

PROTOTIPO PARA LA BIOPRODUCCIÓN DE H₂ POR *Chlamydomonas reinhardtii*

Julia S. Martín del Campo y Rodrigo Patiño*

Cinvestav – Unidad Mérida, Departamento de Física Aplicada. Mérida, Yucatán, México

*Tel: +(999)9429438, Fax: +(999)9812917, Correo-e: rtarkus@mda.cinvestav.mx

RESUMEN

La conversión directa de luz solar en sustancias químicas combustibles es un mecanismo prometedor para la obtención de energía no dependiente de los combustibles fósiles. Un combustible alternativo viable es el hidrógeno (H₂) que puede ser producido mediante un proceso acoplado a la fotosíntesis. La producción de hidrógeno en las microalgas verdes es un proceso dependiente de luz, en el que la biofotólisis se une a la acción de la enzima hidrogenasa, que se expresa únicamente bajo condiciones de anaerobiosis y se inactiva por la presencia de O₂. En este trabajo se presenta un estudio preliminar del efecto que tiene la concentración de biomasa inicial en la producción de hidrógeno por la microalga de la especie *Chlamydomonas reinhardtii*. Para ello, se empleó un reactor de acrílico con base circular y un volumen total de 1 L, que se mantuvo bajo iluminación artificial y agitación magnética continuas. Los resultados muestran que la concentración inicial de biomasa tiene una influencia remarcable en la cinética de la síntesis de hidrógeno y en la duración del fenómeno.

1.- Introducción

La energía solar es la fuente disponible más abundante y accesible para la producción sostenible de combustibles y de electricidad. La conversión directa de luz solar en sustancias químicas combustibles es un mecanismo prometedor para la futura obtención de energía no dependiente de los combustibles fósiles.

El término “producción fotobiológica de H₂” involucra diversos procesos microbianos que requieren la luz solar como fuente de energía, un sustrato donador de electrones y un catalizador que combine los electrones y los protones para generar H₂ gaseoso. La energía

solar permite a los organismos fotosintéticos extraer electrones de compuestos con altos potenciales redox como el agua (en la fotosíntesis oxigénica) o ácidos orgánicos (en la fotosíntesis no oxigénica), rindiendo energía y reductantes de bajo potencial redox, que pueden ser utilizados como sustratos para la producción de hidrógeno [1]. Cuando las microalgas *Chlamydomonas reinhardtii* son iluminadas después de un periodo de adaptación anaerobia, los electrones originados por la ruptura de la molécula de agua en el fotosistema II (FSII), son dirigidos a la cadena fotosintética de transporte de electrones, *vía* ferredoxina, y empleados por una enzima Fe-hidrogenasa reversible para producir H_2 a partir del agua y la energía luminosa. Tanto la actividad de la Fe-hidrogenasa como su expresión son altamente sensibles a la presencia de oxígeno y, debido a que el oxígeno es producido en el FSII, la producción de H_2 se detiene después de algunos minutos de haber comenzado. Sin embargo se ha propuesto un protocolo experimental basado en la limitación de azufre y que permite la producción prolongada de hidrógeno: al limitar la fuente de azufre se originan dos etapas: durante la primera, la fotosíntesis oxigénica es la dominante, con la consecuente producción de biomasa, y durante la segunda se inicia la etapa anoxigénica en la cual se induce la expresión de la Fe-hidrogenasa y comienza la producción de hidrógeno [2]. Para inducir la anaerobiosis por ausencia de azufre, una vez que se tiene la densidad celular deseada (para crecimiento generalmente se emplea un medio de cultivo conocido como TAP), el cultivo es centrifugado, se desecha el sobrenadante y la pastilla es resuspendida en medio TAP libre de azufre para nuevamente centrifugar y resuspender las células en TAP sin azufre. Existen diferentes criterios acerca de cuántos lavados se deben hacer, sin embargo, debe tenerse en cuenta que cada paso de centrifugación afecta la integridad celular [3]. Una forma alternativa para inducir la anaerobiosis por falta de azufre es inocular en un medio con pequeñas cantidades del mismo [4]. Para la producción de H_2 en ausencia de azufre, la presencia de acetato es esencial para establecer la anaerobiosis [5].

Debido a la gran variación de las respuestas metabólicas de *C. reinhardtii* en cultivos sin azufre, es recomendable que cada laboratorio ensaye las diferentes variables involucradas en la producción de hidrógeno [3]. En este trabajo se presenta un estudio preeliminar del efecto que tiene la concentración de biomasa inicial en la producción de hidrógeno. Para

ello se empleó un reactor de acrílico con base circular y un volumen total de 1 L que se mantuvo bajo iluminación artificial y agitación magnética continuas. Para la medición del H_2 producido se empleó una celda de hidrógeno y la obtención de datos (pH, temperatura, iluminancia y producción de H_2) se llevó a cabo de forma automática.

2.- Metodología

2.1 Producción y separación de biomasa. Las microalgas *C. reinhardtii*, fueron cultivadas en medio Sueoka [6], con burbujeo de aire comprimido y bajo iluminación artificial continuos, durante una semana. La cuantificación de biomasa se hizo midiendo la densidad óptica a 640 nm de longitud de onda y con base en una previa correlación con el peso seco de biomasa y la densidad celular. La biomasa fue recuperada a través de una columna empacada de algodón, con densidad de empaque de 150 g/L. Una vez retenida la biomasa se procedió a hacer un lavado con 100 mL de medio TAP [6] reducido en sulfatos (TAP-S) por cada litro filtrado (figura 1). El medio TAP-S fue preparado sustituyendo los componentes sulfatados por sus respectivos análogos clorados, a excepción del $CuSO_4$ y el $FeSO_4$.

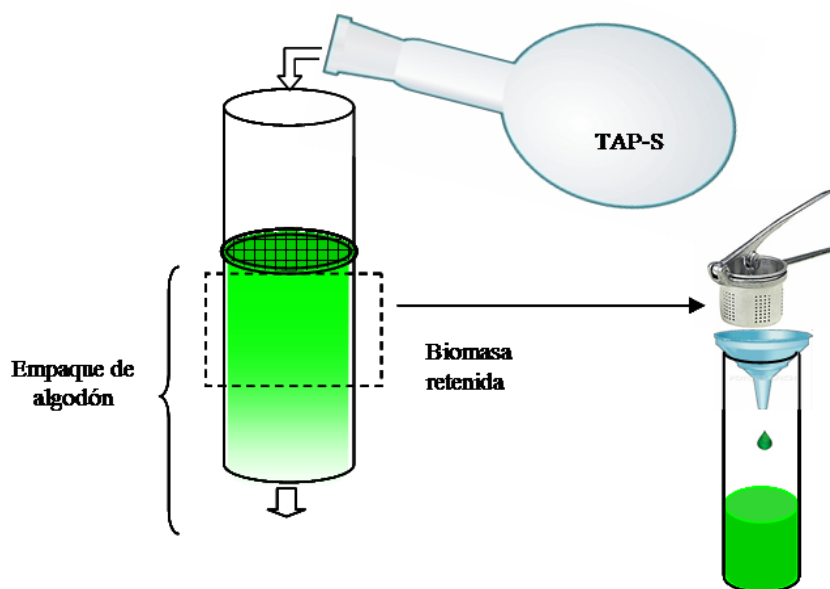


Figura 1. Separación de biomasa con una columna empacada de algodón.

La biomasa retenida en el algodón y lavada en la columna, se recuperó exprimiendo el algodón y se empleó como inóculo en el biorreactor de producción de hidrógeno (BR-H), resuspendiendo en medio TAP-S. EL BR-H consiste de un cilindro con 7.5 cm de diámetro y 30 cm de altura para un volumen útil de 1 L, elaborado de acrílico y equipado con una salida de gases a la cual se conectó una columna empacada de alúmina para la retención de humedad (figura 2).

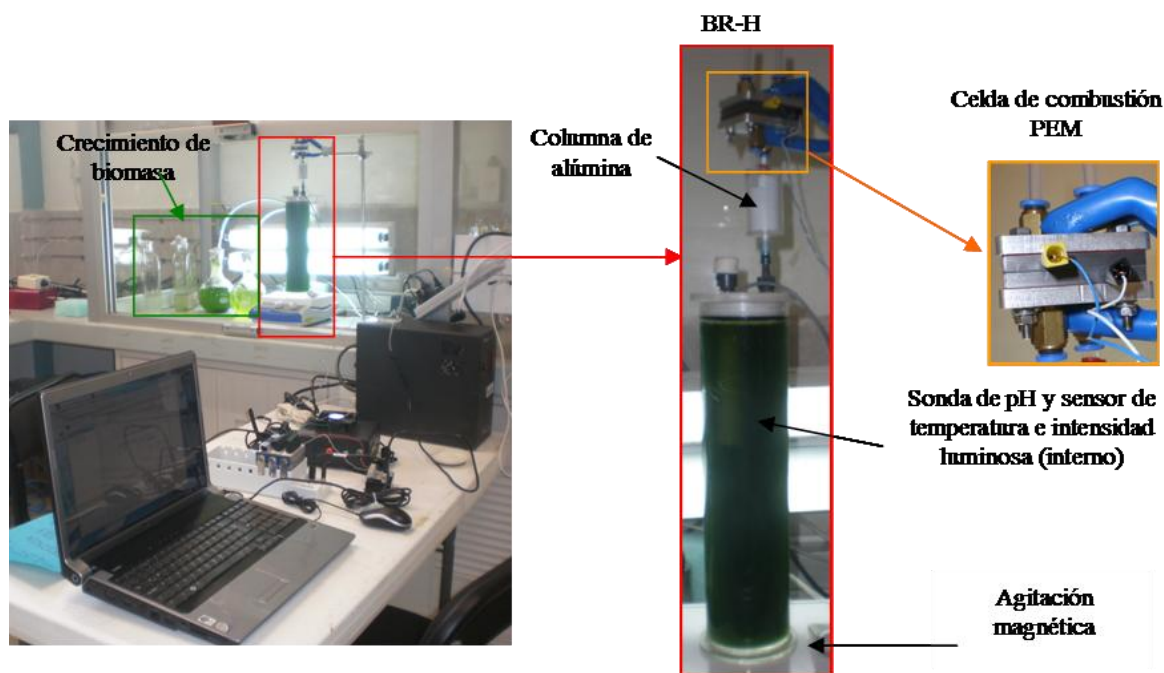


Figura 2. Diseño experimental para la producción de hidrógeno. En la imagen se muestran los reactores para crecimiento de biomasa y producción de hidrógeno, así como la disposición del equipo para la recopilación de datos.

2.2 Producción de Hidrógeno. El BR-H se mantuvo con agitación magnética e iluminación continuos (80-115 μ E). Para la cuantificación del hidrógeno se utilizó una celda de combustión tipo PEM (elaborada y proporcionada por el grupo del Dr. Omar Solorza, Cinvestav-Zacatenco) que fue conectada a la salida de la columna con alúmina que tiene el BR-H. Se midió como respuesta un voltaje debido a la reacción del H_2 con el O_2 del aire, a 1 atm de presión y 25 ± 5 °C (figura 2). El pH fue medido utilizando una sonda Sensorex S650/cD inmersa en el medio de cultivo; la sonda está conectada a una fuente de poder y un

adaptador estándar (Sensorex S653-L-EC), la señal de respuesta es una corriente eléctrica que es directamente proporcional al pH. El hidrógeno producido y el pH, fueron monitorizados en tiempo real empleando el software Labview SignalExpress-2.5.1 y un chasis cDAQ-9172 con los módulos NI9203 y NI9205, todo adquirido en National Instruments, para la medición de la corriente (pH) y el voltaje (H_2). La temperatura y la iluminancia dentro y fuera del reactor fueron medidas mediante sensores HOBO Pendant (Onset, UA-002-64, $\pm 0.47^\circ C$).

Se realizaron cinco experimentos con diferentes concentraciones iniciales de biomasa: 0.048, 0.054, 0.071, 0.164 y 0.349 g/L de peso seco. En todos los casos, el cultivo tenía una antigüedad de 7 días, excepto el experimento de concentración inicial de 0.054 g/L, para el cual el inóculo empleado para la generación de biomasa fue tomado de un reactor anaerobio. Es importante mencionar que tanto en el crecimiento de biomasa como en la producción de hidrógeno, los medios de cultivo se esterilizaron mediante filtración al vacío (microfibra de vidrio, Whatman GFC, $0.2\ \mu m$) y el material empleado solamente se lavó con agua clorada antes de enjuagarse con agua destilada.

3.- Resultados y discusión

La producción de hidrógeno se monitorizó con base en una diferencia de voltaje. En la figura 3 se muestra la diferencia de voltaje generado en función del tiempo y de la concentración inicial de biomasa. Puede observarse que conforme incrementa la concentración de biomasa, la velocidad de producción durante las primeras treinta horas aumenta, hasta llegar a un máximo en que la producción de hidrógeno se encuentra alrededor de un valor constante.

La duración de esta etapa de producción estacionaria también está directamente relacionada con la concentración inicial de biomasa. Se tiene una duración de aproximadamente 400 h de producción estacionaria para una concentración de biomasa inicial de 0.349 g/L, y una duración menor a 50 h para la concentración de biomasa inicial de 0.048 g/L. En el caso de la concentración de biomasa inicial de 0.054 g/L no se cumple dicha relación, y esto se atribuye a la historia del inóculo. En la tabla 1 se enlistan los valores integrados de ΔV para cada concentración inicial de biomasa.

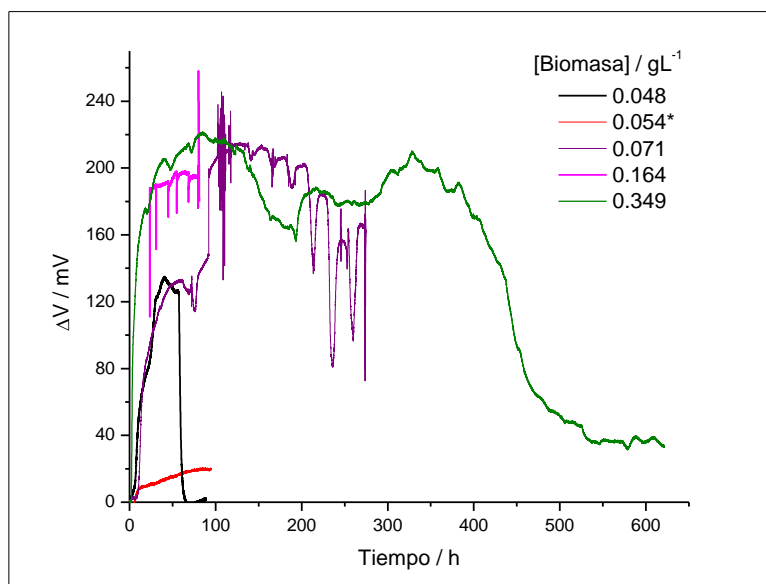


Figura 3. Diferencia de voltaje generado por la reacción del hidrógeno producido con oxígeno del aire a 1 atm de presión y 25 ± 5 °C.

Tabla 1. Variables medidas en función de la concentración de biomasa inicial.

Duración / h	[Biomasa] / g·L ⁻¹		Señal integrada / V·h	ΔV_{\max} / mV	ΔT / °C (0-50 / h)
	Inicial	Final			
90	0.048	0.079	10166	134	0.53 ± 0.17
90	0.054	0.087	1675	19	-
400	0.071	0.219	195524	210	0.45 ± 0.10
90	0.154	0.180	11430	197	-
600	0.349	0.835	614030	220	0.24 ± 0.06

En la figura 4 se muestran los valores de pH en función del tiempo. Para la concentración de biomasa inicial de 0.054 g/L, se observa que el pH nunca se estabiliza y permanece en la región básica. Los demás experimentos no mostraron cambios significativos y siempre permanecieron con valores entre 7.0 y 7.5 en la escala de pH.

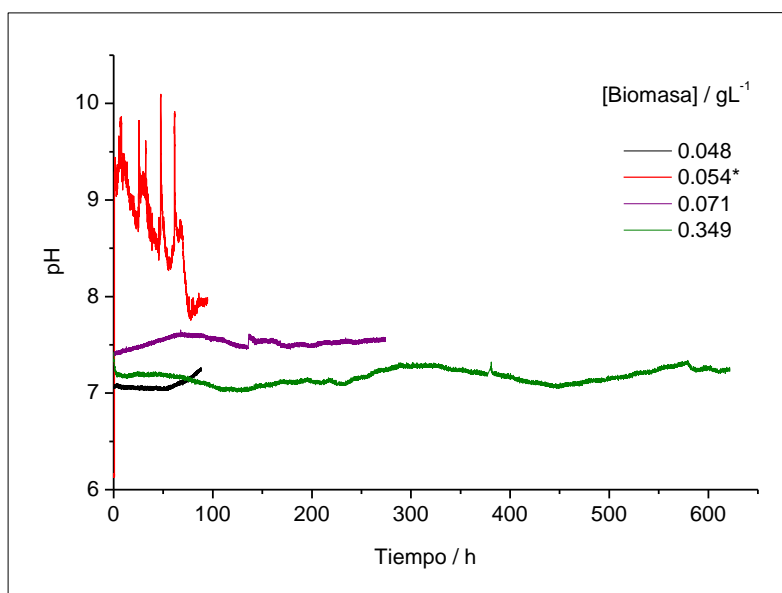


Figura 4. Valores de pH en función del tiempo para las diferentes concentraciones iniciales de biomasa.

En todos los experimentos, la temperatura externa medida fue mayor que la temperatura interna, indicando que se llevan a cabo procesos endotérmicos dentro de BR-H. En la figura 5 se muestra la diferencia entre la temperatura externa y la interna (ΔT). Al parecer, conforme incrementa la concentración de biomasa inicial, la ΔT disminuye (Tabla 1).

Las mediciones de iluminancia dentro y fuera del reactor evidencian el incremento de la densidad del cultivo con el tiempo. En el biorreactor más concentrado (0.349 g/L), después de 200 h de producción de hidrógeno, la intensidad luminosa dentro del reactor es prácticamente igual a cero, no obstante esto no detiene la producción de hidrógeno (figura 6). Las mediciones de iluminancia para el resto de los experimentos presentan comportamientos similares, solo que de manera menos pronunciada debido a que las concentraciones iniciales y el tiempo de producción son menores.

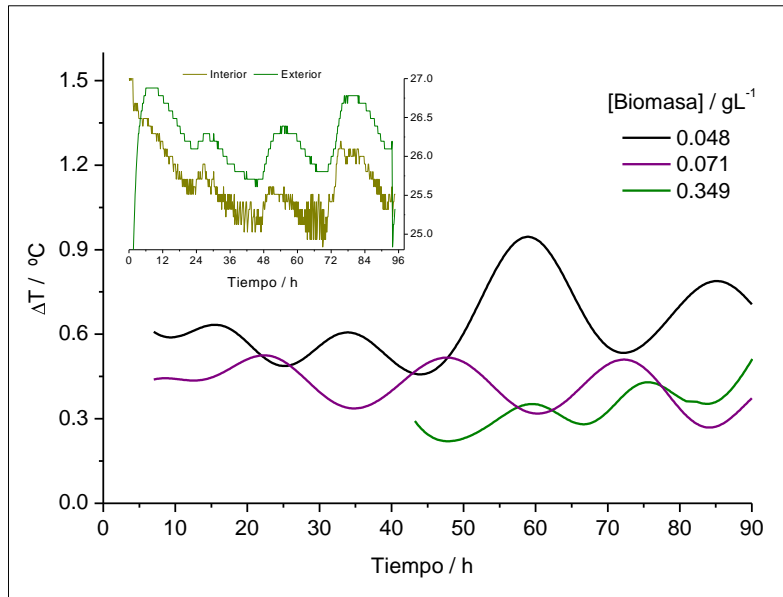


Figura 5. Diferencia entre las temperaturas dentro y fuera del reactor (ΔT) para las concentraciones iniciales de biomasa 0.048, 0.071 y 0.349 g/L. En el recuadro se muestran los resultados típicos de un experimento para las temperaturas al exterior y al interior del reactor.

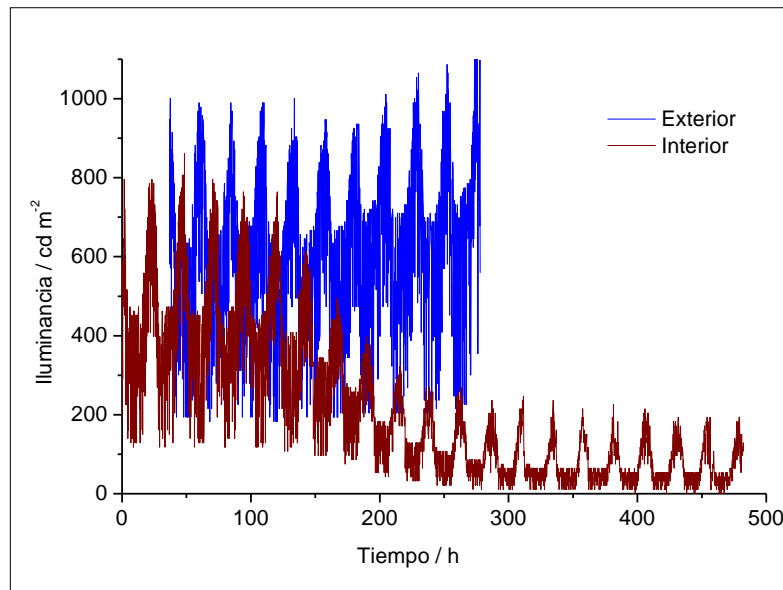


Figura 6. Variación de la iluminancia dentro y fuera del reactor; concentración inicial de biomasa: 0.349 g/L; concentración final de biomasa: 0.835 g/L. Los ciclos que se observan se deben a la penetración de luz solar durante los ciclos naturales día-noche, lo que permite una iluminación adicional a la fuente artificial continua.

En todos los experimentos realizados, se encontró que después de las primeras 90 horas de producción de H_2 se formaba una película rojiza en la parte superior del BR-H que estuvo expuesta a una radiación de $\sim 85 \mu E$ además de que el medio tomó una coloración marrón (figuras 7 y 8). La intensidad de color, así como el espesor de la película están relacionados con la concentración inicial de biomasa, así como de las horas de producción. Con la finalidad de identificar el origen de dicha coloración, se filtraron 5 mL del medio y se obtuvo su espectro de absorción en la región UV-VIS (StellarNet, EPP-2000) y únicamente hay una señal definida a 807 nm que corresponda muy probablemente a bacterioclorofila, proveniente de contaminación bacteriana [7].

Figura 7. Espectro de absorción del filtrado obtenido del reactor anaerobio tras 600 h de producción de hidrógeno. La imagen corresponde a la concentración de biomasa inicial de 0.349 g/L.

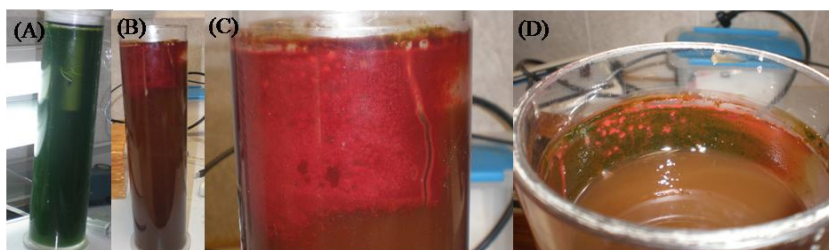


Figura 8. Aspecto del BR-H al inicio del experimento (A) y después de 600 h (B). Película rojiza (zona con radiación $\sim 85 \mu E$) aspecto exterior (C) e interior (D).

4. Conclusiones

La velocidad de producción de hidrógeno en las primeras 50 h y el tiempo de producción total están relacionados directamente con la concentración de biomasa inicial. Aparentemente existe una concentración de biomasa límite que favorece la producción de hidrógeno y es cercana a 0.349 g/L de biomasa peso seco. Al parecer, la biomasa adaptada a las condiciones anaerobias empleada como inóculo para crecimiento de biomasa en condiciones aerobias no proporciona beneficio alguno, por el contrario retarda el inicio de la producción.

No hay una variación importante en el pH a lo largo del tiempo de producción de hidrógeno y es independiente de la concentración inicial de biomasa. La diferencia de temperatura

entre el reactor y fuera de mismo podría indicar que está involucrado un proceso endotérmico en el metabolismo anóxico de las microalgas.

El efecto de la iluminancia deberá también ser evaluado, antes de proponer una metodología en condiciones externas sin control de temperatura y con iluminación solar bajo los ciclos naturales de día y noche. Estas condiciones reducirían costos de producción del biohidrógeno. Es necesario investigar también la formación de biopelículas al interior del reactor, su origen y su efecto en la producción de hidrógeno.

6.- Referencias

[1] M.L. Ghirardi, A. Dubini, J. Yun, P. Maness, Photobiological hydrogen-producing systems. *Chemical Society Reviews* 38 (2009) 52-61.

[2] V. Chochois, D. Dauvillée, A. Beyly, D. Tolleter, S. Cuine, H. Timpano, S. Ball, L. Cournac, G. Peltier, Hydrogen production in *chlamydomonas*: Photosystem ii-dependent and -independent pathways differ in their requirements for starch metabolism. *Plant Physiology* 151 (2009) 631-640.

[3] A. Hemschemeier, A. Melis, T. Happe, Analytical approaches to photobiological hydrogen production in unicellular green algae. *Photosynthesis Research* 102 (2009) 523-540.

[4] L.P. Zhang, T. Happe, A. Melis, Biochemical and morphological characterization of sulfur-deprived and H_2 -producing *chlamydomonas reinhardtii* (green alga). *Planta* 214 (2002) 552-561.

[5] S. Fouchard, A. Hemschemeier, A. Caruana, J. Pruvost, J. Legrand, T. Happe, G. Peltier, L. Cournac, Autotrophic and mixotrophic hydrogen photoproduction in sulfur-deprived *chlamydomonas* cells. *Applied and Environmental Microbiology* 71 (2005) 6199-6205.

[6] *Chlamydomonas Center*. Recipes for commonly used culture media. Database: 2008-2010. Disponible en: www.chlamy.org.

[7] R Mondragón, E. Vicente, J.J. Guillenea, Aislamiento e identificación de bacterias fotosintéticas en el monolito del estany de cullera (valencia). *Limnética* 1 (1984) 78-85.