₂.

La emisión de fluorescencia de la clorofila a del PSII para los cuatro medios de cultivo, se determino utilizando un fluorímetro de pulso de amplitud modulada “Handy PEA Chlorophyll Fluorometer” (Hansatech, Reino Unido). Los ensayos fueron realizados en el laboratorio 115 del departamento de Bioquímica del Conjunto E de la Facultad de Química, UNAM.

Para las mediciones de fluorescencia, se utilizó material biológico de *S. acutus* en cultivo durante 14 días, obteniendo una densidad celular de 10⁹ células/ml. A partir de ahí se tomaron 5 ml de muestra de cada medio de cultivo para realizar el ensayo de emisión por fluorescencia de la clorofila a. Las muestras de cultivo fueron preadaptadas a oscuridad por un periodo de 12 horas. Se llevo a cabo una serie de cinco repeticiones por cada medición para cada uno de los medios.

Se tomaron 100 µl de muestra de *S. acutus* preadaptadas a oscuridad. Posteriormente fueron colocados sobre un cuadro de papel filtro de 1 cm X 1 cm, con la micropipeta se concentraba la muestra sobre el papel. Las células de *S. acutus* se oscurecieron con pinzas (provistas de una abertura cubierta por una placa central móvil, sobre la que se adapta la fibra óptica a aproximadamente 10 mm de distancia), por un minuto, para lograr que todos

los componentes de la cadena transportadora de electrones (Q_A) se encuentren completamente oxidados (abiertos). Luego, se aplicó sobre la pinza el cabezal con la fibra óptica del fluorómetro, y se deslizó la lámina oscurecedora de la pinza, para permitir el paso de los diferentes pulsos de luz.

El equipo registra las señales de los diferentes tipos de fluorescencia y calcula en forma automática los parámetros de fluorescencia. Los parámetros y las fórmulas son entregadas por el software Handy PEA- Biolyzer 5.0 (Hansatech, Reino Unido).

5.7. DISEÑO Y ELABORACIÓN DEL SISTEMA DE GENERACIÓN DE H_2

Para el diseño del sistema generador de hidrógeno se utilizó un frasco aspirador de 900 ml, el cual tiene dos salidas compuestas por tubos de metal. En uno de los tubos va conectada una manguera de neopreno, que a su vez esta unida a un piptel conectado a un tanque de helio.

En el segundo tubo también va sujeta una manguera de neopreno, donde pueda salir el oxígeno desplazado por el helio. Ambas mangueras de neopreno constan de una llave de paso de latón, para que se pueda regular el flujo de los gases. Todas las conexiones entre tubos de metal, manguera de neopreno y piptel van aseguradas con abrazaderas de metal, con la intención de que no existan fugas de gas en el sistema y logra un ambiente controlado.

Se empleo el gas helio, como generador de una atmosfera anaerobia. Considerando sus características fisicoquímicas como: ausente de reacción con otros compuestos, gas inerte, no flameable, apto para generar atmósferas anaerobias.

Lamentablemente, el grosor del vidrio de los frascos aspiradores impedía la adecuada penetración de la luz, por lo que el cultivo en su interior no alcanzo la biomasa óptima para llevar a cabo el ensayo.

6. RESULTADOS

6.1. CURVA DE CRECIMIENTO

Scenedesmus acutus

Los resultados obtenidos en la curva de crecimiento para *Scenedesmus acutus* por el método de absorbancia en los distintos medios de crecimiento fueron:

En el Medio Basal Bold, el cual no presenta modificación alguna de sus componentes, se obtuvo una curva de crecimiento sigmoideal tipo, donde la fase de latencia se presentó a partir del día de crecimiento 0 al día 2. La fase exponencial esta considerada del día 3 hasta el día 6, a partir del día 7 se presenta la fase estacionaria.

Para el Medio Modificado BoldMgCl₂ la fase de latencia se presenta del día 0 al día 2, la fase exponencial esta comprendida a partir del tercer día hasta el sexto día. La fase estacionaria, se encuentra desde el día 7.

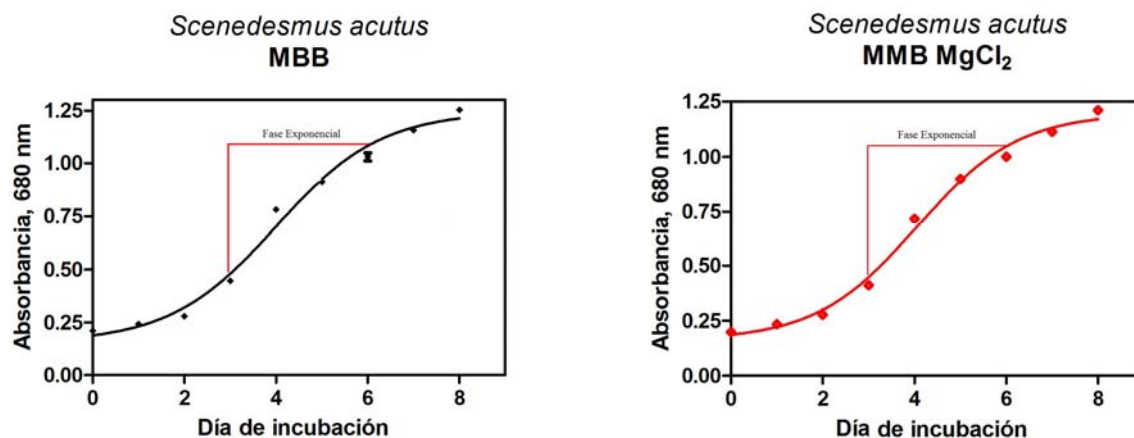


Figura 6.1. Curva de crecimiento de *S. acutus* en Medio Basal Bold y Medio Modificado BoldMgCl₂.

En Medio Modificado BoldZnCl₂ la fase de latencia también sucede del día 0 al día 2, la fase exponencial inicia del día 3 al día 6 y la fase estacionaria ocurre en el día 7.

En cuanto se refiere al Medio Modificado BoldsinZnSO₄ los días 0 al día 2 se extiende la fase de latencia, del día 3 al día 6 se da la fase exponencial y a partir del día 7, la fase estacionaria.

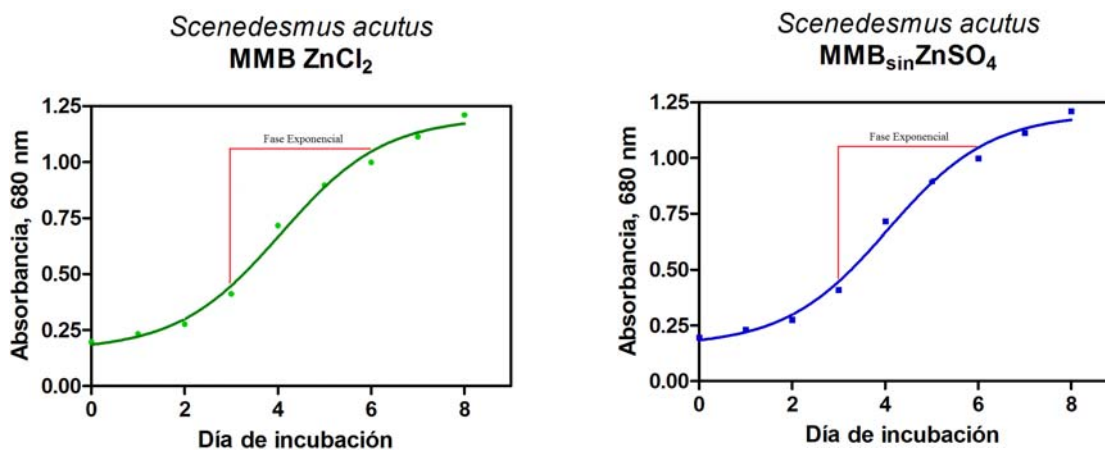


Figura 6.2. Curva de crecimiento de *S. acutus* en Medio Modificado BoldZnCl₂ y Medio Modificado BoldsinZnSO₄.

El crecimiento de *Scenedesmus acutus*, en cuanto a la incubación en Medio Modificado BoldMgCl₂, Medio Modificado BoldZnCl₂ y Medio Modificado BoldsinZnSO₄ no resultan de ser perjudiciales, pues el crecimiento celular no se ve afectado, ya que los tres medios modificados presentan las fases de crecimiento en los mismos días de cultivo que el Medio Basal Bold.

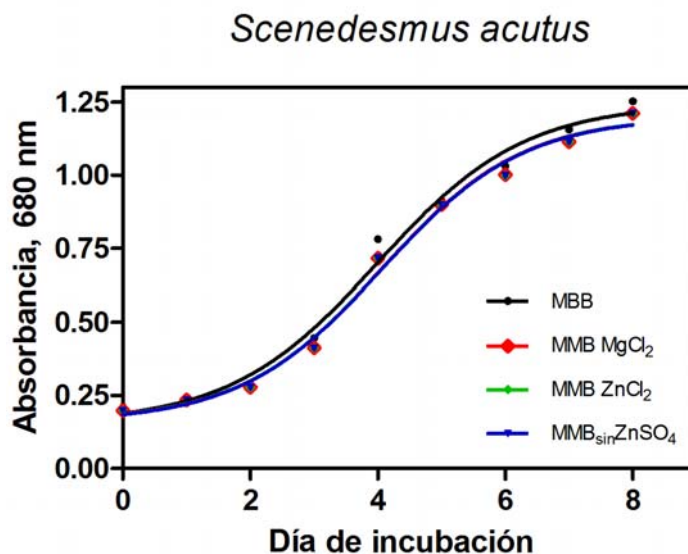


Figura 6.3. Comparación de los cuatro medios de cultivo para *S. acutus*.

Análisis curva de crecimiento por absorbancia

Se realizó una prueba estadística “ANOVA de dos vías” para grupos de datos independientes (MBB, MMBMgCl₂, MMBZnCl₂ y MMBsinZnSO₄). Los datos a comparar provienen de los valores de absorbancia/días de crecimiento para la microalga *Scenedesmus acutus*.

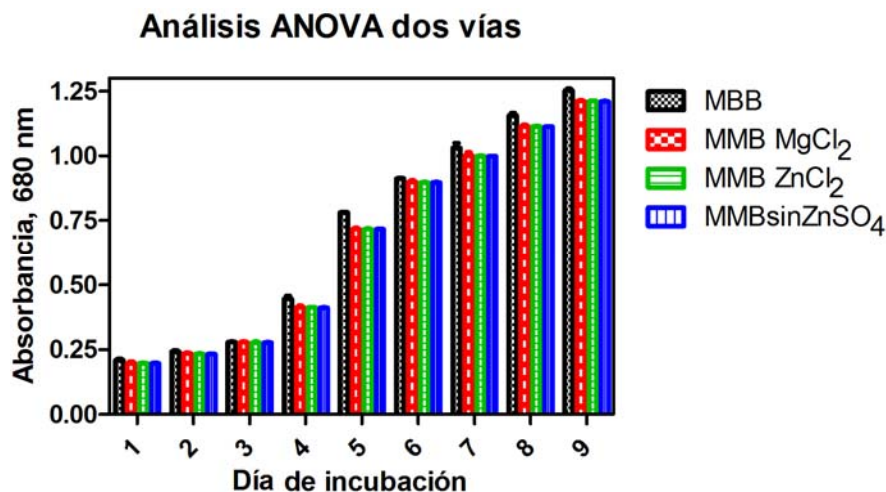


Figura 6.4. Análisis estadístico ANOVA para *S. acutus* comprado en los cuatro medios de cultivos.

La gráfica de ANOVA muestra los días totales en que se incubó *S. acutus*, por lo que no considera el día cero como inicio del análisis.

Los resultados indican que hay una interacción entre los distintos medios de cultivo. Así también, una correlación entre el crecimiento y el día de incubación cuando *S. acutus* crece en los distintos medios modificados.

Rhodobacter sphaeroides

La bacteria fotosintética *R. sphaeroides* cultivada en Medio Sistrom's presentó los siguientes resultados; de la hora 0 a la hora 6 se da la fase de latencia, en un periodo de 8 horas. A partir de la hora 8 a la hora 14, la fase exponencial con un lapso de tiempo de 6 horas, donde la hora 8 muestra el mayor crecimiento del cultivo.

Finalmente a partir de la hora 15 y en adelante se muestra la fase estacionaria, que se conserva por un periodo de 16 horas.

El Medio Modificado Sistrom's mantiene condiciones de crecimiento similares, marcadas para cada una en de las fases del crecimiento. De igual manera, se puede observa en las gráficas que el Medio Modificado Sistrom's presenta condiciones óptimas para sostener funcionalmente el cultivo de la bacteria fotosintética.

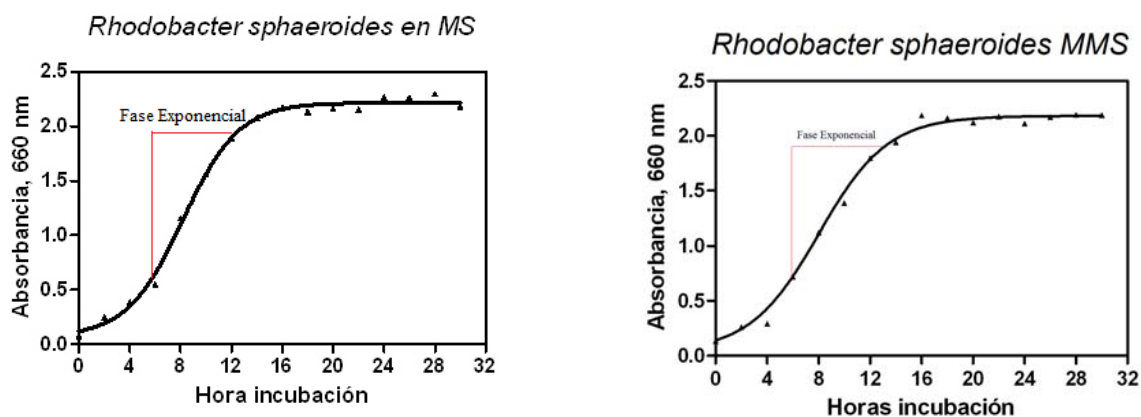


Figura 6.5. Curva de crecimiento para *R. sphaeroides* en Medio Sistrom's y Medio Modificado Sistrom's en un periodo de 30 hrs.

Se realizo una prueba estadística "t de Student" basada en grupos de datos independientes, donde se compara la viabilidad observada en crecimiento de la bacteria fotosintética *R. sphaeroides*, donde se analizo a los distintos medios de cultivo, Medio Sistrom's (MS) y Medio Modificado Sistrom's (MMS).

Se utilizo un nivel de intervalo de confianza de 95%. El intervalo de confianza para 95% es: -0.7537 a 0.8024. Valor de P= 0.9483. Valor de P sale del rango de confianza para 95%, por lo que se rechaza la hipótesis nula. Es decir, no hay diferencia significativa en el crecimiento de *Rhodobacter sphaeroides*, cuando esta crece en medio MS o MMS.

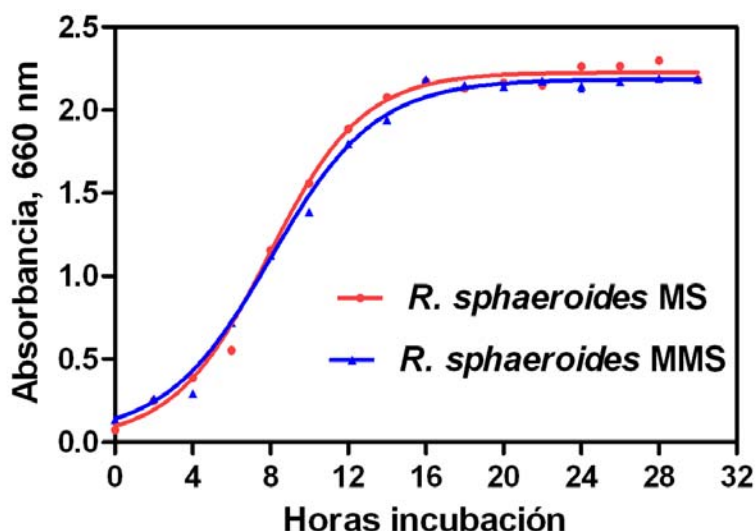


Figura 6.6. Comparación en crecimiento de *R. sphaeroides* cuando se cultiva en Medio Sistrom's y Medio Modificado Sistrom's.

6.2. TINCIÓN DE DAPI

Scenedesmus acutus

La siguiente tabla muestra los valores del conteo (células por mililitro) para *Scenedesmus acutus* en Medio Basal Bold y los tres medios modificados. Los resultados del análisis estadístico ANOVA muestran que hay un efecto significativo en los cuatro medios de cultivo para *S. acutus*, donde, si bien la interacción no es de manera total existen sólo una diferencia del 0.01% entre los medios analizados que considera los factores a los medios modificados y los días de incubación. Es decir, estos medios probados presentan el mismo efecto de crecimiento para el alga unicelular.

Número de células/mililitro								
Cultivo	Día 0	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5	Día 6	Día 7
MBB	3.66×10^3	7.45×10^3	2.99×10^4	6.09×10^4	7.32×10^5	1.49×10^6	7.40×10^6	1.55×10^7
MMB $MgCl_2$	3.64×10^3	7.39×10^3	2.97×10^4	6.03×10^4	7.49×10^5	1.52×10^6	7.62×10^6	1.58×10^7
MMB $ZnCl_2$	3.61×10^3	7.34×10^3	2.97×10^4	6.01×10^4	7.46×10^5	1.51×10^6	7.60×10^6	1.56×10^7
MMBsin $ZnSO_4$	3.59×10^3	7.34×10^3	2.95×10^4	6.01×10^4	7.45×10^5	1.49×10^6	7.61×10^6	1.57×10^7

Tabla 6.1. Conteo de células por mililitro mediante la técnica de tinción por DAPI para *Scenedesmus acutus*.

Rhodobacter sphaeroides

El conteo de células por mililitro para *R. sphaeroides* no muestra una diferencia significativa entre los medios de cultivo MS y MMS, según la prueba de Student's realizada. Lo que significa que, ambos medios son propicios para el crecimiento y desarrollo de la bacteria fotosintética.

Número de células/mililitro							
Cultivo	Hora 0	Hora 2	Hora 4	Hora 6	Hora 8	Hora 10	Hora 12
MS	4.90×10^6	2.43×10^7	8.30×10^7	8.97×10^8	2.08×10^9	9.79×10^9	7.37×10^{10}
MMS	4.88×10^6	1.17×10^7	6.22×10^7	5.88×10^8	4.69×10^9	9.65×10^9	7.15×10^{10}

Tabla 6.2. Valores del conteo células por mililitro mediante tinción por DAPI para *R. sphaeroides* cuando se cultiva en Medio Sistrom's y Medio Modificado Sistrom's.

6.3. TASA DE CRECIMIENTO

Scenedesmus acutus

En cuanto a la microalga verde *Scenedesmus acutus* en Medio Basal Bold, la velocidad de crecimiento se reporta con un valor de 0.55 días^{-1} . La tasa generacional o de duplicación comprende un periodo de 1.26 días. En Medio Modificado BoldMgCl₂, se tiene un valor de 0.56 días^{-1} en lo que se refiere a la velocidad de crecimiento y con un valor de 1.23 días que corresponde a la tasa generacional. Para MMBZnCl₂ la velocidad de crecimiento es de 0.56 días^{-1} y 1.24 días en la tasa generacional. En MMBsinZnSO₄ 0.56 días^{-1} y 1.23 días, corresponden a la velocidad de crecimiento y tasa generacional, respectivamente (Tabla 6.3).

<i>S. acutus</i>	MBB	MMB MgCl ₂	MMB ZnCl ₂	MMB sinZnSO ₄
Vel. Crecimiento (días^{-1})	0.55	0.56	0.56	0.56
Tasa Generacional (días)	1.26	1.23	1.24	1.23

Tabla 6.3. Valores de velocidad de crecimiento y tasa generacional de *Scenedesmus acutus* en 7 días de crecimiento.

Se realizó una prueba estadística de ANOVA de “dos vías” a los datos obtenidos por medio de la tinción por DAPI, así según el estadístico, existe una correlación entre los medios de cultivo en cuanto al número de células por mililitro y el día de crecimiento, por tanto, no hay diferencia significativa en cuanto a la velocidad de crecimiento y tasa generacional cuando *Scenedesmus acutus* crece en cada uno de los distintos medios de cultivo.

Rhodobacter sphaeroides

Para *Rhodobacter sphaeroides* en Medio Sistrom's, la velocidad de crecimiento contempla un periodo de 0.2073 horas⁻¹, la Tasa generacional de 3.34 horas. En Medio Modificado Sistrom's, la velocidad de crecimiento y la tasa generacional es de 0.2070 horas⁻¹ y 3.34 horas, respectivamente.

Con base en el estadístico “t de Student” de grupos de datos independientes, para cada uno de los ensayos, velocidad de crecimiento y tasa generacional, se puede decir entonces, no existe una diferencia significativa entre el Medio Sistrom's y el Medio Modificado Sistrom's. De tal manera, que la bacteria fotosintética *R. sphaeroides* presenta tiempos similares de crecimiento en ambos medios de cultivo, como se puede observar en la tabla 6.4.

<i>R. sphaeroides</i>	Medio Sistrom's	Medio Modificado Sistrom's
Vel. Crecimiento (horas ⁻¹)	0.2073	0.2070
Tasa Generacional (horas)	3.34	3.34

Tabla 6.4. Valores sobre velocidad de crecimiento y tasa generacional de *Rhodobacter sphaeroides* en un periodo de 24 horas.

6.4. EFICIENCIA FOTOSINTÉTICA

El presente apartado corresponde a la cuantificación del oxígeno generado durante el periodo de fotosíntesis en *Scenedesmus acutus*. El ensayo fue realizado con microorganismos en un periodo de crecimiento de 14 días, previo acondicionamiento a medio de cultivo fresco durante la prueba.

Como se ha mencionado anteriormente, la ausencia de compuestos azufrados en el medio de crecimiento suprimen la producción de oxígeno. Sin embargo según los resultados obtenidos en esta fase, el Medio Modificado BoldMgCl₂ presenta un incremento del 13 % en el desprendimiento de nanoátomos de oxígeno en comparación con el Medio Basal Bold. Adicionalmente, el Medio Modificado BoldZnCl₂ y el Medio Modificado BoldsinZnSO₄ muestran un decremento en la producción de oxígeno del 20 y 40%, respectivamente cuando son comparados con el Medio Basal Bold.

<i>Fotosíntesis</i>	MBB	MMBMgCl ₂	MMBZnCl ₂	MMBsinZnSO ₄
Nanoátomos de O ₂ x hr-1 Promedio	780	840	600	480
Desviación Estandar	103.92	103.92	103.92	103.92

Tabla 6.5. Producción de nanoátomos de oxígeno durante la fotosíntesis mediante inducción de luz por electrodo tipo Clark.

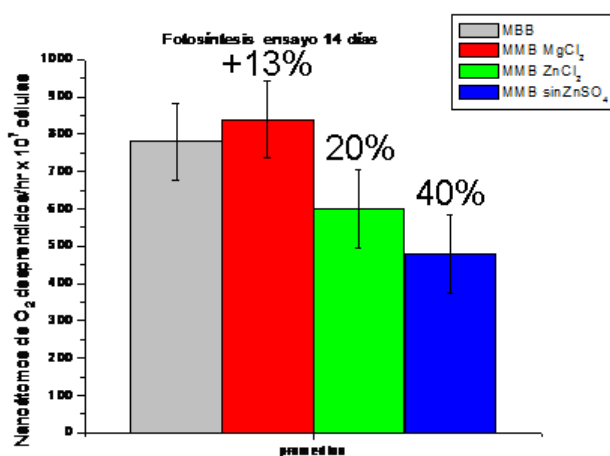


Figura 6.7. Comparativa del desprendimiento en nanoátomos de oxígeno en los distintos medios de cultivo Bold.

6.5. EFICIENCIA RESPIRATORIA

La eficiencia respiratoria esta dada por el consumo de oxígeno durante el proceso respiratorio, el cual se consiguió mediante la inducción a oscuridad de la muestra, posteriormente se realizó la cuantificación por medio de un electrodo tipo Clark. Los

microorganismos empleados tuvieron un periodo de crecimiento de 14 días. Así también la muestra fue condicionada con medio de cultivo fresco durante la prueba.

Para el Medio basal Bold, el consumo promedio de nanoátomos de oxígeno fue de 360, en las tres repeticiones realizadas posteriormente se obtuvo el mismo resultado, por lo que la desviación estándar toma un valor de 0. En el caso del MMBMgCl_2 y MMBZnCl_2 no se aprecia consumo de oxígeno. El MMBsinZnSO_4 presenta un decremento del 33.33% con respecto al Medio Basal Bold.

Respiración	MBB	MMBMgCl₂	MMBZnCl₂	MMBsinZnSO₄
Nanoátomos de O ₂ x hr-1 Promedio	360	0	0	240
Desviación Estandar	0	0	0	84.85

Tabla 6.6. Consumo de nanoátomos de oxígeno durante la respiración mediante inducción de oscuridad por electrodo tipo Clark.

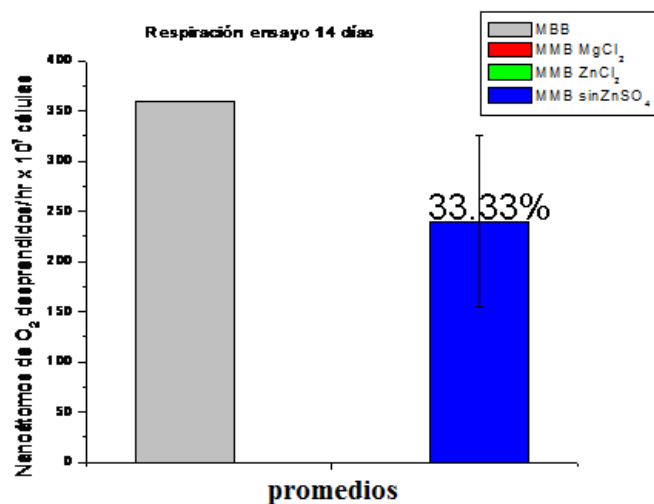


Figura 6.8. Comparativa del consumo en nanoátomos de oxígeno en los distintos medios de cultivo Bold.

6.6. FLUORESCENCIA *in vivo* EN *Scenedesmus acutus*

En el presente apartado se considera al Medio Modificado BoldMgCl₂ como el medio de cultivo control, marcado con la línea roja en los Radar Plots, debido a que este medio modificado es utilizado en la generación biológica de hidrógeno, según las referencias

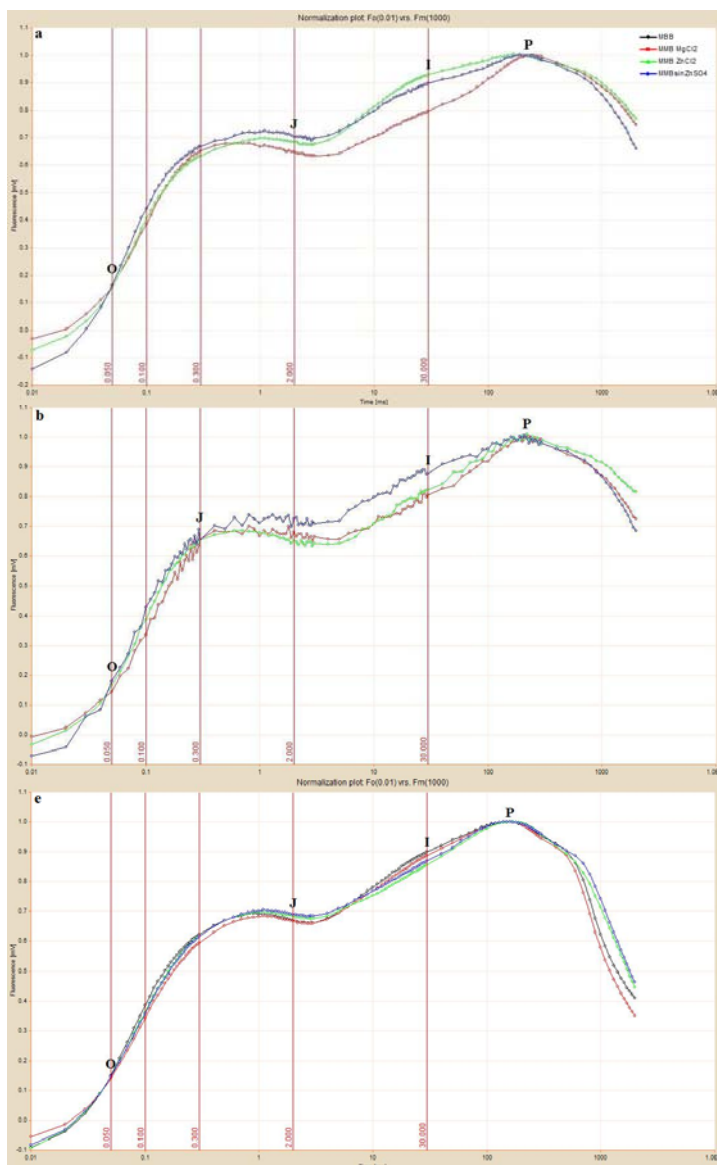
consultadas. Este plan de trabajo abarca ensayos con cultivos de *Scenedesmus. acutus* de 7 a 21 días de crecimiento, en condiciones de 12 horas luz, 12 horas oscuridad.

Sin embargo, al observar los resultados obtenidos de la fase anterior, se decidió realizar un ensayo de fluorescencia *in vivo* de 28 días de crecimiento de *S. acutus*, donde se llevo a cabo además la comparación entre los cuatro medios de cultivo (MBB, MMBMgCl₂, MMBZnCl₂ y MMBsinZnSO₄) y se analizó cual de estos favorecía el funcionamiento fotosintético en la generación de H₂.

La primera fase contempla ensayos en los cuales se estudio el aparato fotosintético, mediante la prueba de JIP con el fluorimetro Handy-PEA (Plant Efficiency Analyser, Hansatech Instruments Ltd. King's Lynn Norfolk.).

Al día 7 de crecimiento de la microalga verde, se nota un ligero incremento del paso J, de 0.004 y 0.006 mV, que corresponden a los medios MMBZnCl₂ y MMBsinZnSO₄, respectivamente. En el paso I se tiene un incremento de 0.01 y 0.013 mV con respecto al medio control (Figura 6.9a).

Para el día 14 se tiene un aumento claramente visible del paso I del MMBsinZnSO₄ de 0.008 mV, se observa una variación de los datos que empalma entre las curvas de los distintos medios, por lo que no se puede considerar un cambio determinante en los resultados (Figura 6.9b).



En el día 21 se presenta un aumento alrededor de 0.003 y 0.005 mV de MMBZnCl_2 y MMBsinZnSO_4 , para la fase de J a I se observa una disminución lineal de la fluorescencia hasta llegar a un punto de similitud con el paso I.

A los 28 de días de crecimiento *S. acutus* presenta menores variaciones de la fluorescencia, entre 0.002 y 0.003 del MMBZnCl_2 y MMBsinZnSO_4 , respectivamente en la fase de J-I. Ambas curvas OJIP tienden a una similitud de la curva control (Figura 6.9c).

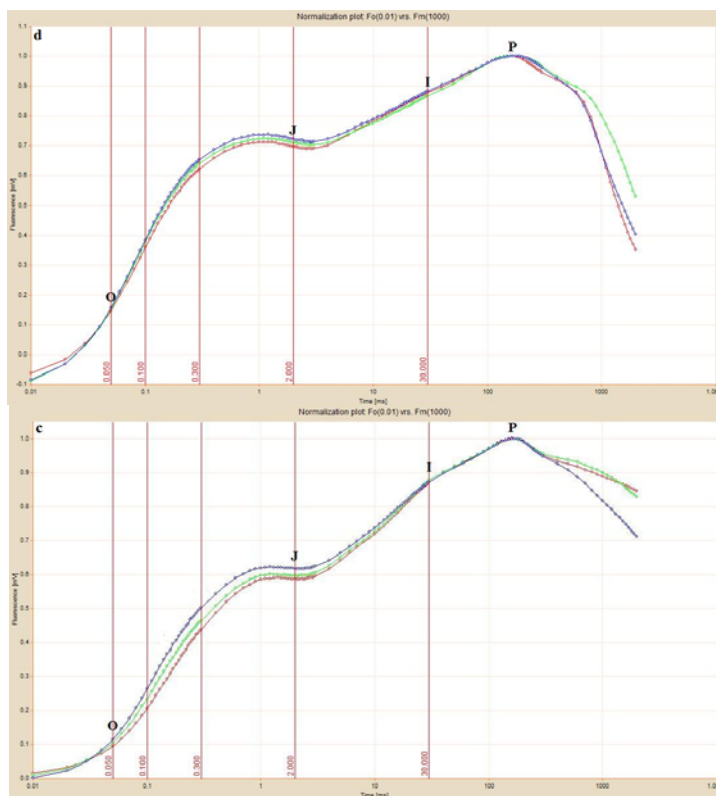


Figura 6.9. Curvas OJIP de los distintos medios de cultivo para *Scenedesmus acutus* a los 7 (a), 14 (b), 21 (c) y 28 (d, e) días de crecimiento.

Cuando se considera al MBB como medio control, se tiene una disminución

de la fluorescencia de los tres medios modificados en el paso de O a J, donde el MMBMgCl_2 presenta el mayor decremento con alrededor de 0.004 mV con respecto al control. Del paso J a P son el MMBsinZnSO_4 y MMBZnCl_2 que se encuentran por debajo del medio control y del MMBMgCl_2 (Figura 6.9d).

Los resultados obtenidos en la evaluación de los parámetros fotosintéticos de *Scenedesmus acutus* se utilizaron los datos obtenidos del software Biolyzer HP3, posteriormente con el software EXCEL 2003 se realizó un radar Plot donde se ilustran estos parámetros.

Para *Scenedesmus acutus* en 7 días de crecimiento, cuando se compara al medio de cultivo MMBZnCl_2 , con respecto al medio control (MMBMgCl_2), se observan parámetros fotosintéticos afectados como; la constante no fotosintética (**Kn**), el flujo de absorción mediante el centro de reacción (**ABS/RC**), el flujo de electrones por el centro de reacción (**ETo/RC**), estos tres parámetros presentan un decremento del 20%, el flujo de energía disipada por el centro de reacción (**DIO/RC**) se encuentra afectado en un 30%, la eficiencia

por el cual un electrón se mueve hacia los aceptores finales del fotosistema I (ΔR , δR), disminuye un 60% y la suma de la constante no fotosintética y fotosintética (**Sum K**) afectada en un 10% cada una (Figura 6.10a).

El ensayo también muestra elementos fotosintéticos que incrementan con el $MMBZnCl_2$; el índice fotosintético sobre la base de absorción de energía (**PI/ABS**), con un 40% aproximadamente, la intensidad de fluorescencia variable relativa en el paso I (**Vi**) con un 20%.

Con respecto al Medio Modificado Boldsin $ZnSO_4$ (línea azul), el índice fotosintético sobre la base de absorción de energía (**PI/ABS**) presenta un decremento del 25%, el flujo de electrones por el centro de reacción (**ETo/RC**) y la eficiencia del electrón hacia los aceptores finales del fotosistema I (ΔR) son los parámetros que se ven afectados, con un 20 y 40% respectivamente, así también la energía de flujo atrapada por el centro de reacción (**TRo/RC**) disminuye en un 5%. Es de notar que para este ensayo, el **PI/ABS** toma valores por debajo del $MMBZnCl_2$ y más aún del medio de cultivo control.

También se observa parámetros que incrementan como la intensidad de fluorescencia variable relativa en el paso J (**Vj**) con un 10%, la suma de las constantes fotosintéticas (**Sum K**) 5%, la intensidad de fluorescencia variable relativa en el paso I (**Vi**) con un 15% y la constante no fotosintética (**Kn**) 10%. El flujo de absorción mediante el centro de reacción (**ABS/RC**), la constante fotosintética (**Kp**) y el flujo de energía disipada por el centro de reacción **DIo/RC** toman valores en similitud al medio de cultivo control $MMBMgCl_2$ (Figura 6.10a).

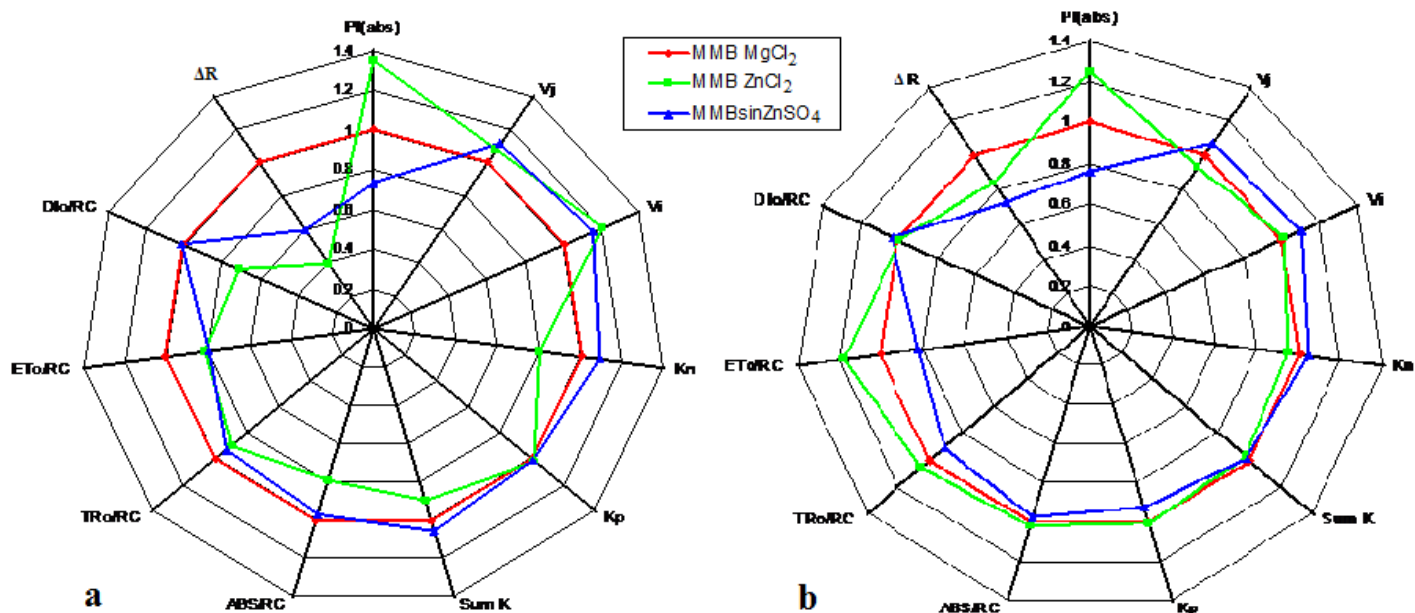


Figura 6.10. Radar Plot de *Scenedesmus acutus* de 7 (a) y 14 (b) días de crecimiento con Medio Modificado BoldMgCl₂, Medio Modificado BoldZnCl₂ y Medio Modificado BoldsinZnSO₄.

Para el ensayo de *S.acutus* con un crecimiento de 14 días, con el Medio Modificado BoldZnCl₂ los parámetros afectados que se observan son; ΔR con un 15%, la constante no fotosintética (**Kn**) 5% y la intensidad de fluorescencia variable relativa en el paso J (**Vj**) un 10%, con respecto al medio de cultivo control MMBMgCl₂.

Los parámetros que incrementan con respecto al control se distinguen como; el índice fotosintético sobre la base de absorción de energía (**PI/ABS**) 25%, la energía de flujo atrapada por el centro de reacción (**TRo/RC**) con un 10% y el flujo de electrones por el centro de reacción (**ETo/RC**) 20%.

Los valores de intensidad de fluorescencia variable relativa en el paso i (**Vi**), la suma de las constantes fotosintéticas (**Sum K**), la constante fotosintética (**Kp**), el flujo de absorción mediante el centro de reacción (**ABS/RC**) y el flujo de energía disipada por el centro de reacción (**DIo/RC**), permanecen en similitud con el medio de cultivo control.

En Medio Modificado BoldsinZnSO₄, los parámetros que resultaron afectados son; el índice fotosintético sobre la base de absorción de energía (**PI/ABS**) 25%, la energía de flujo atrapada por el centro de reacción (**TRo/RC**) con un 10%, el flujo de electrones por el centro de reacción (**ETo/RC**) 18%, la constante fotosintética (**Kp**) 5% y la eficiencia por la cual el electrón puede moverse hacia los aceptores finales del fotosistema I (**ΔR**) 25%. Cabe observar que los primeros tres parámetros mencionados toman valores inversamente proporcional al MMBZnCl₂.

La constante no fotosintética (**Kn**), la intensidad de fluorescencia variable relativa en el paso J (**Vj**), también presentan valores inversamente proporcional al MMBZnCl₂, esto es con un 5 y 10% de incremento, respectivamente. La intensidad de fluorescencia variable relativa en el paso i (**Vi**) tiene un incremento del 10% con respecto al control.

Los parámetros en similitud con el Medio Modificado BoldMgCl₂ y el Medio Modificado BoldZnCl₂ son; **Sum K**, **ABS/RC** y **DIo/RC** (Figura 6.10b).

Los resultados de la fluorescencia *in vivo* para *S. acutus* con 21 días de crecimiento para el Medio Modificado BoldZnCl₂ fueron los siguientes; el índice fotosintético sobre la base de absorción de energía (**PI/ABS**) disminuyó un 10% sobre el medio control (Figura 6.11c).

Los parámetros que incrementaron al compararlos con el MMBMgCl₂ son; la constante no fotosintética (**Kn**) con un 20%, la constante fotosintética (**Kp**) y la suma de las constantes fotosintéticas (**Sum K**), cada uno con un 15%, la energía de flujo atrapada por el centro de reacción (**TRo/RC**), así como el flujo de electrones por el centro de reacción (**ETo/RC**) 5%, el flujo de absorción mediante el centro de reacción (**ABS/RC**) esta por encima del control con un 8%, así como también el flujo de energía disipada por el centro de reacción (**DIo/RC**) por arriba con un 10%.

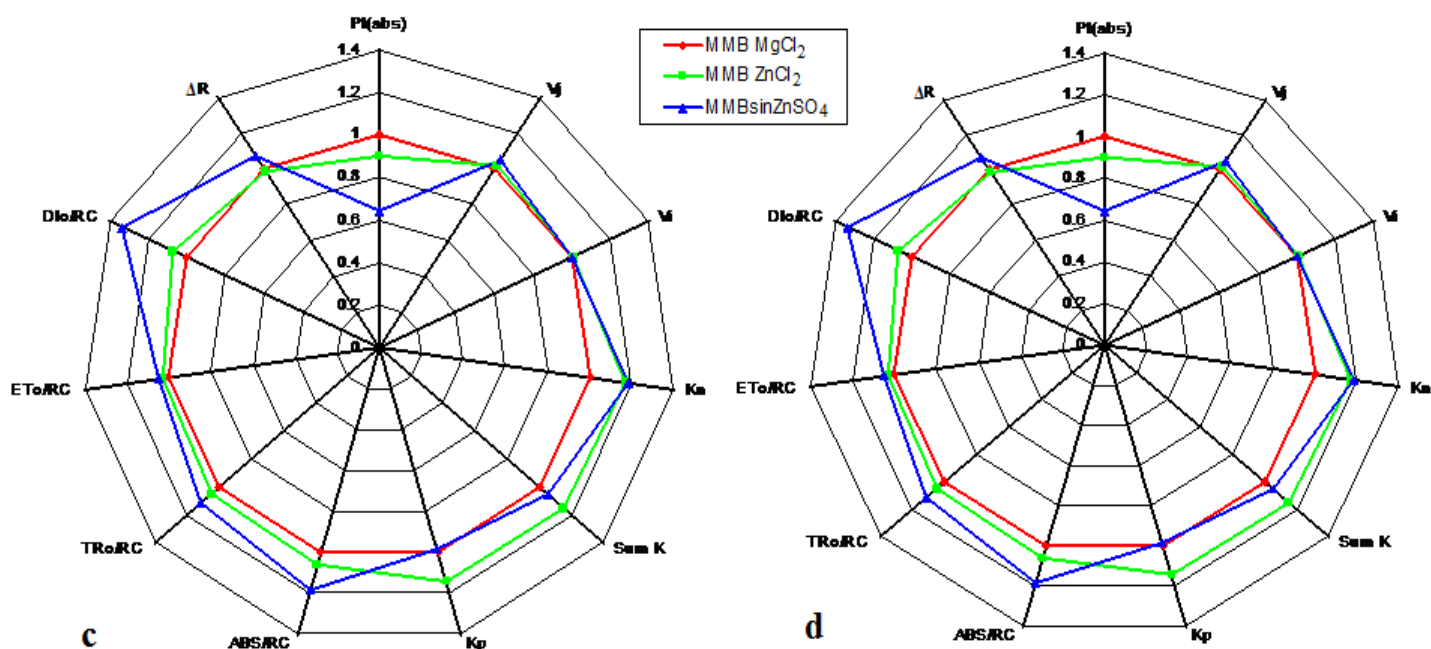


Figura 6.11. Radar Plot de *Scenedesmus acutus* de 21 (c) y 28 (d) días de crecimiento con Medio Modificado BoldMgCl₂, Medio Modificado BoldZnCl₂ y Medio Modificado BoldsinZnSO₄.

Para el Medio Modificado BoldsinZnSO₄, sólo el índice fotosintético sobre la base de absorción de energía (**PI/ABS**) resulta afectado con un 35%. En mayor número, los elementos fotosintéticos que se ubican por encima del medio control son; la intensidad de fluorescencia variable relativa en el paso J (**V_j**), la suma de las constantes fotosintéticas (**Sum K**) y el flujo de electrones por el centro de reacción (**ETo/RC**) cada uno en 5%, la constante no fotosintética (**Kn**) 18%, el flujo de absorción mediante el centro de reacción (**ABS/RC**) 20%, la energía de flujo atrapada por el centro de reacción (**TRo/RC**) 15%, la eficiencia por la cual el electrón se mueve hacia los aceptores finales del fotosistema I (**ΔR**) 10% y el flujo de energía disipada por el centro de reacción (**DIo/RC**) con un 35%, que resulta ser el valor porcentual más alto (Figura 6.11c).

Los valores para *Scenedesmus acutus* cuando crece en un periodo de 28 días en Medio Modificado BoldZnCl₂ son; con un decremento del 10% en el índice fotosintético sobre la base de absorción de energía (**PI/ABS**) por debajo del medio control, MMBMgCl₂.

Por encima del control se encuentran parámetros como; la constante no fotosintética (**K_n**), el flujo de absorción mediante el centro de reacción (**ABS/RC**) y el flujo de energía disipada por el centro de reacción (**DIo/RC**) con un 10% para cada elemento, la suma de las constantes fotosintéticas (**Sum K**) y la constante fotosintética (**K_p**) presentan un 15%, para la energía de flujo atrapada por el centro de reacción (**TRo/RC**) y el flujo de electrones por el centro de reacción (**ETo/RC**) se tiene un 5%.

En Medio Modificado BoldsinZnSO₄ se observa un aumento de la intensidad de fluorescencia variable relativa en el paso J (**V_j**) del 5%, la constante no fotosintética (**K_n**) 20%, la suma de las constantes fotosintéticas (**Sum K**) 5%, el flujo de absorción mediante el centro de reacción (**ABS/RC**) del 20%, la energía de flujo atrapada por el centro de reacción (**TRo/RC**) con un 15%, el flujo de electrones por el centro de reacción (**ETo/RC**) 5%, el flujo de energía disipada por el centro de reacción (**DIo/RC**) 35% y la eficiencia por la cual el electrón puede moverse hacia los aceptores finales del fotosistema I (**ΔR**) de un 10%.

El índice fotosintético sobre la base de absorción de energía (**PI/ABS**) es el parámetro que decrece un 35% cuando es comparado con el MMBMgCl₂ (Figura 6.11d).

La segunda fase de este apartado comprende ensayos de fluorescencia *in vivo* donde *Scenedesmus acutus* presenta 28 días de crecimiento, con los cuatro medios de cultivo, Medio Basal Bold (MBB; marcada en línea negra en el Radar Plot), considerado el medio de cultivo control, Medio Modificado BoldMgCl₂, Medio Modificado BoldZnCl₂ y Medio Modificado BoldsinZnSO₄.

En Medio Basal BoldMgCl₂, los parámetros que disminuyen al compararlos con el Medio Basal Bold, son; la suma de las constantes fotosintéticas (**Sum K**) y la constante no fotosintética (**K_n**) en un 20%, con un 18% la constante fotosintética (**K_p**), el flujo de absorción mediante el centro de reacción (**ABS/RC**) con 15%, el flujo de electrones por el centro de reacción (**ETo/RC**) y la energía de flujo atrapada por el centro de reacción (**TRo/RC**) en un 5% , el flujo de energía disipada por el centro de reacción (**DIo/RC**) con un 8%.

Los valores por encima del Medio Basal Bold corresponden al; índice fotosintético sobre la base de absorción de energía (**PI/ABS**) y la eficiencia por la cual el electrón puede moverse hacia los aceptores finales del fotosistema I (**ΔR**) en incremento en 10 y 15%, respectivamente.

Se puede observar que el $\text{MMB}_{\text{ZnCl}_2}$ y $\text{MMB}_{\text{sinZnSO}_4}$ presentan los mismos parámetros afectados al compararlos con el Medio Basal Bold, sus valores estan dados con respecto al orden en el medio de cultivo mencionado arriba.

El índice fotosintético sobre la base de absorción de energía (**PI/ABS**) con un 40 y 30%, la suma de las constantes fotosintéticas (**Sum K**), ambos con un 38%, la constante no fotosintética (**K_n**) con 30% para los dos medios de cultivo, la constante fotosintética (**K_p**) con 45 y 42%, la energía de flujo atrapada por el centro de reacción (**TRo/RC**) en un 2 y 5% y el flujo de electrones por el centro de reacción (**ETo/RC**) con 5 y 10%.

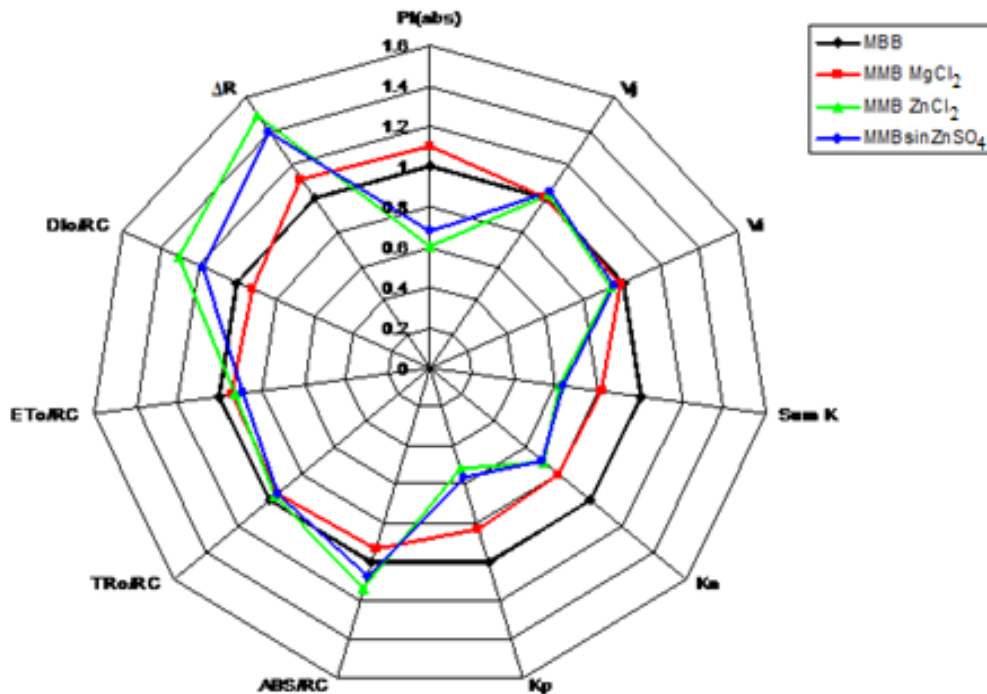


Figura 6.12. Radar Plot de *Scenedesmus acutus* de 28 días de crecimiento con Medio Basal Bold, Medio Modificado Bold MgCl_2 , Medio Modificado Bold ZnCl_2 y Medio Modificado Boldsin ZnSO_4 .

De igual forma, se haya una similitud de los parámetros que muestran un incremento en los medios de cultivos MMBZnCl_2 y MMBsinZnSO_4 , como son; el flujo de absorción mediante el centro de reacción (**ABS/RC**) en un 15 y 10%, el flujo de energía disipada por el centro de reacción (**DIo/RC**) con 30 y 20%, finalmente el parámetro con mayor aumento, la eficiencia por la cual el electrón puede moverse hacia los aceptores finales del fotosistema I (**ΔR**) en un 50 y 40% (Figura 6.12).

La figura 6.13 representa un resumen de la condición en los parámetros fotosintéticos de *Scenedesmus acutus*, donde se compara la actividad fotosintética a través de parámetros fotosintéticos de la fluorescencia *in vivo* al emplar los medios de cultivos previamente mencionados.

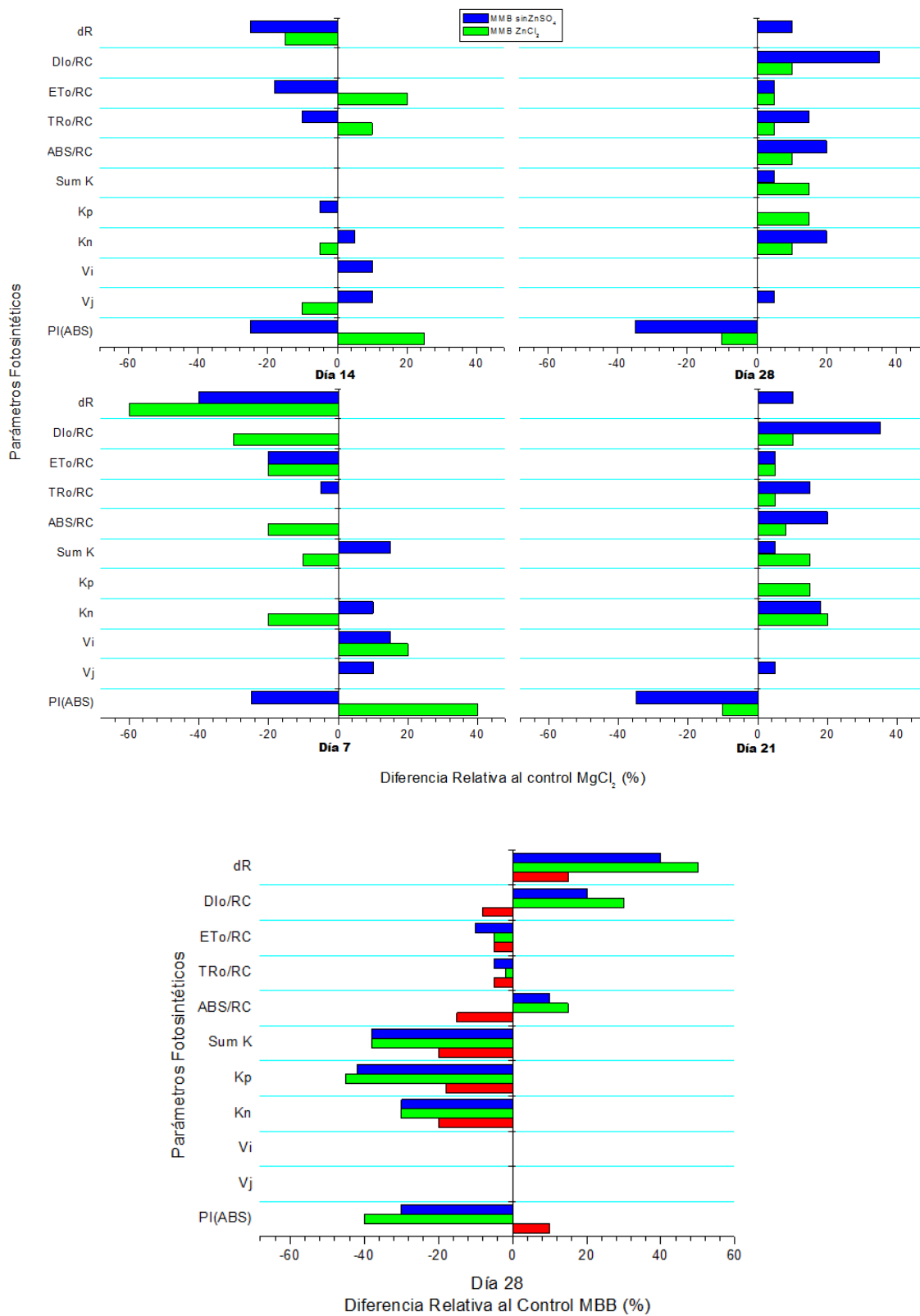


Figura 6.13. Resumen comparativo de los parámetros fotosintéticos mediante fluorescencia *in vivo* en *Scenedesmus actus*, de 7 a 28 días de crecimiento con Medio Basal Bold, Medio Modificado BoldMgCl₂, Medio Modificado BoldZnCl₂ y Medio Modificado BoldsinZnSO₄

Enseguida se muestran los trasientes de la clorofila a en la fluorescencia *in vivo* y los parámetros fotosintéticos relacionados con los distintos tratamientos probados.

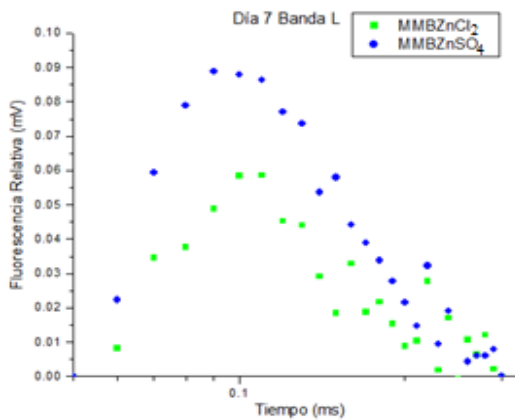


Figura 6.14. Cinética de la fluorescencia variable relativa de la clorofila a en *S. acutus* en 7 días de crecimiento. Se muestra las diferencias de los medios MMBZnSO₄ y MMBsinZnSO₄ con respecto al medio control MMBMgCl₂, donde se presenta la banda L.

En el séptimo día de crecimiento de *Scenedesmus acutus*, se presenta un incremento en la fluorescencia de la clorofila a, donde ambos medios de cultivo MMBZnCl₂ y MMBsinZnSO₄ muestran un aumento en la fluorescencia relativa.

Se observa la presencia de una banda L, de los 0.15 a los 0.30 ms, esto es, una transición del paso medio de O al paso J.

En Medio Modificado BoldsinZnSO₄ se presenta un pico mayor en la intensidad de la fluorescencia relativa con 0.09 mV en comparación al Medio Modificado BoldZnCl₂ con 0.06 mV, figura 6.14.

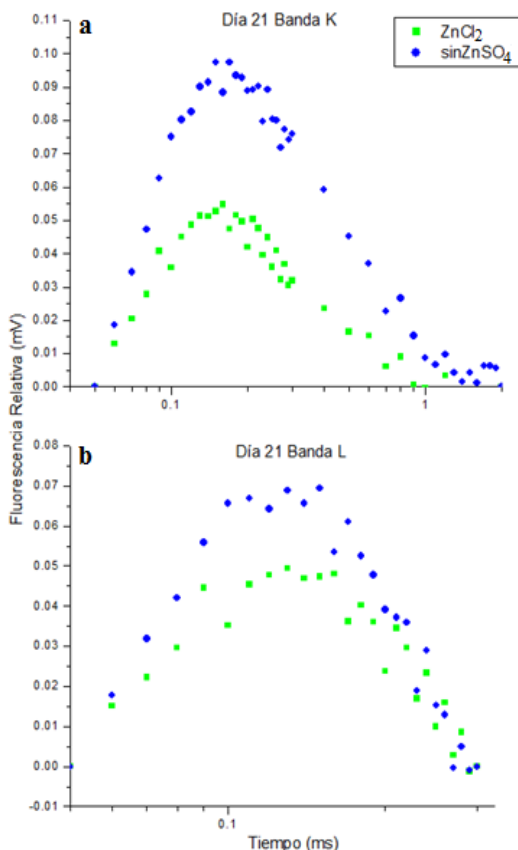


Figura 6.15. Cinética de la fluorescencia variable relativa de la clorofila a en *S. acutus* en 21 días de crecimiento. Se muestra en c y d las diferencias de los medios MMBZnSO₄ y MMBsinZnSO₄ con respecto al medio control MMBMgCl₂, donde se presentan las bandas K (a) y L (b).

A los 21 días de crecimiento, se observa una banda K, dada entre el paso final de O al paso J, que se ubica entre los 0.30 y 2 ms, donde el Medio Modificado BoldsinZnSO₄, se observa un mayor incremento de la fluorescencia relativa de 0.10 mV, figura 6.15a.

También, se presenta una banda L, con el MMBsinZnSO₄ como tratamiento de mayor valor en la fluorescencia relativa, figura 6.15 b.

En 28 días de crecimiento con el Medio Basal Bold como control, se puede ver una banda K a los -0.08 mV en el Medio Modificado BoldZnCl₂, también se presenta esta banda K los -0.06 mV en el Medio Modificado BoldZnCl₂ y Medio Modificado BoldsinZnSO₄ (Figura 6.16).

En este caso los valores de la fluorescencia relativa entre el MMBZnCl₂ y MMBsinZnSO₄ son los mismos, así en las gráficas las curvas se superponen. En cuanto al MMBMgCl₂ los valores de fluorescencia relativa son menores a los tratamientos MMBZnCl₂ y MMBsinZnSO₄.

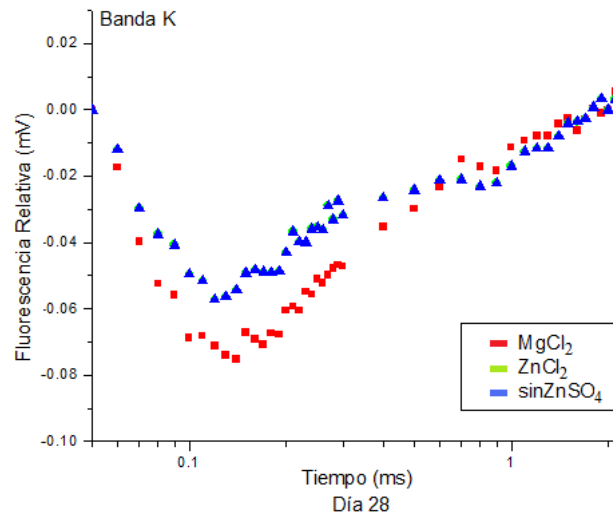


Figura 6.16. Cinética de la fluorescencia variable relativa de la clorofila a en *S. acutus* en 28 días de crecimiento. Se muestran las diferencias entre los medios MMBMgCl₂, MMBZnCl₂, MMBsinZnSO₄, cuando el medio control es el Medio Basal Bold, se muestra la presencia de la banda K.

7. DISCUSIÓN

7.1. CRECIMIENTO DE *Scenedesmus acutus*

Las curvas de crecimiento para los distintos medios de cultivo; MBB, MMBMgCl₂, MMBZnCl₂ y MMBsinZnSO₄ obtenidas a través del método de absorbancia, demuestran que no hay una diferencia significativa (Figura 6.3), lo que representa la existencia de una interacción entre el medio de cultivo, tiempo y crecimiento del microorganismo con respecto a la densidad celular de *S. acutus*.

Una manera indirecta en la cual se observó que los tres medios de cultivo modificados (MMBMgCl₂, MMBZnCl₂ y MMBsinZnSO₄) presentan el mismo efecto en el crecimiento de *S. acutus* fue a través de la coloración de los cultivos, logrando un tono verde bandera para los cuatro casos en los que fue cultivado el microorganismo, este factor indica que las moléculas de clorofila se encuentran en buen estado, llevando a acabo la absorción de la energía lumínica que será convertida y utilizada en energía química en la cascada de electrones de los fotosistemas II y I (Larkum *et al.*, 2003).

En cuanto a la velocidad de crecimiento y la tasa generacional de *S. acutus* obtenidas a través de la técnica del número de organismos por mililitros mediante la tinción de DAPI, se tiene una interacción casi total, con una diferencia del 0.01% entre los cuatro medios de cultivo (Tabla 6.1).

En base a los resultados anteriores, se puede decir que, el proceso fotosintético donde el flujo de electrones que pasa por los fotosistemas hasta la reducción del NADPH, como fuente de energía y poder reductor en la transformación de CO₂ en almidón y la producción de ATP como fuente energética que sostiene los proceso metabólicos de la célula (Lodish *et al.*, 2005), no se encuentran afectados, de manera que el crecimiento y reproducción celular se llevan a cabo sin alteración alguna.

En trabajos realizados bajo la metodología de sustitución de compuestos azufrados, y sólo enfocados en MgSO₄-7H₂O por MgCl₂-6H₂O en la generación de hidrógeno

(Laurinavichene *et. al.*, 2002), no se reportan variaciones o modificaciones que puedan afectar el funcionamiento metabólico de las microalgas verdes.

Así, con la sustitución del macroelemento $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ por $MgCl_2$ (Dante 2005; Melis *et al.*, 2006), metodología empleada en proyectos sobre la generación de H_2 (Das *et al.*, 2008), la sustitución adicional del microelemento $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ por $ZnCl_2$, y la completa eliminación del microelemento $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$, se considera que estos medios de cultivo pueden ser empleados como sustratos para *S. acutus*.

En este sentido, los medios de cultivo modificados, carentes de compuestos azufrados propuestos para el presente trabajo presentan características óptimas en coloración, densidad, crecimiento y reproducción celular en la cepa de *Scenedesmus acutus* con respecto al Medio Basal Bold, estos criterios no son incluidos o mencionados en investigaciones sobre la producción de hidrógeno como un combustible renovable a partir de organismos fotosintéticos (Kosourov *et. al.*, 2007; Ust'ak *et al.*, 2007; Esper *et al.*, 2006; Ghirardi *et al.*, 2000).

7.2. CRECIMIENTO DE *Rhodobacter sphaeroides*

Las cinéticas de crecimientos de la bacteria púrpura no del azufre no presentan variaciones cuando se cultiva en Medio Sistrof's y Medio Sistrof's Modificado. La carencia de compuestos nitrogenados en los medios no afecta las fases del crecimiento, estas se encuentran claramente definidas para ambos medios de cultivo (0-6 hrs; latencia, 8-14 hrs; exponencial y 15-32 hrs; estacionaria).

Los ensayos realizados con respecto a la determinación del número de organismos por mililitro (efectuados a través de la tinción de DAPI) demuestran por ende, que la velocidad de crecimiento y la tasa generacional permanecen en el mismo periodo de tiempo para los dos medios de cultivo probados en *R. sphaeroides* (Tabla 6.2), esto explica que el transporte de electrones en el P780 produce un gradiente de protones en la membrana, generando la síntesis de ATP (White, 2000) que será utilizado en los requerimientos metabólicos para el crecimiento y reproducción de la bacteria.

Con la eliminación de compuestos nitrogenados en el Medio Modificado Sitrom's como el sulfato de amonio $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, que funciona como un donador de electrones en el proceso fotosintético de *R. sphaeroides* (Staley y Bryant, 1989) y considerando los datos obtenidos, se puede decir que la bacteria púrpura no del azufre, flexible en su metabolismo (Koku *et al.*, 2002), utiliza como donador de electrones uno o varios compuestos orgánicos contenidos en el medio de cultivo modificado, que probablemente sea; el ácido succínico, el ácido glutámico, o bien, el ácido aspártico.

A partir de los resultados de la dinámica de crecimiento, se apoya experimentalmente la teoría acerca del uso de medios de cultivos modificados, donde se utiliza a *R. sphaeroides* en la generación del hidrógeno. La supresión de compuestos nitrogenados enfocada a la síntesis de la nitrogenasa encargada de la reducción de protones a hidrógeno (Miyake *et al.*, 1987; Nakada *et al.*, 1999; Koku *et al.*, 2002) no constituye un factor que promueva o inhiba el desarrollo de la bacteria fotosintética.

7.3. EFICIENCIA FOTOSINTÉTICA EN *Scenedesmus acutus*

En el desprendimiento de oxígeno por la microalga verde, las mediciones muestran un incremento del 13% para el Medio Modificado BoldMgCl₂ en comparación con el Medio Basal Bold (Figura 6.7), estos resultados no significan que el medio modificado promueva la producción del oxígeno o que la supresión de los compuestos azufrados no tenga un efecto sobre la producción del oxígeno, más bien este incremento puede ser explicado por una mayor cantidad de células en el medio (a pesar de que las muestras fueron tomadas con la misma densidad poblacional para el día 14, ver anexo...) lo cual provoca se tenga una mayor producción fotosintética, según los datos comparados con los otros dos medios de cultivo (MMBZnCl₂ y MMBsinZnSO₄) probados.

El efecto en la supresión del oxígeno presenta una relación linear entre el Medio Basal bold en comparación con el Medio Modificado BoldZnCl₂ en un 20% y el Medio Modificado BoldsinZnSO₄, en un 40% (Figura 6.8), estos resultados pueden indicar que el complejo de escisión del agua se encuentra desacoplado debido a la ausencia de azufre en el medio. Este mineral, constituyente de la cisteína forma parte de una proteína extrínseca llamada PsbO (nombrada también OEC33, debido a su aparente peso molecular de 33kDa),

encargada de proteger al grupo de cuatro manganesos en el sitio de separación de la molécula del agua en el esquema Yz. PsbO junto con otras proteínas extrínsecas forman una barrera contra especies de alto poder reductor en el sitio de $Mn_3Ca^{2+}Mn$ (Barber J., 2006), al debilitar o romper esta barrera se ocasiona que el ciclo productor de oxígeno y donador de electrones disminuya.

A su vez, PsbO estabiliza la interacción entre la clorofila de unión CP43 y la proteína D1, encargada de dirigir los electrones provenientes del agua hacia el centro de reacción del PSII (Anderson *et al.*, 2002), al no participar PsbO en la interacción del sitio de $Mn_3Ca^{2+}Mn$ y la clorofila de unión CP43 con la proteína D1 se inhibe la producción de oxígeno.

Los resultados de la figura 6.8 demuestran que el complejo productor de oxígeno no se encuentra totalmente desacoplado, en este sentido, los datos obtenidos sugieren que posiblemente otras proteínas extrínsecas llamadas PsbV y PsbU (Ifuku *et al.*, 2004) mantienen y estabilizan la interacción entre el sitio $Mn_3Ca^{2+}Mn$ y la proteína D1, garantizando el transporte de electrones junto con el poco oxígeno producido.

7.4. EFICIENCIA RESPIRATORIA EN *Scenedesmus acutus*

Los datos en la figura 6.8 muestran que no hay consumo de oxígeno por parte de *Scenedesmus acutus* cuando crece en el Medio Modificado BoldMgCl₂ y Medio Modificado BoldZnCl₂, lo cual puede indicar la ausencia de oxígeno disponible para el proceso de respiración. La fijación de CO₂ utiliza ATP y NADPH para formar triosas fosfatos que se condensan en hexosas fosfato y se polimerizan dando lugar al almidón que se almacenará en el cloroplasto (Lehninger *et al.*, 2005). De forma alternativa, las triosas fosfato pasan por el citosol vía un cotransporte antiparalelo para ser utilizadas como precursoras de síntesis de sacarosa. Sin oxígeno durante la respiración, la fijación del CO₂ es predominante sobre la condensación del O₂ por la ribulosa 1,5-bisfosfato con actividad de oxigenasa (Shelp y Canvin 1981). De este modo, la rubisco es capaz de fijar todo el CO₂ presente en el medio para fabricar las hexosas, proporcionando energía en la oscuridad.

Para el Medio Modificado BoldsinZnSO₄ se tiene un 33 % menos en el consumo de oxígeno con respecto al Medio Basal Bold en *Scenedesmus acutus*. Este oxígeno consumido es

condensado por la ribulosa 1,5-bisfosfato en la ruta de recuperación del fosfoglicolato, que será convertido en serina.

La serina se convierte en glicerato para ser fosforilado incorporándose de nuevo al ciclo de calvín. Durante la fotorespiración se consume oxígeno tres veces y la liberación de CO₂ (Radmer y Ollinger, 1980). Esta recuperación también asegura la nueva síntesis de compuestos como la sacarosa y el almidón que proporcionarían energía durante los procesos bioquímicos que constituyen a la microalga verde.

7.5. FLUORESCENCIA *in vivo* DE LA CLOROFILA “a” EN *Scenedesmus acutus*

Un incremento en el paso O (figura 6.9) está presente en los cuatro ensayos realizados, a partir de la primera hasta la cuarta semana de crecimiento. Este aumento en la fase de O representa que los tres medios de cultivos modificados tienen un efecto de desacople del complejo de escisión del agua, debido a que el flujo de electrones por el centro de reacción es menor al compararlo con el medio de cultivo control. La excitación del centro de reacción deja un hueco electrónico en el PSII que es cubierto por electrones provenientes del agua (Lodish *et al.*, 2005), si este flujo electrónico tiene una baja eficiencia, es el fotosistema I quien regula este flujo hacia la reducción del NADPH y en el caso de la generación de hidrógeno, los electrones están enfocados en reducir a la hidrogenasa, presente en condiciones anaerobias.

El efecto observado anteriormente se sostiene también en la premisa de acuerdo con el concepto de agrupamiento (“grouping”) en la prueba de JIP (Strasser *et al.*, 2004), donde la presencia de una banda L positiva en los días 7 y 21 del crecimiento de *S. acutus* en el Medio Modificado BoldZnCl₂ y Medio Modificado BoldsinZnSO₄ implica que las unidades del PSII se encuentran menos agrupadas, o que menos energía está siendo intercambiada entre unidades del PSII, debido a que la conformación de agrupamiento es más estable que la conformación desagrupada (Strasser *et al.*, 2005), el decremento en la cooperatividad significa que las unidades del PSII en MMBsinZnSO₄ han de perder más estabilidad y llegan a ser más frágiles que en el MMBZnCl₂ (Figura 6.14 y 15.6), sin embargo, la energía de excitación no disminuye y es capaz de llegar al centro de reacción del PSII y PSI. La baja cooperatividad entre las antenas y los centros de reacción provoca un decremento en el flujo de electrones provenientes del agua.

La supresión de azufre a los 7 y 14 días de crecimiento sugiere una adaptación por parte de *S. actus* a los medios de cultivo modificados. Las fases que componen las curvas OJIP demuestran un aumento en el paso de O a J del Medio Modificado BoldZnCl₂ y Medio Modificado BoldsinZnSO₄.

La fase O-J es la reducción del lado aceptor del PSII, es decir, la acumulación de la forma reducida de Q_A (Lazár, 1999), que por ende da lugar al cierre de los centros de reacción y la reducción de Q_B por los dos electrones transferidos por Q_A. El incremento en el parámetro fotosintético de V_i indica que la ausencia del azufre inhibe sobre el lado aceptor del fotosistema II, lo que se puede considerar como un cambio relativo en la proporción de Q_B⁻ no reducidas. V_j sugiere que las unidades del fotosistema II no se encuentran conectados entre si y expresa la proporción del número total de centros de reacción que puedan estar cerrados (Jian *et al.*, 2008).

El decremento de todos los centros de reacción activos es considerado como un mecanismo de baja regulación para disipar de forma controlada el exceso de luz absorbida (Force *et al.*, 2003). Por lo tanto, el fotosistema II cambia de un proceso que convierte la energía lumínica en energía de almacenamiento a un proceso de conversión de energía que transforma la luz absorbida en disipación de calor.

Para MMBZnCl₂, los parámetros fotosintéticos que se encuentran afectados a este nivel son el flujo de absorción mediante el centro de reacción (**ABS/RC**), el flujo de electrones por el centro de reacción (**ETo/RC**) y la energía disipada por el centro de reacción (**DIo/RC**), en este sentido, el fotosistema II tiene una baja eficiencia del transporte de electrones, para compensar la demanda electrónica es necesario se aumente la absorción de energía por la densidad de centros de reacción (**PI/ABS**), sin embargo, la eficiencia por el cual un electrón puede moverse hacia los aceptores finales del fotosistema I (**ΔR**) también se encuentra afectada por el incremento del paso J-I (figura 6.9a).

En MMBsinZnSO₄ se absorbe un 25 % menos de energía que pasa a los centros reacción activos, al haber menor cantidad de energía esta debe ser utilizada principalmente a la reducción del P680⁺, por lo que existe muy poca energía que pueda ser disipada en forma de calor y/o fluorescencia (Maxwell y Johnson, 2000). En este caso, se observa una baja

eficiencia ($40\% < \text{MBB}$ y $20\% > \text{MMBZnCl}_2$) en la transferencia de electrones desde el PSII al PSI causada por un incremento en la fase J-I (Figura 6.9a).

El área por arriba de la fase J-I que se observa del día 7, 14 y 21 (Figura 6.9) puede ser proporcional a un menor número de electrones que se requieren para la reducción del almacén de plastoquinonas (Strasser, 1997), que forman un búfer entre el fotosistema II y el resto de la cadena transportadora de electrones.

Los resultados indican que para la segunda semana del crecimiento de la microalga verde son menos los parámetros fotosintéticos que se ven afectados por la ausencia y eliminación de los compuestos azufrados. Para el Medio Modificado BoldsinZnSO₄ el índice fotosintético (PI) está disminuido un 25% en comparación con el Medio Basal Bold (Figura 6.10b y 6.13). PI es sensible a los cambios en cualquiera de las propiedades de la antena, como la eficiencia en atrapar los electrones o el transporte más allá de Q_A (Genty *et al.*, 1989). El decremento en el índice fotosintético en respuesta a la ausencia de azufre en el medio de cultivo es debido principalmente a la disminución en la eficiencia fotoquímica del transporte de electrones en *S. acutus* en MMBsinZnSO₄. Como el índice fotosintético disminuye, entonces la energía de absorción (ABS/RC), la captura de electrones (TRo/RC) y el transporte (ETo/RC) también decrece (Samson *et al.*, 1999), por lo que sugiere menor tamaño de la antena y de la actividad fotosintética por unidad de centro de reacción.

En Medio Modificado BoldZnCl₂ se tiene una mayor actividad fotosintética, en parte por el aumento en el tamaño de la antena, cuando se compara con el Medio Modificado BoldsinZnSO₄ (Figura 6.10b), por lo que también se ve beneficiada la captura y el transporte de electrones, el parámetro que se encuentra afectado es la eficiencia del electrón para llegar a los aceptores del fotosistema I. Esto implica que a las 2 semanas de crecimiento de *S. acutus* se tiene un mejor acondicionamiento por el MMBZnCl₂, que se refleja en la estabilidad del fotosistema II, sin embargo existe un daño a nivel del fotosistema I.

Se presenta una banda K a los 21 y 28 días de crecimiento en *Scenedesmus acutus*, siendo más pronunciada para el Medio Modificado BoldsinZnSO₄ que para el Medio Modificado BoldZnCl₂ en la tercera semana y en ambos medios de cultivo propuestos para la cuarta semana (Figura 6.15a y 6.16).

Esta banda K explica un desequilibrio dentro del fotosistema II, entre los electrones que abandonan los centros de reacción hacia el lado aceptor y los electrones donados por el lado donador (Aksmann y Tukaj, 2008), hecho que también se ha relacionado con la inhibición en el transporte de electrones del agua hacia el segundo donador de electrones del fotosistema II (Yz), resultado de una disociación del complejo productor de oxígeno debido a una liberación del Mn (Strasser, 1997).

El Medio Modificado BoldZnCl₂ a los 21 días de crecimiento presenta una mayor eficiencia en el proceso fotosintético, el incremento del 20% en el índice fotosintético, aprovecha la energía de absorción y es enfocada hacia la actividad fotosintética, por lo que se presenta un 20% menos de energía disipada en forma de calor o fluorescencia en comparación con el Medio Modificado BoldsinZnSO₄ (Figura 6.11c).

La cuarta semana de crecimiento, donde se comparan los tres medios de cultivo modificados con el Medio Basal Bold (Figura 6.15), se observa una deficiencia en los parámetros del índice fotosintético y las constantes fotosintéticas (Kn, Kp y Sum K), que implica un decremento en la eficiencia de la fase luminosa en el proceso fotosintético (también explicado por la presencia de la banda K y el incremento en la fase de O-J), sin embargo, el tamaño de la antena, semejante al medio control, hace que la energía de absorción por la baja densidad de los centros de reacción (PI) estabilice la captura y el transporte de electrones para concluir con el proceso fotosintético, asegurando el crecimiento y reproducción de *Scenedesmus acutus*.

En la tercera y cuarta semana de crecimiento de la microalga verde se observa un acondicionamiento por los medios de cultivo modificados, según las curvas I-P de la prueba de JIP. La fase de I-P depende sobre el fotosistema I y representa la actividad de en la reducción de la ferredoxina en presencia de la reductasa inactiva Ferredoxina-NADP⁺ (Joshi y Mohanty, 1995). En este sentido, se considera entonces la recuperación en la conectividad entre el PS II y el PS I.

A pesar de que aún existe una disminución en la eficiencia del PSII (dada por el incremento en la fase de O-J), los parámetros fotosintéticos que dan cuenta del estado de la energía absorbida, la captura de electrones, el flujo de electrones por el centro de reacción y el

tamaño de la antena se notan mejorados y toman valores incluso por arriba al medio control, por lo que se sugiere que la actividad de los centros de reacción en la transferencia de electrones a través de los fotosistemas es autorregulada y la cadena redox del PSII en *S. acutus* no es afectada de manera negativa por la supresión de azufre en los medios de cultivos probados, por lo que se garantiza la producción de energía en forma de ATP, el flujo de electrones capaz de reducir a la hidrogenasa, formando el hidrógeno atmosférico, o bien, la reducción del NADPH para la síntesis de sacarosa y almidón.

8. CONCLUSIONES

Desarrollo y elaboración de una metodología que permitió dilucidar el efecto de la supresión de compuestos azufrados en el crecimiento de *Scenedesmus acutus* en la generación de hidrógeno como un combustible alternativo.

La eliminación de compuestos nitrogenados en el Medio Modificado Sistrom's no inhibe el crecimiento y reproducción de *Rhodobacter sphaeroides*.

Se comprobó que el efecto de los medios modificados; MMBMgCl₂, MMBZnCl₂ y MMBsinZnSO₄ no alteran el crecimiento y reproducción de *Scenedesmus acutus*.

La eficiencia fotosintética como desprendimiento de oxígeno en *Scenedesmus acutus* es afectada en un 20% con MMBZnCl₂ y un 40% en MMBsinZnSO₄.

El sustrato MMBsinZnSO₄ presenta un decremento del 33.33% en la eficiencia respiratoria, mientras que en MMBMgCl₂ y MMBZnCl₂ no hubo consumo de oxígeno.

En las cuatro semanas de crecimiento de *Scenedesmus actus* la supresión de azufre en los medios de cultivos desacopla el complejo de escisión del agua y reduce la eficiencia del fotosistema II.

La conectividad entre el fotosistema II y el fotosistema I se ve afectada en las dos primeras semanas de crecimiento de *Scenedesmus acutus* con los tres medios de cultivos modificados.

Hay una recuperación en el tamaño de la antena, la captura y el transporte de electrones a través de los fotosistemas II y I en la tercera y cuarta semana.

Se determinó que a los 21 días de crecimiento de *Scenedesmus acutus*, el medio de cultivo MMBZnCl₂ muestra ser el mejor sustrato selectivo en la generación de hidrógeno.

La viabilidad del proceso fotosintético en la generación de hidrógeno esta representa por el transporte de electrones, que no es afectado por la supresión de azufre en los medios de cultivos modificados probados a las tres semanas de crecimiento en *S. acutus*.

Los resultados obtenidos proporcionan información acerca del efecto en la supresión de compuestos azufrados sobre el proceso fotosintético en el uso de la generación de biocombustibles.

9. BIBLIOGRAFÍA

- Akkerman I. y M Janssen. 2002. Photobiological hydrogen production: photochemical efficiency and bioreactor design, *Journal of Hydrogen Energy*. **27**: 1195-1208.
- Aksmann A. y Z. Tukaj. 2008. Intact anthracene inhibits photosynthesis in algal cells: A fluorescence induction study on *Chlamydomonas reinhardtii* cw92 strain. *Chemosphere*. **74**; 26-32.
- Alberts B., D. Bray y J. Lewis. 1996. **Biología molecular de la célula**. Ediciones Omega. Barcelona, España. 1326 pp.
- Atlas R. 2001. **Principles of microbiology**. Mosby editions. New York. 1298 pp.
- Anderson B., M. Maderia, A. Ouellette. 2002. Posttranslational modifications in the CP43 subunit of photosystem II, *PNAS*. Vol: 99. **23**: 676-681.
- Appel J. y R. Schulz. 1998. Hydrogen metabolism in organisms with oxygenic photosynthesis: hydrogenases as important regulatory devices for a proper redox poisoning? *Journal of Photochemistry and Photobiology*. **47**: 1-11.
- Barber J. 2006. Photosystem II: an enzyme of global significance. *Biochemical Society*. **34**: 619-631.
- Butler W. 1978. Energy distribution in the photochemical apparatus of photosynthesis. *Annual Review Plant Physiology*. **29**: 345-378.
- Cammack R. y M. Frey 2001. **Hydrogen as a fuel: learning from nature**. Taylor and Francis editions. New York. 267 pp.
- Curtis H. y S. Barnes. 2000. **Biología**. 6^{ta} edición. Ediciones Medica Panamericana. Buenos Aires. 1426 pp.
- Das D. y N. Veziroglu. 2001. Hydrogen production by biological processes: a survey of literature. *International Journal of Hydrogen Energy*. **26**: 13-28.
- Das D. y N. Veziroglu. 2008. Advances in biological hydrogen production processes. *International Journal of Hydrogen Energy*. **33**: 6046-6057.
- Dau H. 1994. Molecular mechanisms and quantitative models of variable photosystem II fluorescence. *Photochemical Photobiology*. **60**: 1-23
- Dewez D., D. Olivier, J. Héroux y R. Popovic. 2008. Validation of photosynthetic fluorescence parameters as biomarkers for isoproturon toxic effect on alga *Scenedesmus obliquus*. *Environmental Pollution*. **151**: 93-100.
- Eroglu I., A. Tabanoglu y U. Gunduz. 2008. Hydrogen production by *Rhodobacter sphaeroides* O.U.001 in a flat plate solar bioreactor. *International Journal of Hydrogen Energy*. **33**: 531-541.
- Eroglu I., K. Aslan, U. Gündüz, M. Yücel y L.Türker. 1999. Substrate consumption rates for hydrogen production by *Rhodobacter sphaeroides* in a column photobioreactor. *Journal Biotechnology*. **70**: 103-113.
- Esper B., A. Badura y M. Rogner. 2006. Photosynthesis as a power supply for biohydrogen production. *Trends in Plant Science*. **11**: 543-549.
- Force L., C. Critchley y V. Rensen. 2003. New fluorescence parameters for monitoring photosynthesis in plants. *Photosynthesis Research*. **78**: 17-33.
- Gaffron H. y J. Rubin. 1942. Fermentative and photochemical production of hydrogen in algae. *Journal General Physiology*: **26**: 219-240.

- Garrity M., M. Winter y B. Seaeles. 2001. **Bergey's manual of systematic bacteriology**. 2nd edition. Springer-Verlag editions. New York. 787 pp.
- Genty B., J. Briantais y N. Baker. 1989. The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence. *Biochimica et Biophysica Acta*. **990**; 87-92.
- Guissé B., A. Srivastava, y R. Strasser. 1995. The polyphasic rise of the chlorophyll a fluorescence (O-K-J-I-P) in heat stressed leaves. *Archives Sciences*. Genève **48**: 147-160.
- Hallen P. y J. Benemann. 2002. Biological hydrogen production: fundamentals and limiting processes. *International Journal of Hydrogen Energy*. **27**: 1185-1193.
- Happe T., A. Hemschemeir., M. Winkler y A. Kaminski. 2002. Hydrogenases in green algae: do they save the algae's life and solve our energy problems?. *Trends in Plant Science*. **7**: 246-250
- Harley P. y M. Prescott. 2004. **Microbiología**. 5^{ta} edición. Mc Graw Hill. España. 1413 pp.
- Hawkes F., R. Dinsdale, D. Hawkes e I. Hussey. 2002. Sustainable fermentative hydrogen production: challenges for process optimization. *International Association for Hydrogen Energy*, **27**: 1339-1347.
- Ifuku K., T. Nakatsu, H. Kato y F. Sato. 2004. Crystal structure of the PsbP protein of photosystem II from *Nicotiana tabacum*. *European Molecular Biology Organization*. **4**: 362-367.
- Jian H., L.Chen, J. Jiang y S. Han. 2008. Aluminum-induced effects on Photosystem II photochemistry in Citrus leaves assessed by the chlorophyll a fluorescence transient. *Tree Physiology*. **28**: 1863-1871.
- Johnston B., M. Mayo y A. Khare. 2004. Hydrogen: the energy source for the 21st century. *Technovation* **25**: 569-585.
- Joshi M. y P. Mohanty 1995. Probing photosynthetic performance by chlorophyll a fluorescence: Analysis and interpretation of fluorescence parameters. *Journal of Scientific and Industrial Research*. **54**: 155-174.
- Koku H., I. Eroglu, U. Gunduz y M. Yucel. 2002. Aspects of the metabolism of hydrogen production by *Rhodobacter sphaeroides*. *International Journal of Hydrogen Energy*. **27**: 1315-1329.
- Kosourov S., E. Patrusheva y L. Ghirardi. 2007. A comparison of hydrogen photoproduction by sulfur-deprived *Chlamydomonas reinhardtii* under different growth conditions. *Journal of Biotechnology*. **128**: 776-787.
- Krause G. y E. Weis. 1991. Chlorophyll fluorescence and photosynthesis: the basics. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, **42**: 313-349.
- Kruse O., J. Rupprecht y H. Mussgnug. 2005. Photosynthesis: a blueprint for solar energy capture and biohydrogen production technologies. *Photochemical and Photobiological Sciences*. **4**: 957-970.
- Larkum W., E. Douglas y A. Raven. 2003. **Advances in photosynthesis and respiration. photosintesis in algae**. Vol. 14. Kluwer Academic Publishers. London. 456 pp.
- Lazár D. 1999. Chlorophyll a fluorescence induction. *Biochimica et Biophysica Acta*. **1412**: 1-28.
- Lehninger A., D. Nelson, M.Cox. 2005. Principios de Bioquímica. 4ta edición. *Ediciones Omega*. Barcelona. 1013pp.
- Levin D., L Pitt y M. Love. 2004. Biohydrogen production: prospects and limitations to practical application. *International Journal of Hydrogen Energy*, **29**: 173-185
- Lodish H., A. Berk y S. Lawrence. 2005. **Biología celular y molecular**. 5ta. edición. Editorial Médica Panamericana. España. 1081 pp.

- Margalith P. 1992. **Pigment microbiology**. Ediciones Chapman y Hall . London. 156 pp.
- Martens R. y A. Liese. 2004. Biotechnological applications of hydrogenases. *Current Opinion in Biotechnology*, **15**:343–348.
- Maxwell K. y G. Johnson. 2000. Chlorophyll fluorescence; a practical guide. *Journal of Experimental Botany*. **51**: 659-668.
- Melis A. 2002. Green alga hydrogen production: progress, challenges and prospects. *Journal of Hydrogen Energy*. **27**: 1217-1228.
- Melis A. y T. Happe. 2001. Hydrogen production. Green algae as a source of energy. *Plant Physiology*. **127**: 740-748.
- Miura Y., T. Akano y K. Fukatsu. 1995. Hydrogen production by photosynthetic microorganisms. *Energy Conversion and Management*. **36**: 903-906.
- Miyake J. y S. Kawamura. 1987. Efficiency of light energy conversion to hydrogen by photosynthetic bacterium *Rhodobacter sphaeroides*. *International Journal Hydrogen Energy*. **12**: 147-149.
- Momirlan M. y N. Veziroglu. 2002. Current status of hydrogen energy. *Renew Sustain Energy Review*. **6**: 41–79.
- Nandi R., y S. Sengupta. 1998. Microbial production of hydrogen: an overview. *Critical Reviews in Microbiology*, **24**:61-84.
- Oukarrouma A., S. Madidi, G. Schansker y R. Strasser. 2007. Probing the responses of barley cultivars (*Hordeum vulgare* L.) by chlorophyll a fluorescence OJIP under drought stress and re-watering. *Environmental and Experimental Botany*. **60**: 438-446.
- Paniagua R. y M. Nistal. 1999. **Biología celular**. Mc Graw Hill. México. 361 pp.
- Pares R. y A. Juárez. 1997. **Bioquímica de los microorganismos**. Editorial Reverte. España. 380 pp.
- Pospíšil P. y H. Dau. 2000. Chlorophyll fluorescence transients of Photosystem II membrane particles as a tool for studying photosynthetic oxygen evolution. *Photosynthesis Research*. **65**: 41-52.
- Prince R., y H. Kheshgi. 2005. The Photobiological Production of Hydrogen: Potential Efficiency and Effectiveness as a Renewable Fuel. *Critical Reviews in Microbiology* **31**:19-31.
- Radmen R. y O. Ollinger. 1980. Light-driven Uptake of Oxygen, Carbon Dioxide, and Bicarbonate by the Green Alga *Scenedesmus*. *Plant Physiology*. **65**: 723-729.
- Redwood D., E. Lynne y E. Macaskie. 2006. A two-stage, two-organism process for biohydrogen from glucose. *International Journal of Hydrogen Energy*, **31**: 1514-1521.
- Samson G., O. Prásil y B. Yaakoubd. 1999. Photochemical and thermal phases of chlorophyll a fluorescence. *Photosynthetica*. **37**:163-182.
- Schreiber U., W. Bilger y C. Neubauer. 1995. **Chlorophyll fluorescence as a noninvasive indicator for rapid assessment of in vivo photosynthesis**. In Schulze. E.-D. and Cladwell, M.M. Ecophysiology of Photosynthesis: *Springer-Verlag*, Berlin. 49-70 p.
- Schulten K, 1999. Function, Architecture, and Mechanism of Light-harvesting Systems in Photosynthetic Bacteria. *Physics, UIUC*. **1**: 1-28.
- Shelp B. y D. Canvin. Photorespiration in Air and High CO₂-Grown *Chlorella pyrenoidosa*. *Plant Physiology*, **68**: 1500-1503.
- Srivastava A., B. Guissé H. Greppin y R. Strasser, 1997. Regulation of antenna structure and electron transport in PSII of *Pisum sativum* under elevated temperature probed by the fast polyphasic chlorophyll a fluorescence transient: OKJIP. *Biochemical Biophysics Acta* **1320**: 95-106.

- Srivastava A., G. Greppin y R. Strasser. 1995. The steady-state chlorophyll *a* fluorescence exhibits in vivo an optimum as a function of light intensity which reflects the physiological state of the plant. *Plant Cell Physiology*. **36**: 839-848.
- Staley T. y P. Bryant. 1989. **Bergey's manual of systematic bacteriology**. Vol. 3. Board editorial. London. 787 pp.
- Stolp H. 1996. **Microbial ecology: organisms, habitats, activities**. Syndicates of the University of Cambridge. Great Britain. 308 pp.
- Strasser B. y R. Strasser. 1998. **Oscillations of the chlorophyll *a* fluorescence related to the States of the oxygen evolving complex**. In: *Garab G.* Photosynthesis: Mechanisms and Effects. *Kluwer Academic Publishers*. The Netherlands. Vol V. pp. 4325-4328.
- Strasser J. 1997. Donor side capacity of Photosystem II probed by chlorophyll *a* fluorescence transients. *Photosynthesis Research*. **52**: 147-155.
- Strasser R. y M. Tsimilli-Michael. 2005. **State-changes realising adaptation to stress as the result of an optimized redistribution of functional microstates**. In: *van Est A, Bruce D.* Photosynthesis: fundamental aspects to global perspectives. Allen, Montreal, 537-540 p.
- Strasser R., A. Srivastava y M. Tsimilli-Michael. 2000 **The fluorescence transient as a tool to characterize and screen photosynthetic samples**. In: *Yunus M, Pathre U, Mohanty P.* Probing photosynthesis: mechanism, regulation and adaptation. Taylor and Francis, London. 443-480 p.
- Tamagnini P., R. Axelsson y P. Lindberg. 2002. Hydrogenases and Hydrogen Metabolism of Cyanobacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. **66**: 1-20.
- Tóth S., G. Schansker y R. Strasser. 2007. A non-invasive assay of the plastoquinone pool redox state based on the OJIP-transient. *Photosynth Res*. **93**: 193-203.
- Tóth S., G. Schansker, G. Garab y R. Strasser. 2007. Photosynthetic electron transport activity in heat-treated barley leaves: The role of internal alternative electron donors to photosystem II. *Biochimica et Biophysica Acta*. **1767**: 295-305.
- Vignais P., A. Colbeau, J. Willison y Y. Jouanneau. 1985. Hydrogenase, nitrogenase and hydrogen metabolism in photosynthetic bacteria. *Advances in Microbial Physiology*. **26**: 154-234.
- Wehr S., R. Sheath. 2005. Freshwater algae of North America; Ecology and Classification. *Academic Press*. California. E.U. 298-299 p.
- White D. 2000. The physiology and biochemistry of prokaryotes. 2da. Edición. Oxford University Press. New York. 565 pp.
- Whitford L. y G. Schumacher. 1984. **A manual of fresh-water algae**. Sparks Press. New York. 337 pp.

ANEXO

I.- Medios de Cultivo para *Scenedesmus acutus*.

Detalle ilustrado de las modificaciones realizadas al Medio Basal Bold, basadas en la sustitución y/o eliminación de los compuestos azufrados. Marcado en rojo, sustitución del micronutriente $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ por $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$. Adicionalmente, en verde, la sustitución del micronutriente $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ por ZnCl_2 , complementando en azul, la eliminación del compuesto $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$.

Medio basal Bold

Enseguida se indica cuáles macroelementos se utilizan para la preparación del medio y la cantidad (expresada en gramos) que debe ser agregada por separado en 400 ml de agua destilada o desionizada.

Na NO ₃	10.0 g
KH ₂ PO ₄	7.0 g
K ₂ HPO ₄	3.0 g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	3.0 g
CaCl ₂ - 2H ₂ O	1.0 g
NaCl	1.0 g

Diez ml de solución de cada macroelemento se emplean para un litro de solución final. Este medio también contiene microelementos que son suministrados de la siguiente forma.

Solución EDTA (ácido etilendiaminotetraacético)
50 g de EDTA y 31 g de KOH que son diluidos en un litro de agua destilada.

Solución H-Fe
4.98 g de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ son diluidos en un litro con agua acidificada, la cual se consigue agregando 1 ml de H_2SO_4 concentrado a 999 ml de agua destilada.

Solución H-Boro
11.42 g de H_3BO_3 que son diluidos en un litro de agua destilada.

Solución H- H5
8.82 g de $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
1.44 g de $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$
0.71 g de MoO_3
1.57 g de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$
0.49 g de $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ diluido en un litro de agua acidificada.

• Un ml de cada solución se agrega a un litro de solución final (Schlichting, 1970).

Figura 1.1. Medio Basal Bold, se muestra las modificaciones realizadas para el crecimiento de *Scenedesmus acutus*.

II.- Medio de Cultivo para *Rhodobacter sphaeroides*.

Detalle ilustrado de la modificación del Medio Sistrof's. Basada en la sustitución del macronutriente $(\text{NH}_4)\text{SO}_4$ por $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, marcado en el recuadro de color rojo, adicionalmente la sustitución de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ por $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, con referencia en el recuadro de color azul.

Reference: Sistrof, W. R. 1962. The kinetics of the synthesis of photopigments in *Rhodospseudomonas sphaeroides*. J. Gen. Microbiol. 28:607-616.

Preparation of 1-liter of 10X medium

Component	Grams	[] in 10X medium
1) K_2HPO_4	34.8	200 mM
-or KH_2PO_4	27.2	200 mM
2) $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	5.0	37.8 mM
or NH_4Cl	1.95	36.4 mM
3) Succinic acid	40.0	340 mM
4) L-Glutamic acid	1.0	6.7 mM
5) L-Aspartic acid	0.4	2.5 mM
6) NaCl	5.0	85 mM
7) Nitritotriacetic acid	2.0	chelates metalions; required for growth
8) $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	3.0	12 mM
or $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	2.44	12 mM
9) $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.334	2.3 mM
10) $\text{FeSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0.020	0.07 mM
11) $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0.002	1.6 μM
or *0.2 ml of 1% solution		
Molibdeno de Ammonia 0.333% → 300 μl / 500 ml		
12) Trace elements solution	1.0 ml	
13) Vitamins solution	1.0 ml	

Bring the above to a total volume of one l with distilled H_2O (pH will be 4.5-4.9) and store frozen.

Figura 2.1. Medio Sistrof's para *Rhodobacter sphaeroides*, se muestra modificaciones realizadas para el cultivo de la bacteria fotosintética.

III.- Curva de crecimiento en *Scenedesmus acutus*.

Valores obtenidos por el espectrofotómetro para *Scenedesmus acutus* en Medio Basal Bold, Medio Modificado BoldMgCl₂, Medio Modificado BoldZnSO₄ y Medio Modificado BoldsinZnSO₄. El crecimiento de la microalga verde es de 7 días en periodos de 12 horas luz, 12 horas oscuridad.

Crecimiento *Scenedesmus acutus*

Absorbancia 680 nm

Inóculo 1/25 ml MBB

Día de incubación	Medición 1	Medición 2	Medición 3	Promedio	Desv. Estandar
Día 0	0.2080	0.2100	0.2110	0.2097	0.0015
Día 1	0.2420	0.2400	0.2440	0.2420	0.0020
Día 2	0.2780	0.2790	0.2790	0.2787	0.0006
Día 3	0.4400	0.4490	0.4470	0.4453	0.0047
Día 4	0.7820	0.7810	0.7810	0.7813	0.0006
Día 5	0.9130	0.9110	0.9130	0.9123	0.0012
Día 6	1.0390	1.0240	1.0290	1.0307	0.0076
Día 7	1.1530	1.1570	1.1600	1.1567	0.0035
Día 8	1.2560	1.2510	1.2530	1.2533	0.0025

Tabla 3.1. Datos de absorbancia de *Scenedesmus acutus* en Medio Basal Bold.

Crecimiento *Scenedesmus acutus*

Absorbancia 680 nm

Inóculo 1/25 ml MMB MgCl₂

Día de incubación	Medición 1	Medición 2	Medición 3	Promedio	Desv. Estandar
Día 0	0.1960	0.1980	0.2000	0.1980	0.0020
Día 1	0.2340	0.2360	0.2350	0.2350	0.0010
Día 2	0.2760	0.2780	0.2790	0.2777	0.0015
Día 3	0.4120	0.4150	0.4100	0.4123	0.0025
Día 4	0.7180	0.7150	0.7170	0.7167	0.0015
Día 5	0.8970	0.9020	0.8990	0.8993	0.0025
Día 6	0.9960	1.0050	1.0030	1.0013	0.0047
Día 7	1.1170	1.1140	1.1130	1.1147	0.0021
Día 8	1.2110	1.2100	1.2130	1.2113	0.0015

Tabla 3.2. Datos de absorbancia de *Scenedesmus acutus* en Medio Modificado BoldMgCl₂.

III.- Curva de crecimiento en *Scenedesmus acutus* - continuación.**Crecimiento *Scenedesmus acutus*****Absorbancia de 680 nm****Inóculo 1/25 MMB ZnCl₂**

Día Incubación	Medición 1	Medición 2	Medición 3	Promedio	Desv.
					Estandar
Día 0	0.1973	0.1982	0.1979	0.1978	0.0005
Día 1	0.2329	0.2333	0.2339	0.2334	0.0005
Día 2	0.2765	0.2783	0.2754	0.2767	0.0015
Día 3	0.4124	0.4118	0.4129	0.4124	0.0006
Día 4	0.7176	0.7168	0.7162	0.7169	0.0007
Día 5	0.8982	0.8971	0.8978	0.8977	0.0006
Día 6	0.9986	0.9998	0.9992	0.9992	0.0006
Día 7	1.1135	1.1145	1.1138	1.1139	0.0005
Día 8	1.2109	1.2114	1.2118	1.2114	0.0005

Tabla 3.3. Datos de absorbancia de *Scenedesmus acutus* en Medio Basal BoldZnSO₄.**Crecimiento *Scenedesmus acutus*****Absorbancia de 680 nm****Inóculo 1/25 MMB sinZnSO₄**

Día Incubación	Medición 1	Medición 2	Medición 3	Promedio	Desv.
					Estandar
Día 0	0.1965	0.1972	0.1975	0.1971	0.0005
Día 1	0.2319	0.2322	0.2317	0.2319	0.0003
Día 2	0.2768	0.2761	0.2773	0.2767	0.0006
Día 3	0.4109	0.4117	0.4112	0.4113	0.0004
Día 4	0.7163	0.7159	0.7165	0.7162	0.0003
Día 5	0.8978	0.8972	0.8981	0.8977	0.0005
Día 6	0.9987	0.9982	0.9979	0.9983	0.0004
Día 7	1.1133	1.1129	1.1137	1.1133	0.0004
Día 8	1.2102	1.2109	1.2111	1.2107	0.0005

Tabla 3.4. Datos de absorbancia de *Scenedesmus acutus* en Medio Basal BoldZnSO₄.

IV. - Curva de crecimiento en *Rhodobacter sphaeroides*

Valores obtenidos por el espectrofotómetro para *Rhodobacter sphaeroides* en Medio Sistrom's y Medio Modificado Sistrom's. El crecimiento de la bacteria fotosintética es de un periodo de 30 horas- luz.

Curva crecimiento <i>Rhodobacter sphaeroides</i> en Medio Sistrom's					
Inoculo 20 µl/1.6 de MS/ 1,6 µl vit.					
Absorbancia 660 nm					
Hora incubación	Medición 1	Medición 2	Medición 3	Promedio	Desviación estandar
0	0.0770	0.0720	0.0740	0.0743	0.0372
2	0.2490	0.2470	0.2480	0.2480	0.0010
4	0.3870	0.3870	0.3930	0.3890	0.0035
6	0.5500	0.5550	0.5530	0.5527	0.0025
8	1.1600	1.1550	1.1570	1.1573	0.0025
10	1.5500	1.5610	1.5650	1.5587	0.0078
12	1.8810	1.8880	1.8910	1.8867	0.0051
14	2.0680	2.0680	2.0960	2.0773	0.0162
16	2.1750	2.1730	2.1720	2.1733	0.0015
18	2.1480	2.1480	2.1020	2.1327	0.0266
20	2.1600	2.1650	2.1680	2.1643	0.0040
22	2.1490	2.1520	2.1540	2.1517	0.0025
24	2.2630	2.2630	2.2660	2.2640	0.0017
26	2.2640	2.2670	2.2680	2.2663	0.0021
28	2.2980	2.2990	2.3010	2.2993	0.0015
30	2.1830	2.1850	2.1820	2.1833	0.0015

Figura 4.1. Tabla de valores obtenidos por el espectrofotómetro para *Rhodobacter sphaeroides* en Medio Sistrom's.

Curva crecimiento <i>R. sphaeroides</i> en Medio Modificado Sistrom's					
Inoculo 20µl/1.6 ml de MMS/1.6 µl de vit.					
Absorbancia 660 nm					
Hora incubación	Medición 1	Medición 2	Medición 3	Promedio	Desviación estandar
0	0.135	0.133	0.137	0.1350	0.0020
2	0.262	0.263	0.262	0.2623	0.0006
4	0.293	0.29	0.298	0.2937	0.0040
6	0.717	0.719	0.722	0.7193	0.0025
8	1.127	1.121	1.124	1.1240	0.0030
10	1.38	1.391	1.387	1.3860	0.0056
12	1.793	1.792	1.804	1.7963	0.0067
14	1.938	1.943	1.945	1.9420	0.0036
16	2.185	2.189	2.185	2.1863	0.0023
18	2.162	2.159	2.164	2.1617	0.0025
20	2.117	2.123	2.12	2.1200	0.0030
22	2.176	2.177	2.178	2.1770	0.0010
24	2.111	2.113	2.112	2.1120	0.0010
26	2.169	2.169	2.173	2.1703	0.0023
28	2.19	2.193	2.193	2.1920	0.0017
30	2.191	2.187	2.185	2.1877	0.0031

Figura 4.2. Tabla de valores obtenidos por el espectrofotómetro para *Rhodobacter sphaeroides* en Medio Modificado Sistrom's.

V.- Datos de la tinción de DAPI para el número total de células por mililitro.

NIKON 6.31E+05 cuadrado 3.56E+04 línea 7.12E+03 cuadrícula 1.74E+03 campo																																			
m	Cel/ml	SD	ml	dilución		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
MS0H	4.90E+06	2.65E+08	1.0	1.0	cua	7	11	13	10	13	8	6	11	12	2	14	14	2	12	9	3	4	13	15	12	10	14	23	12	13	9	5	7	9	12
MS2H	2.43E+07	7.55E+07	5.0	10.0	cua	18	20	14	30	14	24	17	19	16	18	18	20	21	17	25	28	31	19	20	27	12	9	14	16	19	16	12	17	10	10
MS4H	8.30E+07	4.73E+07	10.0	100.0	cua	16	11	9	3	23	27	19	15	16	17	6	14	19	13	17	15	16	9	6	0	8	16	23	18	28	6	5	13	20	7
MS6H	8.97E+08	4.48E+07	10.0	1000.0	cua	18	7	13	19	12	4	9	17	11	19	8	18	5	24	5	8	19	7	23	4	15	7	11	13	20	6	15	11	7	7
MS8H	2.08E+09	8.72E+07	5.0	1000.0	cua	22	17	12	17	6	29	19	22	18	15	14	10	15	17	13	33	23	8	20	13	29	19	14	9	18	13	12	8	18	16
MS10H	9.79E+09	5.60E+07	10.0	10000.0	cua	10	14	10	21	13	25	8	11	16	23	14	6	7	10	8	30	36	16	20	9	6	8	3	30	28	9	22	18	23	22
MS12H	7.37E+10	6.11E+08	1.0	10000.0	cua	18	29	20	0	19	8	21	8	6	13	2	1	23	7	15	13	9	6	21	38	22	10	2	26	1	5	3	12	3	0
MSM0H	4.86E+06	2.47E+08	1.0	1.0	cua	3	7	12	2	9	4	13	3	9	0	15	9	12	3	11	10	10	4	6	14	8	5	3	9	8	8	6	7	8	3
MSM2H	1.17E+07	6.78E+07	5.0	10.0	cua	7	6	4	13	12	17	12	15	10	15	0	12	3	0	14	7	16	6	9	12	10	9	11	14	9	10	15	11	0	9
MSM4H	6.22E+07	2.84E+07	10.0	100.0	cua	5	14	8	4	16	7	9	6	2	5	7	3	15	14	7	17	8	6	4	13	8	14	12	16	6	12	14	7	10	11
MSM6H	5.88E+08	2.24E+07	10.0	1000.0	cua	12	8	10	5	18	8	11	9	14	7	9	10	12	5	6	9	7	4	7	10	11	7	15	4	6	10	4	11	7	13
MSM8H	4.69E+09	2.16E+07	10.0	10000.0	cua	5	7	7	5	11	14	13	13	11	6	8	5	5	12	7	5	11	6	7	6	9	4	9	5	7	2	4	7	5	7
MSM10H	9.65E+09	4.54E+07	5.0	10000.0	cua	3	7	13	10	5	5	8	9	5	2	6	3	14	5	9	6	3	5	9	15	11	3	5	11	10	12	4	9	5	8
MSM12H	7.15E+10	2.97E+08	1.0	10000.0	cua	16	14	4	18	15	5	15	9	19	15	21	16	9	7	13	11	12	9	16	15	9	8	12	10	14	14	19	15	9	5

Figura 5.1. Valores del conteo por tinción con DAPI en *Rhodobacter sphaeroides* en Medio Sistróm's y Medio Modificado Sistróm's

NIKON 6.31E+05 cuadrado 3.56E+04 línea 7.12E+03 cuadrícula 6.31E+03 campo																										
m	Cel/ml	SD	ml	dilución		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21
MBM0C	3.64E+03	7.74E+02	20.0	1.0	carr	17	11	14	22	16	12	9	8	8	8	23	11	3	2	13	9	6	5	15	8	
MBM1D	7.39E+03	1.57E+03	10.0	1.0	carr	10	27	11	10	9	6	11	6	9	2	3	15	8	7	22	14	4	18	16	15	
MBM2D	2.97E+04	6.33E+03	10.0	3.0	carr	21	7	37	15	10	15	4	9	7	14	11	31	16	8	21	27	11	20	11	4	
MBM3D	6.03E+04	1.28E+04	10.0	5.0	carr	6	12	30	22	12	4	16	34	29	26	10	3	12	14	34	36	3	16	28	17	
MBM4D	7.49E+05	1.60E+05	10.0	50.0	carr	26	20	35	29	24	18	32	20	16	12	24	14	23	27	17	25	23	32	12	23	
MBM5D	1.52E+06	3.25E+05	10.0	100.0	carr	28	18	22	26	19	32	20	18	29	24	28	23	27	36	18	24	12	18	15	23	
MBM6D	7.62E+06	1.62E+06	10.0	500.0	carr	19	22	14	18	22	27	31	24	17	27	32	16	23	24	13	32	18	27	23	31	
MBM7D	1.58E+07	3.36E+06	10.0	1000.0	carr	44	20	33	36	24	32	12	28	33	27	21	19	18	28	12	16	19	18	22	14	
MB0D	3.66E+03	7.78E+02	20.0	1.0	carr	15	13	7	8	13	15	4	9	8	11	13	14	21	14	12	7	9	6	10	12	
MB1D	7.45E+03	1.59E+03	10.0	1.0	carr	9	12	14	8	14	16	8	10	17	15	7	9	12	18	15	11	3	4	13	10	
MB2D	2.99E+04	6.37E+03	10.0	3.0	carr	14	18	12	21	15	9	5	25	11	17	15	16	12	24	16	14	23	19	9	6	
MB3D	6.09E+04	1.30E+04	10.0	5.0	carr	14	13	24	35	12	10	27	23	26	18	16	32	13	18	25	21	13	11	9	8	
MB4D	7.32E+05	1.56E+05	10.0	50.0	carr	20	37	22	18	27	24	28	21	19	31	17	24	19	20	15	18	25	21	13	23	
MB5D	1.49E+06	3.17E+05	10.0	100.0	carr	17	23	18	20	31	21	18	27	23	28	25	23	24	19	24	21	27	18	15	27	
MB6D	7.40E+06	1.58E+06	10.0	500.0	carr	21	16	19	26	21	18	27	25	29	34	15	19	25	21	20	18	16	26	32	19	
MB7D	1.55E+07	3.30E+06	10.0	1000.0	carr	18	28	21	32	16	19	17	25	29	35	21	17	24	30	15	18	28	31	25	18	

Figura 5.2. Valores del conteo por tinción con DAPI en *Scenedesmus acutus* en Medio Basal Bold y Medio Modificado BoldMgCl₂

			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35				
NIKON	6.31E+05	cuadrito																																							
	3.56E+04	línea																																							
	7.12E+03	cuadrícula																																							
<i>Scenedesmus acutus</i>	6.31E+03	campo																																							
m	Cel/ml	SD	ml	dilución																																					
MMB ZnCl ₂ 0D	3.61E+03	1.52E+07	20.0	1.0	campo	9	12	14	10	9	15	10	8	8	14	4	5	6	10	12	9	4	3	3	5	4	12	23	13	9	21	15	17	10	9	10	11	13	14	16	
MMB ZnCl ₂ 1D	7.34E+03	2.41E+07	10.0	1.0	campo	10	3	16	13	5	11	12	6	14	9	15	11	10	15	7	18	16	15	5	14	16	14	10	9	10	12	10	9	8	15	6	10	13	13	16	
MMB ZnCl ₂ 2D	2.97E+04	1.70E+07	10.0	3.0	campo	19	14	17	12	16	19	18	17	15	11	19	17	16	10	17	13	15	18	15	15	14	14	18	17	12	12	16	12	16	16	18	14	13	10	15	
MMB ZnCl ₂ 3D	6.01E+04	2.55E+07	10.0	5.0	campo	12	18	14	15	16	16	22	28	21	17	14	24	19	17	11	21	19	17	19	19	30	25	15	21	17	20	23	21	17	14	15	16	26	18	17	
MMB ZnCl ₂ 4D	7.46E+05	2.51E+07	10.0	50.0	campo	21	20	19	23	18	29	21	15	25	24	25	23	21	24	21	25	20	24	19	26	28	24	21	17	20	21	24	23	27	26	21	28	25	28	21	
MMB ZnCl ₂ 5D	1.51E+06	2.97E+07	10.0	100.0	campo	25	18	22	26	19	29	20	18	29	24	28	22	27	34	18	24	30	18	15	23	25	14	18	28	15	21	30	19	14	23	24	19	25	18	24	
MMB ZnCl ₂ 6D	7.60E+06	3.19E+07	10.0	500.0	campo	19	22	14	18	22	27	31	23	17	27	32	19	23	24	16	32	22	27	23	31	27	20	21	18	18	18	16	19	26	23	23	26	25	23	19	
MMB ZnCl ₂ 7D	1.56E+07	3.43E+07	10.0	1000.0	campo	39	23	30	27	28	24	20	25	26	25	23	28	31	26	19	18	21	23	22	17	21	19	17	24	26	32	18	15	19	21	27	25	19	26	33	
MMBsin ZnSO ₄ 0D	3.59E+03	1.03E+07	20.0	1.0	campo	12	14	14	12	9	7	9	12	16	14	13	10	8	5	9	10	11	9	7	9	12	15	6	9	8	11	13	17	10	9	14	10	11	15	13	
MMBsin ZnSO ₄ 1D	7.34E+03	1.34E+07	10.0	1.0	campo	10	12	10	9	11	8	14	11	12	10	11	14	9	9	7	12	14	12	10	11	9	10	13	11	10	9	8	11	12	10	9	12	13	15	14	
MMBsin ZnSO ₄ 2D	2.95E+04	1.30E+07	10.0	3.0	campo	14	15	12	13	16	14	11	15	12	14	16	17	14	18	13	18	14	16	17	18	14	15	14	12	14	12	14	16	14	13	17	16	17	13	17	
MMBsin ZnSO ₄ 3D	6.01E+04	1.71E+07	10.0	5.0	campo	21	18	15	17	21	19	16	21	18	17	19	21	18	15	20	15	16	17	18	14	17	15	20	17	15	21	18	15	16	17	16	18	23	17	18	
MMBsin ZnSO ₄ 4D	7.45E+05	1.21E+07	10.0	50.0	campo	20	24	22	23	21	21	20	25	24	23	21	24	23	21	23	27	24	20	24	21	25	21	25	20	25	21	24	21	23	24	24	21	24	23	21	
MMBsin ZnSO ₄ 5D	1.49E+06	1.47E+07	10.0	100.0	campo	24	23	26	22	19	23	20	25	23	22	21	25	21	20	19	21	23	24	22	20	23	22	21	20	25	21	22	26	25	23	18	27	23	20	21	
MMBsin ZnSO ₄ 6D	7.61E+06	1.59E+07	10.0	500.0	campo	20	23	20	21	25	22	26	23	22	21	20	23	21	23	25	19	21	21	22	24	21	20	23	25	22	25	21	23	21	20	21	25	27	21	26	
MMBsin ZnSO ₄ 7D	1.57E+07	1.50E+07	10.0	1000.0	campo	27	22	25	21	24	21	24	26	28	21	24	21	20	24	26	25	21	21	26	25	21	24	23	26	23	22	21	26	25	21	24	28	24	22	26	28

Figura 5.2. Valores del conteo por tinción con DAPI en *Scenedesmus acutus* en Medio Modificado BoldZnCl₂ y Medio Modificado BoldsinZnSO₄

VI.- Ecuación para la obtención de la velocidad de crecimiento y tasa generacional

Para el calculo de la tasa de crecimiento y duplicación generacional tanto para *Scenedesmus acutus* como para *Rhodobacter sphaeroides* se empleo la formula abajo mencionada. El cultivo utilizado se encontraba en fase exponencial.

$$\mu = \frac{\ln (X_2/X_1)}{t_2 - t_1} \quad (\text{días}^{-1})$$

$$TG = (\ln 2) / \mu \quad (\text{días})$$

Donde:

μ: Velocidad de crecimiento

TG: Tasa generacional

X2: número de células al tiempo t2

X1: número de células al tiempo t1

VII.- Resultados Eficiencia Respiratoria y Fotosintética en *Scenedesmus acutus*

Valores de Respiración				
	MBB	MMBMgCl ₂	MMB ZnCl ₂	MMBsin ZnSO ₄
1ra medición	0.1	0	0	0.05
2da medición	0.1	0	0	0.05
3ra Medición	0.1	0	0	0.1
Promedio	0.1	0	0	0.0666
Desv Estandar	0	0	0	0.0289
nanoátomos de O ₂ x hr-1	360	0	0	240

Figura 7.1. Eficiencia respiratoria probada en los cuatro medios de cultivo para *Scenedesmus acutus*.

Valores de Fotosíntesis				
	MBB	MMBMgCl ₂	MMB ZnCl ₂	MMBsin ZnSO ₄
1ra medición	0.2	0.25	0.15	0.15
2da medición	0.25	0.25	0.15	0.15
3ra Medición	0.2	0.2	0.2	0.1
Promedio	0.2167	0.2333	0.1667	0.1333
Desv Estandar	0.0289	0.0289	0.0289	0.0289
nanoátomos de O ₂ x hr-1	780	840	600	480

Figura 7.2. Eficiencia fotosintética probada en los cuatro medios de cultivo para *Scenedesmus acutus*.