

Revisión

El potencial de las bacterias purpuras no sulfurosas (BPNS) en la producción biológica de hidrógeno

Daniel A García-López¹, Roberto De Philippis², E.J. Olguín^{1*}

¹ Grupo de Biotecnología Ambiental, Red de Manejo Biotecnológico de Recursos. Instituto de Ecología, A.C. Carretera Antigua a Coatepec No. 351 El Haya, Xalapa, Veracruz 91070, México.

² Dipartimento di Scienze Produzioni Agroalimentari e dell'Ambiente Università degli Studi di Firenze, Piazzale delle Cascine 24, Firenze, Toscana 50144, Italia.

* Autor de Correspondencia: eugenia.olguin@inecol.mx

Resumen

La actual problemática ambiental y energética causada por el uso de combustibles fósiles ha hecho necesario valorar energías alternativas como el hidrógeno. Los bioprocesos son una opción para la producción de este energético, y dentro de éstos, la fotofermentación o fotodescomposición de compuestos orgánicos de bajo peso molecular por bacterias púrpuras no sulfurosas (BPNS) destaca por su potencial de aprovechar la energía de la luz y de ácidos orgánicos durante el proceso denominado fotofermentación que produce hidrógeno mediante la enzima nitrogenasa. En la presente revisión se abordan generalidades de las BPNS, se describe el mecanismo por el que producen hidrógeno y finalmente se abordan los principales retos para lograr mayores rendimientos para producir hidrógeno en BPNS.

Palabras clave: *producción biológica de hidrógeno, bacteria púrpura, fotofermentación, nitrogenasa.*

Abstract

The current environmental and energetic problems due the use of fossil fuels have made necessary to assess alternative energies as hydrogen. The bioprocesses are an option for the production of this biofuel and among them, the photofermentation using purple non sulphur bacteria (PNSB) highlights due the potential of PNSB to use light energy and organic acids, which produces hydrogen through nitrogenase enzyme. In this review an overview of the PNSB is discussed, the mechanism by producing hydrogen and finally addresses the main challenges to achieve higher yields to produce hydrogen by PNSB.

Key words: *biological hydrogen production, purple bacteria, photofermentation, nitrogenase.*

1. El escenario ambiental y energético

Actualmente vivimos una crisis ambiental global que se percibe por el aumento de

temperatura global, la pérdida de cobertura de glaciares y el incremento del nivel de los océanos (IPPC 2007); derivado principalmente de las emisiones de gases efecto invernadero (GEI), como

CO, CO₂, SO_x, NO_x, que provienen en su mayoría de la combustión de combustibles fósiles e hidrocarburos para la generación de energía (IPCC 2005, IEA 2011).

A pesar de los efectos negativos sobre el ambiente, la producción de energía es necesaria para el desarrollo de las sociedades; por citar un ejemplo, la demanda energética actual alcanza 500X10¹⁵ Joules anuales y para el año 2050 se espera que podría triplicarse (Valdez-Vázquez 2006). Por otra parte debemos hacer notar que ningún combustible se ha desarrollado a gran escala como sustituto de las actuales fuentes de energía y las implicaciones de esta demanda a partir de fuentes fósiles repercutirán con una enorme carga ambiental. Como evidencia, las más recientes investigaciones han indicado que para finales del primer centenario del siglo XXI el planeta alcanzará las temperaturas más altas de los últimos 11,000 años (Perkins 2013).

Aunado a lo anterior, existe fuerte evidencia por parte de distintos estudios sobre el hecho que hemos alcanzado el límite en la extracción y producción de hidrocarburos (Kaiser 2010, Yáñez-Arancibia 2010), nuestras reservas no serán suficientes para la demanda de los próximos años. En el estudio de Sorrell *et al.* (2011), se indica que para el 2030 será necesario remplazar dos terceras partes de la producción actual de crudo, tan solo para mantener la producción constante, esto nos demuestra el enorme riesgo que representa depender de fuentes no renovables de energía y en suma de sus consecuencias ambientales.

Frente este escenario surge la necesidad de desarrollar fuentes alternativas de energía que sean sustentables; es decir: producibles a gran escala, con alto valor

calorífico, económicamente accesibles y con bajas emisiones de GEI (IEA 2010, IPCC 2012).

1.1 El hidrógeno como combustible

Entre distintas alternativas de energéticos el hidrógeno puede ser considerado una opción como provisión de energía ya que posee mayor valor calorífico que los actuales combustibles (Tabla 1) y su combustión produce vapor de agua libre de emisiones de GEI (Momirlan y Veziroglu 2002)

Tabla1. Comparación valor calorífico de diferentes combustibles

Combustible	Valor calorífico (MJ/Kg)
Hidrógeno	141.79
Gasolina	47.3
Diesel	44.8
Gas natural	43
Biodiesel	39-48

Actualmente, la producción de hidrógeno tiene su principal uso en la industria química y no como combustible. A nivel mundial la producción y consumo corresponde a 450 billones m³ de hidrógeno, que principalmente se obtiene de (Figura 1): 95% de hidrocarburos (calefacción de gas metano u otros hidrocarburos), 4% hidrólisis de agua (energía que proviene de fuentes fósiles), y 1% de procesos biológicos (Bicáková y Straka 2012). Sin embargo hay que hacer notar que por cada tonelada producida mediante hidrocarburos, aproximadamente 2.5 toneladas de CO₂ se liberan en el proceso; y cuando la producción proviene de combustión de carbón, aproximadamente 5 toneladas de CO₂ son generadas por cada tonelada de hidrógeno (Abbasi y Abbasi 2011).

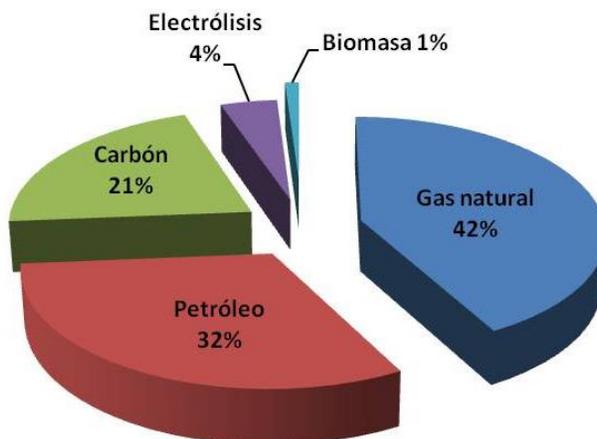


Figura 1. Actuales fuentes de la producción de hidrógeno.

Para lograr una economía del hidrógeno, donde sea generado y empleado como combustible, es necesario optar por fuentes que empleen en menor medida hidrocarburos y cuya producción presente altos rendimientos. Entre estas opciones los procesos biológicos resaltan ya que una gran variedad de microorganismos tienen la capacidad de generar hidrógeno a partir de sustratos de bajo costo como aguas residuales y/o desechos orgánicos; sumando beneficios ambientales por el tratamiento de residuos (Keskin *et al.* 2011). Aunque actualmente los procesos biológicos se realizan principalmente a nivel laboratorio, ya que su escalamiento no es sencillo, los últimos avances demuestran que esta opción puede tener potencial si se centran los esfuerzos en el diseño de reactores, el uso de sustratos de bajo costo e ingeniería para el mejoramiento de cepas.

2. Producción biológica del hidrógeno

El hidrógeno es producido por gran variedad de microorganismos (Tabla 2) mediante distintas vías e involucrando dos principales enzimas, la hidrogenasa y la nitrogenasa. La producción biológica de hidrógeno (biohidrógeno) puede clasificarse como: a)

biofotólisis mediante microalgas y cianobacterias, b) fermentación oscura por bacterias anaerobias o facultativas, a partir de sustratos orgánicos, y c) fotofermentación ó fotodescomposición de compuestos orgánicos de bajo peso molecular por bacterias purpuras no sulfurosas (BPNS) (Hallenbeck *et al.* 2012, Show *et al.* 2012). Las microalgas y cianobacterias producen hidrógeno y oxígeno mediante la luz que captan durante la fotosíntesis con agua como donador de electrones; sin embargo el oxígeno producido durante el proceso inhibe la producción de hidrógeno llevando a bajos rendimientos en la producción. Por otra parte, las bacterias fermentativas pueden producir hidrógeno aprovechando gran cantidad de compuestos orgánicos en condiciones anoxigénicas por lo que no hay inhibición como en el caso anterior, sin embargo aunque se pueden alcanzar altas tasas de producción de hidrógeno las conversiones de sustrato en la fermentación son bajas al producir metabolitos de bajo peso molecular como subproducto. Finalmente, las BPNS pueden descomponer ácidos orgánicos aprovechando la energía de una fuente luminosa, como la luz solar, con altos rendimientos en la conversión de sustrato (Das y Veziroglu 2008).

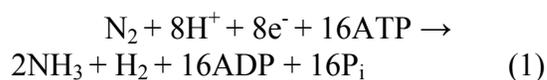
Tabla 2. Bacterias y microalgas productoras de hidrógeno.

Fuente energía	Enzima para la producción de hidrógeno	Microorganismo	Sub-clase	Ejemplos	Donador de electrones	
Fotosíntesis	Hidrogenasa	Microalgas verdes	-	<i>Chlamydomonas</i>	Agua	
				<i>Chlorella</i>	Agua	
	Hidrogenasa/Nitrogenasa	Cianobacterias	Heterocistos	<i>Anabaena</i>	Agua	
				Sin-Heterocistos	<i>Oscillatoria</i>	Agua
				Bacteria Purpura no sulfurosa	<i>Rhodobacter</i>	Ácidos orgánicos
Nitrogenasa	Bacteria fotofermentativa	Bacteria Purpura no sulfurosa	<i>Rhodopseudomonas</i>	Ácidos orgánicos		
Compuestos orgánicos	Hidrogenasa	Anaerobio estricto	-	<i>Clostridium</i>	Azúcares	
		Anaerobio facultativo	-	<i>Escherichia</i>	Azúcares	
	Nitrogenasa	Fijadoras de Nitrógeno	Aerobio facultativo		<i>Azotobacter</i>	Azúcares
			Anaerobio Facultativo		<i>Klebsiella</i>	Azúcares

Adaptado de Basak y Das (2007).

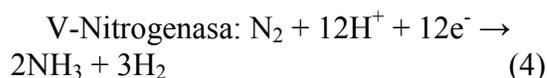
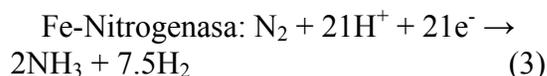
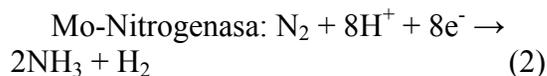
3. Nitrogenasa de BPNS y producción de hidrógeno.

La enzima nitrogenasa dirige la conversión de nitrógeno a amonio para conseguir una fuente útil de nitrógeno cuando es escaso en el ambiente, por lo tanto solo opera bajo condiciones reducidas de nitrógeno y durante el proceso produce hidrógeno. El proceso global demanda grandes cantidades de energía en forma de ATP (1) que puede provenir de la reducción ácidos orgánicos gracias a la energía provista por luz (PDB 2002).

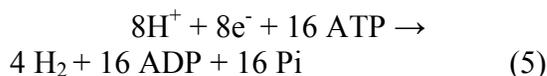


La nitrogenasa se forma por dos componentes: a) la proteína Mo-Fe ó

complejo dinitrogenasa, donde se realiza la formación de amonio, y b) la proteína Fe ó sub-unidad reductasa, responsable de transportar los electrones de donadores externos hacia el complejo dinitrogenasa (Halbleib y Ludden 2000). Es importante mencionar que existen diferentes tipos de nitrogenasas que varían de ion metálico en el complejo dinitrogenasa; la nitrogenasa Mo (2) es la más común y eficiente en la conversión de nitrógeno en amonio, las otras dos contienen Fe (3) y V (4) como cofactores (Larimer *et al.* 2004). Estas nitrogenasas alternativas son menos eficientes en la reducción de nitrógeno, pero son más eficientes en la producción de hidrógeno, y son producidas solo en ausencia de Mo y presencia de Fe o V (Adessi y De Philippis 2012).



Aunque el rol principal de la nitrogenasa es la fijación de nitrógeno a amonio, la enzima puede operar en ausencia de nitrógeno y producir hidrógeno como único producto (5).



4. Generalidades de las BPNS

El grupo de las BPNS surgió porque en un principio se pensó que algunas bacteria púrpuras eran incapaces de utilizar sulfuros como fuente de electrones para la reducción del CO_2 ; aunque de hecho ahora se sabe que si son capaces de utilizar sulfuro pero a bajas concentraciones de 1-3 mM (Madigan y Brock 2009). Constituyen un grupo altamente heterogéneo que se refleja en su diversidad morfológica, composición de carotenoides, uso de fuentes de carbono como donadores de electrones, entre otras características (Imhoff *et al.* 1984). Todas las BPNS aisladas hasta el momento son alfa (α) ó beta (β) protobacterias (Madigan y Brock 2009).

Dentro de la agrupación α -proteobacteria se encuentran tres subgrupos: α -1 *Rhodospirillum*, α -2 *Rhodopseudomonas*, y α -3 *Rhodobacter* (Imhoff 1995). La principal característica de las BPNS es su habilidad para realizar fotosíntesis anoxigénica o fotofermentación, ya que todos los miembros del grupo pueden sobrevivir en ausencia de oxígeno cuando existe una fuente de luz disponible; también pueden desarrollarse en presencia de oxígeno pero sin realizar fotosíntesis

ya que el oxígeno inhibe la producción de pigmentos fotosintéticos (Niel 1944).

Las BPNS pueden ser encontradas en ambientes acuáticos donde hay gran concentración de materia orgánica, como lagos o ríos con aguas residuales. Algunos miembros pueden encontrarse en ambientes marinos e hiper salinos. Sin embargo los ambientes eutrofizados son el hábitat más común donde ocasionalmente se ubican en el nivel anoxigénico o de baja concentración de oxígeno; un suministro de luz es deseable para su desarrollo aunque no es necesaria debido a la versatilidad de su metabolismo (Adessi y De Philippis 2012).

4.1 Producción de hidrógeno en BPNS

En condiciones luminosas y anoxigénicas la energía necesaria para el crecimiento celular, y la actividad de la nitrogenasa para la producción de hidrógeno, proviene del aparato fotosintético (Koku *et al.* 2002). El transporte de electrones durante el crecimiento foto heterotrófico es esencial para una eficiente producción de hidrógeno como lo han demostrado Öztürk *et al.* (2006). El aparato fotosintético de *Rhodobacter sphaeroides* estudiado por Vermeglio y Jolit (1999), se ubica dentro de invaginaciones o vesículas de la membrana citoplasmática, y se compone de: complejo para almacén de luz (CAL), el centro de reacción (CR), y el complejo citocromo bc_1 (Cyt bc_1). El primer paso para la generación de energía es la colecta de la luz por el CAL, donde se encuentran los pigmentos carotenoides y clorofilas que realizan esta función. Posteriormente la energía capturada en forma de fotones se transfiere al CR, donde la excitación de éste último elemento origina la transferencia de electrones a la molécula quinona (Qa).

Cuando la Qa es doblemente reducida (tras la captura de un segundo fotón), ésta toma protones del espacio intracelular y los transloca a través de la membrana hasta alcanzar el complejo Cyt bc₁, desde ahí, por un lado se bombean protones al espacio periplasmático para la fuerza protón motriz para la producción de ATP mediante la ATP sintetasa, y por otro lado, desde el Cyt bc₁ se transfieren electrones al citocromo c₂ (Cyt c₂) que tiene la función de reducir el primer donador de electrones (oxidado después del primer ciclo) en el CR, de esta forma cierra el proceso (Figura 2).

De la energía producida (ATP) durante el proceso, una parte es empleada para la reducción de la ferredoxina (Fd) que reduce a la nitrogenasa, mientras que la mayor parte del ATP se emplea en la activación de la nitrogenasa para realizar sus actividades metabólicas en ausencia de fuentes disponibles de nitrógeno. Durante el proceso se produce hidrógeno como sub-producto metabólico. Sin embargo parte del hidrógeno producido es reciclado por hidrogenasas consumidoras, que lo oxidan para producir electrones y protones que reingresan al ciclo (Adessi y De Philippis 2012).

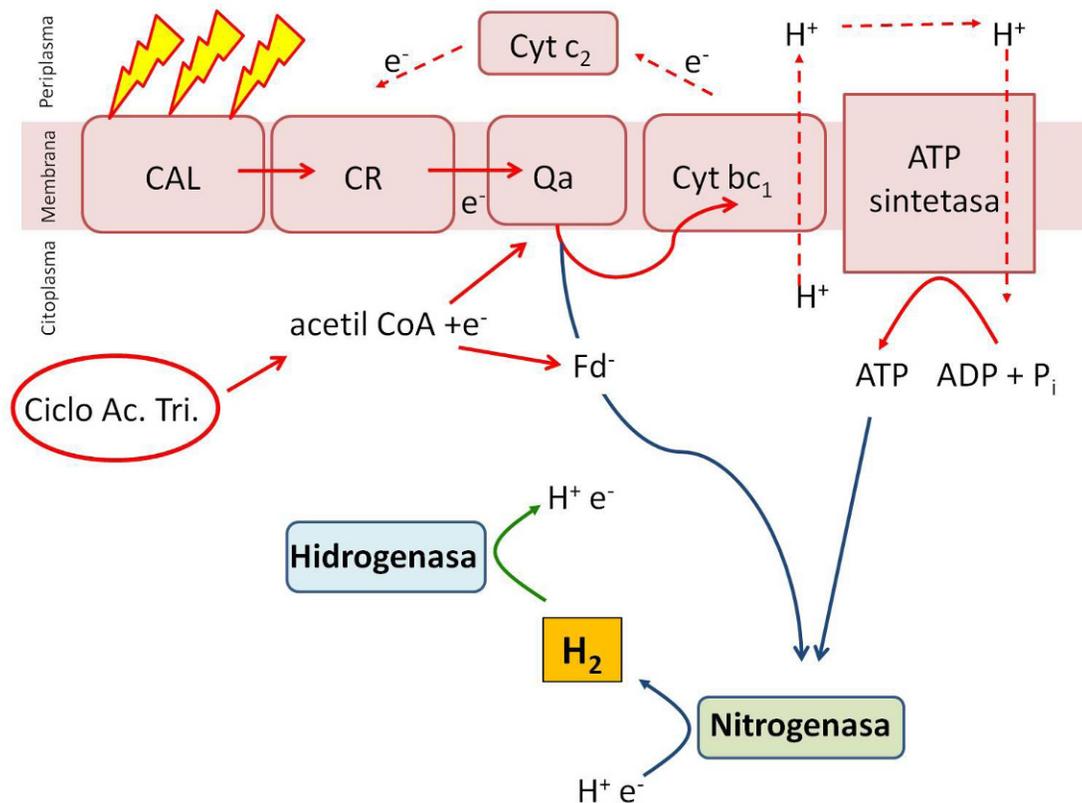


Figura 2. El aparato fotosintético de *R. sphaeroides* se ubica dentro de invaginaciones de la membrana citoplasmática. Las líneas rojas indican el proceso para la producción de energía (ATP) mediante el aparato fotosintético bajo condiciones anoxigénicas. Las líneas azules muestran la activación de la Nitrogenasa (cuando existen bajos niveles de fuentes disponibles de nitrógeno), para la producción de hidrógeno. La línea verde muestra la actividad de la hidrogenasa consumidora para reciclar el hidrógeno producido. CAL= complejo para almacén de luz, CR= centro de reacción, Qa=quinona, Cyt bc₁= citocromo bc₁, Cyt c₂= citocromo c₂, Fd= ferredoxina.

En la producción biológica de hidrógeno las BPNS son una opción atractiva, debido principalmente a que, 1) realizan conversión altamente eficiente de sustratos, 2) operan en condiciones anoxigénicas por lo que no existe inhibición en la producción de hidrógeno como en microalgas, 3) son capaces de absorber y utilizar tanto luz visible (400-700 nm) como región infra roja (700-900 nm), y 4) pueden emplear gran variedad de sustratos incluyendo residuos orgánicos (Eroglu y Melis 2011).

5. Retos para incrementar la producción de hidrógeno en BPNS

A pesar de todas las ventajas comentadas en la sección anterior, existen grandes retos para lograr la viabilidad de la producción biológica a escalas mayores. Principalmente, incrementar las pequeñas producciones que se obtienen, escalar los procesos, disponibilidad de sustratos de bajo costo, la baja eficiencia metabólica que no tiene la finalidad de producir directamente hidrógeno como producto principal, mantener cultivos continuos por periodos largos, baja eficiencia en la conversión y aprovechamiento de la energía luminosa; por nombrar algunos de los principales retos. Sin embargo se han logrado grandes avances para superar algunas de estas barreras.

En la siguiente sección se describen los principales avances y desarrollos que se han generado en la producción de hidrógeno con BPNS. Algunos resultados y comparaciones de estos procesos se muestran en la Tabla 3 al final de la sección.

5.1 Diseño de Foto Bioreactores (FBR)

En un fotobioreactor la luz es convertida en energía bioquímica mediante microorganismos. Aunque en pruebas a escala laboratorio con pequeños volúmenes en FBR se han generado resultados atractivos, el desarrollo de grandes volúmenes es necesario para considerar los procesos biológicos una ruta rentable. En este sentido se han desarrollado FBR con características novedosas ó condiciones definidas para lograr una producción considerable de hidrógeno mediante bacterias púrpuras.

En la producción biológica de hidrógeno el mayor inconveniente es la baja penetración de la luz a las zonas más profundas del reactor (Dasgupta *et al.* 2010). La luz solar es la fuente deseable de energía debido a su nulo costo, sin embargo debe considerarse el efecto de los ciclos luz/oscuridad, ya que la producción de hidrógeno se detiene durante los periodos de oscuridad y reinicia cuando existen nuevamente condiciones de iluminación. Estudios de Uyar *et al.* (2007) mostraron que el espectro de luz infra roja (750-950 nm) e intensidades luminosas superiores a 200 W/m² son lo más indicado para lograr mayores rendimientos en la producción de hidrógeno con *R. sphaeroides*. En trabajos de Chen y Chen (2006), la producción de hidrógeno fue incrementada aplicando luz tanto exterior como internamente al reactor, con lo que lograron mayor eficiencia en el aprovechamiento de la luz.

En la producción biológica de hidrógeno con BPNS, dos son los FBR más empleados: reactores de placa plana y reactores tubulares (Figura 3). La condición para ambos es que deben ser de un material que permita el paso de la luz (como acrílico o cristal), deben aislar el cultivo de contaminación y oxígeno por la posible inhibición de pigmentos fotosintéticos, y permitir tanto un

mezclado adecuado como permanente ya que la agitación es crucial para promover la producción de hidrógeno y lograr la máxima eficiencia en la conversión de sustrato (Boran *et al.* 2010, Dasgupta *et*

al. 2010). En la Tabla 3 se encuentran rendimientos de biorreactores de placa plana (Eroglu *et al.* 2008) y tubular (Adessi *et al.* 2012a).

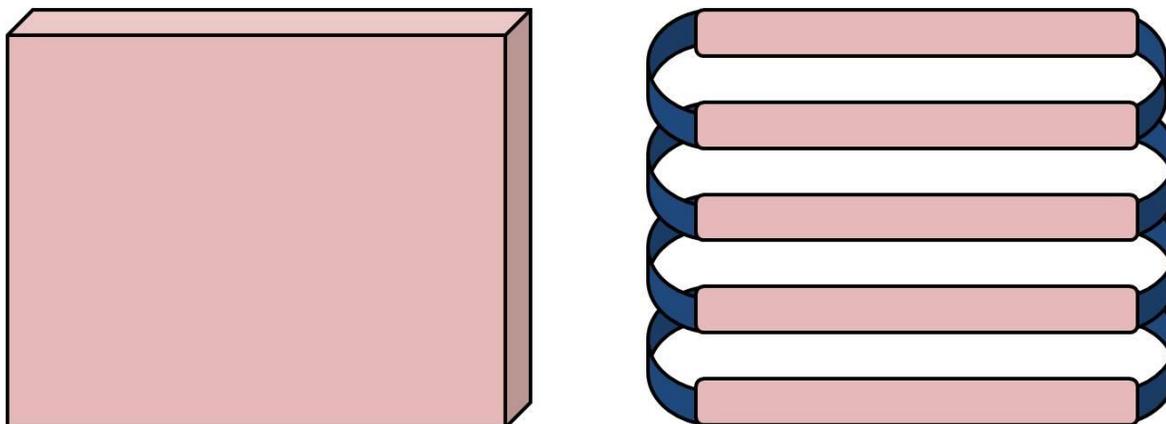


Figura 3. Diagramas de fotobiorreactor de placa plana (izquierda) y tubular (derecha).

5.2 Inmovilización

La inmovilización de células a sustratos sólidos ha sido considerada una estrategia con ventajas sobre las células libres en suspensión (Eroglu y Melis 2011, Hallenbeck *et al.* 2012). Entre las ventajas que se pueden enumerar: las células inmovilizadas pueden crecer en menores espacios, son más fáciles de manipular, y pueden reutilizarse repetidamente en la generación de productos (Eroglu y Melis 2012).

Algunos trabajos han reportado que la inmovilización de bacterias púrpuras puede reducir el efecto inhibitorio del oxígeno y amonio, lo cual es deseable en sustratos que provienen de residuos orgánicos con altas cargas de amonio. En trabajos de Zhu *et al.* (1999) y Zhu *et al.* (2002), la inmovilización de *R. sphaeroides* en agar permitió la producción de hidrógeno con concentraciones inhibitorias de amonio (0.4 mM) en aguas residuales de la producción de tofu.

La inmovilización, también puede ser una estrategia que acompañe a otras estrategias para incrementar rendimientos en la producción de hidrógeno. Chen y Chang (2006) encontraron la mejor concentración de acetato como sustrato (1000 mg/L) y condición de luz (95 W/m²) empleando soportes sólidos para *R. palustris* WP3-5, también lograron una conversión máxima de sustrato de 90.3% (3.63 mol H₂/mol acetato, de 4 mol teórico) y una tasa máxima de conversión de 43.8 ml H₂/Lh.

Finalmente, en la inmovilización la relación superficie/volumen juega un papel importante para lograr los máximos rendimientos de la biotransformación. La mejor relación superficie/volumen garantiza fácil acceso del sustrato a las células y permitir el acceso de luz necesaria. Fißler *et al.* (1995), reportaron producción de hidrógeno con casi 90% de bio-conversión de benzoato como sustrato (13.2 mol H₂/mol benzoato, de 15 mol teórico), inmovilizando *R. palustris* DSM

131, en camas de algnato de 0.05 mm de diámetro.

5.3 Sustratos residuales y de bajo costo

Una vía para reducir costos en la producción de hidrógeno es asociar el proceso con el tratamiento de residuos, con lo cual se reducen costos de medios de cultivo sintéticos y se suma valor ecológico al proceso (Eroglu *et al.* 2006). Como se mencionó anteriormente las BPNS poseen un metabolismo versátil y por lo tanto pueden emplear una gran variedad de sustratos principalmente compuestos reducidos como ácidos orgánicos o ácidos grasos volátiles (AGVs), aunque también en menor concentración compuestos complejos como azúcares simples (glucosa, fructuosa o sacarosa). Algunos residuos agro-industriales, domésticos y de procesamiento de alimentos contienen cantidades considerables de azúcares simples (mono y di sacáridos) y por lo tanto han sido ampliamente investigados en la producción de hidrógeno mediante fotofermentación (Eroglu *et al.* 2004, Özgür *et al.* 2010, Kerskin y Hallenbeck 2012).

El uso de sustratos residuales por BPNS puede realizarse directamente cuando existen principalmente ácidos orgánicos. Cuando los sustratos son altamente complejos, como celulosa ó almidón, puede optarse por algún sistema combinado para el aprovechamiento y tratamiento del sustrato (los sistemas combinados serán tratados en la siguiente sección). De cualquier forma, el uso directo de sustratos residuales en la producción de hidrógeno es lo deseable ya que si el proceso se realiza un solo paso se reducen costos de operación (Kerskin y Hallenbeck 2011).

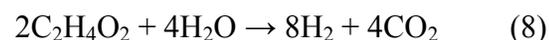
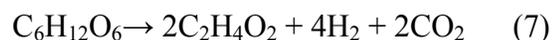
Por otro lado, entre los principales inconvenientes del uso de sustratos residuales podemos mencionar: poca claridad óptica en los efluentes que reduce el paso de la luz, concentraciones altas de amonio que inhiben la actividad nitrogenasa, altas concentraciones de materia orgánica, presencia de compuestos tóxicos y/ó metales pesados, compuestos fenólicos u otros compuestos aromáticos que pueden generar un impacto negativo en el crecimiento celular y producción de hidrógeno. Generalmente la solución más sencilla a la mayoría de estos problemas es la dilución del efluente hasta reducir los efectos nocivos de sus componentes, sin embargo es deseable evitarlo en lo posible por el incremento en costos de operación a gran escala (Tekucheva y Tsygankov 2012). Adicionalmente es recomendable una previa esterilización de los efluentes residuales debido al rápido crecimiento de la microbiota nativa que puede competir ó inhibir a las BPNS de lento crecimiento; condiciones de esterilidad permitirán el crecimiento del microorganismo deseado. Es imprescindible hacer notar que la selección del método de esterilización puede hacer variar las condiciones del sustrato como lo han demostrado los estudios de Seifter *et al.* (2010), probando cuatro distintos métodos de esterilización de residuos lácteos: iluminación UV, tratamiento térmico a 50 °C, tratamiento con peróxido de hidrógeno 1%, y esterilización térmica.

5.4 Sistemas combinados para incrementar la conversión de sustratos

En términos generales, la eficiencia en la producción de hidrógeno es baja, cuando es posible en teoría obtener 12 mol de hidrógeno por mol de glucosa (6) esto no

sucede en realidad ya que los procesos biológicos derivan energía en crecimiento u otras actividades metabólicas. En la fermentación oscura la glucosa no es reducida en su totalidad, generando al final ácido acético y un bajo rendimiento en la producción de hidrógeno (7). Por su parte las BPNS no asimilan fácilmente glucosa o sustratos complejos, pero reducen ácidos orgánicos gracias a la energía de fuentes luminosas cuando crecen en condiciones anoxigénicas (8). Una combinación de ambos procesos biológicos (Figura 4) permitiría que los bio productos de una primera etapa sean sustratos para microorganismos en una segunda etapa, y en consiguiente se incrementaría la eficiencia en el uso de la

energía y conversión de sustratos (Hallenbeck et al. 2011).



La finalidad de los procesos combinados es emplear la fermentación oscura como primer etapa en la producción de hidrógeno, reduciendo sustratos complejos hasta ácidos orgánicos o AGVs que serán empleados por BPNS para continuar la producción de hidrógeno con mayores rendimientos en la conversión de sustratos (Adessi et al. 2012b).

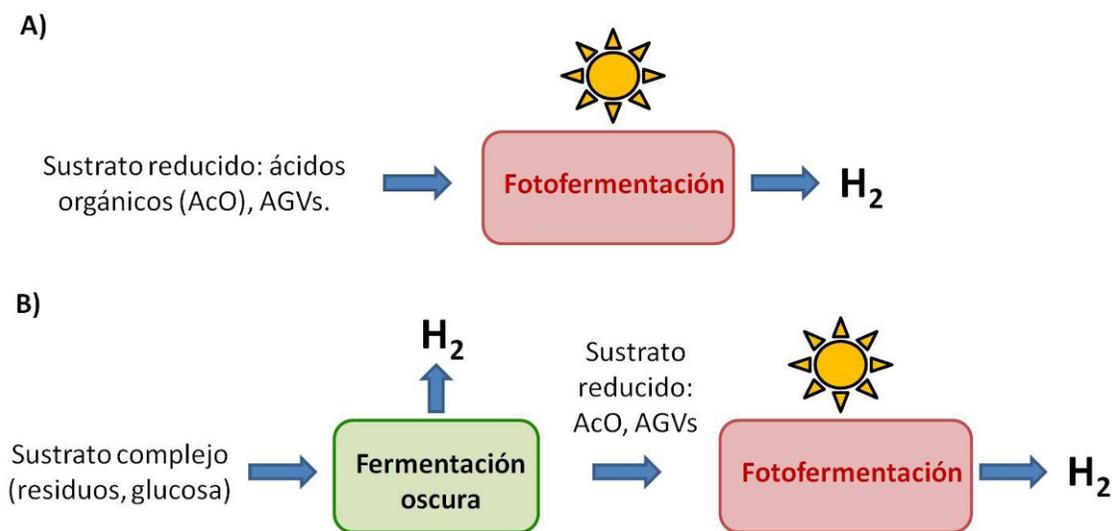


Figura 4. Diferencia entre A) sistema de una etapa, y B) sistema de dos etapas.

La gran ventaja es que una gran variedad de sustratos se pueden emplear directamente para la fermentación oscura. Sin embargo ya que se trata de sistemas combinados hay que tener en cuenta algunas consideraciones. De acuerdo con Tekucheva y Tsygankov (2012) se pueden definir algunos de los principales criterios a considerar cuando se emplean sistemas combinados:

- 1) *Diferencias de pH óptimos:* la fermentación oscura tiene mayores rendimientos cuando opera en valores ente 4.5-6.0; por su parte la fotofermentación se encuentran en rangos entre 6.5-9. Si es necesario, el pH debe ser ajustado previo a la fotofermentación.
- 2) *Turbidez de efluentes:* generalmente los efluentes de fermentación oscura contienen gran cantidad de partículas

suspendidas (células, esporas, sólidos) que reducen la cantidad de luz que puede penetrar y que es necesaria en la fotofermentación. Esto determina que sea necesario en algunas ocasiones centrifugar o filtrar el efluente de fermentación oscura.

3) *Altas concentraciones de amonio*: en algunas ocasiones durante la fermentación oscura se puede incrementar los niveles de amonio el cual puede inhibir o reducir la actividad de la enzima nitrogenasa. Si es necesario se deben realizar diluciones para reducir las altas concentraciones de amonio.

4) *Presencia de compuestos tóxicos o falta de elementos esenciales*: como parte de su metabolismo, las bacterias fermentativas pueden liberar compuestos que sean tóxicos o inhiban el crecimiento de BPNS; por otra parte en algunas ocasiones (o la mayoría) el efluente será pobre en elementos esenciales, en especial para la función de la nitrogenasa como Mo o Fe, la adición de éstos elementos representará mayor producción de hidrógeno.

5) *Concentración de ácidos orgánicos*: esta puede variar ampliamente según las condiciones de fermentación oscura y bacterias empleadas; también el aprovechamiento de ácidos orgánicos varía entre especies de BPNS, siendo malato, lactato y acetato los más empleados. Debe considerarse que altas cargas orgánicas pueden inhibir el crecimiento y reducir el acceso de luz al medio, así como la falta de fuentes de carbono repercutirá con crecimiento deficiente.

En algunas ocasiones los efluentes de fermentación oscura deben ser ampliamente tratados antes de pasar a la fotofermentación, lo cual tiene como inconveniente invertir más recursos y tiempos en cada una de las operaciones. Por lo tanto aunque con amplias

expectativas en principio, las estrategias de dos pasos aún requieren mayor investigación y desarrollo.

Una estrategia alternativa entre los sistemas híbridos es el uso de co-cultivos donde la fermentación oscura y la fotofermentación ocurren simultáneamente en el mismo reactor. La principal ventaja de esta estrategia es el aprovechamiento de sustrato instantáneo, no requiere de fases separadas, y la acidificación de la fermentación oscura puede ser balanceada mediante la alcalinización de la fotofermentación. Aún cuando puede parecer bastante atractiva la estrategia los resultados en el uso del sustrato pueden ser variables y se sospecha que pueda generar competencia por diversos recursos dentro del reactor (Zhue *et al.* 2002).

5.5 Ingeniería genética

Las herramientas que provee la ingeniería genética han sido empleadas en el diseño de estrategias y modificaciones en BPNS para incrementar los rendimientos de producción y sobrepasar algunos inconvenientes que se mencionaron antes. Principalmente se pueden distinguir cuatro estrategias que son resumidas a continuación y se muestran en la Figura 5.

5.5.1 Reducción de pigmentos del complejo de almacenamiento de luz (CAL).

En condiciones de alta radiación luminosa se genera saturación en la producción de hidrógeno, dado que el aparato fotosintético genera cantidades excedentes de ATP y Fd que sobrepasan la capacidad de la Nitrogenasa. Aunado a esto, existe otro proceso que decrece la productividad de hidrógeno, conocida como “efecto sombra”, cuando la penetración de luz es limitada por un exceso de pigmentos fotosintéticos, limitando el paso de la luz a las partes

más interiores del reactor (Eroglu y Melis 2011). En ambos eventos para incrementar la eficiencia la cantidad de pigmentos del CAL es considerada un elemento clave.

Un gran CAL en el aparato fotosintético es usual en todos los organismos fotosintéticos porque representa ventajas al proveer la capacidad de competir por la luz cuando es un recurso escaso, sobre todo en profundidades usuales donde habitan las BPNS. Desafortunadamente este efecto es contra productivo en los reactores para la producción de hidrógeno, donde la energía luminosa no es bien aprovechada por efecto de la saturación y competencia que se genera por las grandes cantidades de pigmentos en BPNS.

Un método que ha mostrado resultados para sobrepasar este inconveniente es la reducción de pigmentos fotosintéticos del CAL. Los estudios de Kondo *et al.* (2002) mostraron que la mutante *R. sphaeroides* MTP4 con pigmentos reducidos, producía 50% más hidrógeno que la cepa silvestre *R. sphaeroides* RV en un fotobioreactor de placa plana. Posteriormente los trabajos de Kondo *et al.*, 2006, usando la mutante *R. sphaeroides* MTP4 y la cepa silvestre en un fotobioreactor multicapas, mostraron que la mutante lograba máximos de producción de 2.01 LH₂/m²h mientras la cepa silvestre de 1.8 LH₂/m²h, concluyendo que la mutación permito mayor aprovechamiento de la luz.

5.5.2 Bloqueo de rutas de acumulación poli-hidroxi-butirato (PHB)

El PHB es un polímero reservorio de energía y carbono que se encuentra en una gran variedad de microorganismos cuando se enfrentan a condiciones ambientales estresantes (Vincenzini *et al.* 1997). De este modo, en condiciones de estrés por falta de nutrientes, en ausencia de crecimiento, y cuando la luz y ácidos

orgánicos son las fuentes de energía, se acumulan considerables cantidades de PHB (Melnicki *et al.* 2009). Algunos trabajos han mostrado que la síntesis de PHB puede competir con la producción de hidrógeno por electrones y distribución de la energía (Wu *et al.* 2012).

Aún cuando la teoría apunta a la pérdida de la energía por esta ruta, las mutaciones de los genes *Phb* (Kim *et al.* 2006) y *PHA* (Franchi *et al.* 2004) de *R. sphaeroides*, involucrados en la síntesis de PHB, no han mostrado grandes incrementos en la producción de hidrógeno; aunque si se les combina con la mutación de genes *hup* de la hidrogenasa (comentada en la siguiente sección), la mutación genera rendimientos considerables de hidrógeno.

5.5.3 Inactivación de hidrogenasa consumidora

Como se mencionó anteriormente, las BPNS poseen hidrogenasas consumidoras, que se encargan del reciclaje del hidrógeno producido por la nitrogenasa. Aunque es conveniente para las bacterias disponer de una fuente de reciclaje electrones, no lo es en los procesos de producción de hidrógeno. Existen trabajos donde se ha explorado suprimir la hidrogenasa mediante la mutación de los genes *hup*, involucrados en su formación (Eroglu y Melis 2011).

En trabajos de Ooshima *et al.* (1998), la mutante *R. capsulatus* ST410, carente de actividad hidrogenasa, lograba un 68% de aprovechamiento de malato como fuente de carbono en producción de hidrógeno; por su parte la cepa silvestre *R. capsulatus* B100 aprovechaba 25% del mismo recurso en la producción. En trabajos de Kim *et al.* (2006), probando una doble mutante de *R. sphaeroides* (*Hup*⁻/*Phb*⁻) con malato como sustrato, la mutante generaba 2.2 veces más hidrógeno que la cepa silvestre *R. sphaeroides* KD131, 3.13 y 1.32 ml H₂/mg peso seco, respectivamente. Por su

parte, Franchi *et al.* (2004), realizaron estudios sobre producción de hidrógeno con mutantes de *R. sphaeroides* RV con una mutación (Hup⁻) y doble (Hup⁻/PHA⁻), cuando emplearon ácido láctico como fuente de carbono ambas mutantes mostraron incrementos en las tasas de producción de hidrógeno, 30% y 36% respectivamente, comparados con la cepa silvestre.

5.5.4 Incrementar la tolerancia al amonio

Los residuos de efluentes anaerobios y sustratos de residuales generalmente contienen grandes concentraciones de iones amonio, que como ha sido comentado, inhiben la acción de la enzima nitrogenasa debido a la inactivación de los genes *NifA1*, *NifA2*,

anfA. Este mecanismo reduce la eficiencia en los sistemas híbridos y sustratos de bajo costo, ya que concentraciones (>1-5 mM) inhiben la expresión de la Nitrogenasa. Para incrementar la producción de hidrógeno y el aprovechamiento de éstos efluentes, el efecto inhibitorio del amonio debe ser superado (Pekgöz *et al.* 2011).

En estudios de Adessi *et al.* (2012c), se empleó una cepa mutante de *R. palustris* (*NifA**) que expresaba constitutivamente genes nitrogenasa. Usando residuos de fermentación vegetal con altas concentraciones de amonio (6.1 mM), se demostró que la cepa mutante *NifA** producía hidrógeno mientras que la cepa silvestre inhibía su producción.

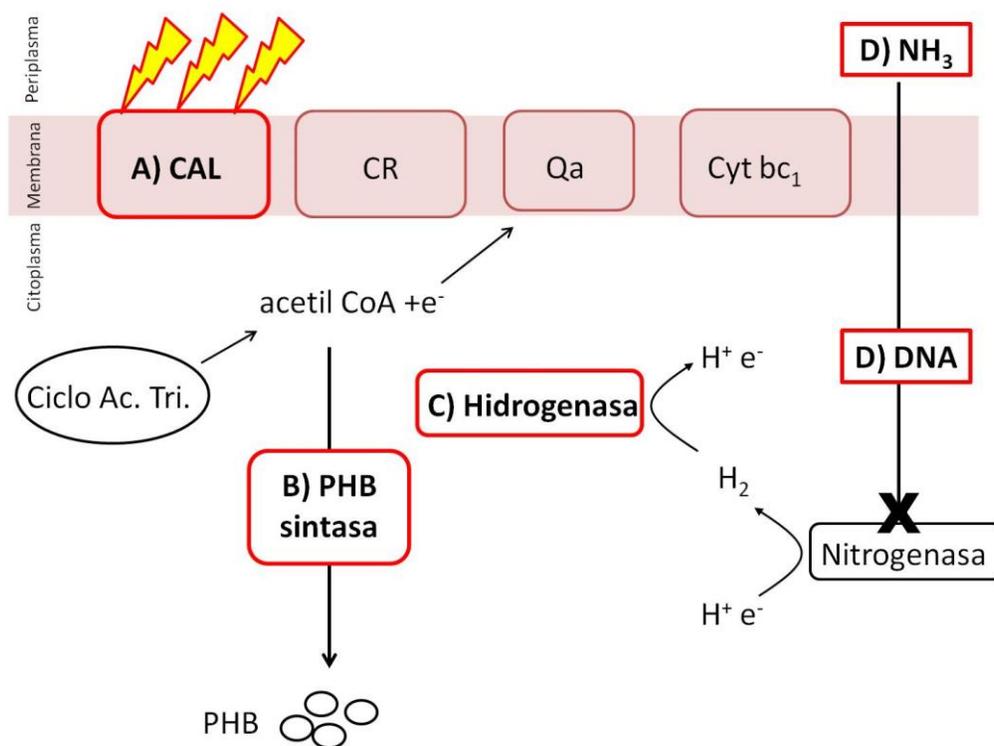


Figura 5. Estrategias de la ingeniería genética para incrementar la producción de hidrógeno en BPNS. A) Reducción de pigmentos del complejo de almacenamiento de luz (CAL), B) Bloqueo de rutas de acumulación poli-hidroxi-butirato (PHB), C) Inactivación de hidrogenasa consumidora, D) Incrementar la tolerancia al amonio. Se han eliminado algunos elementos del sistema para apreciar las rutas de interés.

Tabla 3. Algunos resultados y comparaciones de procesos para incrementar la producción de hidrógeno en BPNS.

Proceso	Micro-organismo	Fuente de carbono	Tasa máxima de conversión	Rendimiento conversión sustrato a H ₂	Referencia
Inmovilización en agar	<i>R. sphaeroides</i>	Agua residual producción de Tofu	15.9 ml H ₂ L ⁻¹ h ⁻¹	1.9 ml H ₂ /ml agua residual	Zhu <i>et al.</i> 1999
Inmovilización y co-cultivo con <i>C. bytiricum</i>	<i>R. sphaeroides</i>	Agua residual producción de Tofu	14.9 ml H ₂ L ⁻¹ h ⁻¹	2.2 ml H ₂ /ml agua residual	Zhu <i>et al.</i> 2002
Inmovilización y condiciones óptimas de sustrato y luz	<i>R. palustris</i> WP3-5	Acetato	43.8 ml H ₂ L ⁻¹ h ⁻¹	3.63 mol H ₂ /mol acetato	Chen y Chang 2006
Inmovilización en camas de alginato	<i>R. palustris</i> DSM 131	Benzoato	272 μmol H ₂ g peso seco ⁻¹ h ⁻¹	13.2 mol H ₂ /mol benzoato	Fißler <i>et al.</i> 1995
Reactor placa plana 8 L.	<i>R. sphaeroides</i> OU001	Malato	10 ml H ₂ L ⁻¹ h ⁻¹	4.6 mol H ₂ /mol malato	Eroglu <i>et al.</i> 2008
Reactor tubular 50 L.	<i>R. palustris</i> 42OL	Malato	27.2 ml H ₂ L ⁻¹ h ⁻¹	-	Adessi <i>et al.</i> 2012a
Sustrato bajo costo/fermentación oscura con <i>C. saccharolyticus</i>	<i>R. palustris</i>	Melaza de remolacha	7.1 mmol H ₂ L ⁻¹ h ⁻¹	4.2 mol H ₂ /mol sucrose	Ozgun <i>et al.</i> 2010
Sustrato de bajo costo	<i>R. sphaeroides</i> OU001	Residuo de olivo	9 ml H ₂ L ⁻¹ h ⁻¹	-	Eroglu <i>et al.</i> 2004
Sustrato de bajo costo	<i>R. capsulatus</i> JP91	Melaza de remolacha	5.13 ml H ₂ L ⁻¹ h ⁻¹	10.5 mol H ₂ /mol sucrosa	Keskin y Hallenbeck 2012
Mutante NifA*, resistente a amonio	<i>R. palustris</i> (NifA*)	Residuos fermentación vegetal (amonio 6.1 nM),	3.9 ml H ₂ L ⁻¹ h ⁻¹	1.23 mol H ₂ /mol ac. láctico	Adessi <i>et al.</i> 2012c
Mutante reducción pigmentos, reactor multicapas	<i>R. sphaeroides</i> MTP4	Lactato	2.01 L H ₂ m ⁻² h ⁻¹	-	Kondo <i>et al.</i> 2006
Mutante hidrogenasa/PHB	<i>R. sphaeroides</i> (Hup ⁻ /Phb ⁻)	Malato	3.34 ml H ₂ mg peso seco ⁻¹	-	Kim <i>et al.</i> 2006

Conclusión

La producción de hidrógeno mediante BPNS parece ser una opción prometedora por sus rendimientos en uso de sustrato, uso de luz que puede ser solar y la capacidad que tiene de aprovechar residuos orgánicos como fuente de carbono, incrementando de esta manera el valor del proceso por el consiguiente beneficio ambiental. Sin embargo todavía existen retos a superar antes de que estos procesos lleguen a ser una opción viable en la producción de hidrógeno.

Posiblemente los mejores resultados se logren con una combinación de factores como uso de sustratos residuales, sistemas que combinen tanto fermentación anaerobia como fotofermentación, uso de cepas modificadas y un mejor diseño de bioreactores para el aprovechamiento de la luz.

Open Access: This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC-BY 4.0) which permits any use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author(s) and the source are credited.

Referencias

- Abbasi, T., Abbasi, S. A. 2011. 'Renewable' hydrogen: Prospects and challenges. *Renew Sust Energ Rev* 15:3034-3040.
- Adessi, A., De Philippis, R. 2012. Hydrogen production: Photofermentation. In: P.C. Hallenbeck (Ed.) *Microbial Technologies in Advanced Biofuels Production*. Springer Science. New York Pp.53-75.
- Adessi, A., Torzillo, G., Baccetti, E., De Philippis, R. 2012a. Sustained outdoor H₂ production with *Rhodospseudomonas palustris* cultures in a 50 L tubular photobioreactor. *Int J Hydrogen Energ* 37:8840-8849.
- Adessi, A., De Philippis, R., Hallenbeck P.C. 2012b. Combined systems for maximum substrate conversion. In: P.C. Hallenbeck (Ed.), *Microbial Technologies in Advanced Biofuels Production*. Springer Science. New York. Pp. 107-126.
- Adessi, A., McKinlay, J.B., Harwood, C.S., De Philippis, R. 2012c. A *Rhodospseudomonas palustris* nifA* mutant produces H₂ from NH₄⁺ containing vegetable wastes. *Int J Hydrogen Energ* 30:1-8.
- Akkerman, I., Janssen, M., Rocha, J., Wiffels H., R. 2002. Photobiological hydrogen production: Photochemical efficiency and bioreactor design. *Int J Hydrogen Energ* 27:1195-1208.
- Basak, N., Das, D. 2007. The prospect of purple non-sulfur (PNS) photosynthetic bacteria for hydrogen production: The present state of the art. *World J Microbiol Biotechnol* 23:31-42
- Bicáková, O., Straka, P. 2012. Production of hydrogen from renewable resources and its effectiveness. *Int J Hydrogen Energ* 37: 11563-11578.
- Boran, E., Özgür, E., Burg, J., Yücel, M., Gündüz, U., Eroglu, I. 2010. Biological hydrogen production by *Rhodobacter capsulatus* in solar tubular photo bioreactor. *J Clean Prod* 18:S29-S35.
- Chen, C.Y., Chang, J.S. 2006. Enhancing phototropic hydrogen production by solid-carrier assisted fermentation and internal optical-fiber illumination. *Process Biochem* 41:2041-2049.

- Das, D., Veziroglu, T. N. 2008. Advances in biological Hydrogen production processes. *Int J Hydrogen Energ* 33: 6046-6057.
- Dasgupta, C. N., Gilbert, J.J., Lindblad, J., Heidorn, T., Borgvang, S.A., Skjanes, K., Das, D. 2010. Recent trends on the development of photobiological processes and photobioreactors for the improvement of hydrogen production. *Int J Hydrogen Energ*. 35:10218-10238.
- Eroglu, E., Gündüz, U., Yücel, M., Türker, L., Eroglu, I. 2004. Photobiological hydrogen production by using olive mill wastewater as a sole substrate source. *Int J Hydrogen Energ* 29:163-171.
- Eroglu, E., Tabanoglu, E., Gündüz, U., Eroglu, E., Yücel, M. 2008. Hydrogen production by *Rhodobacter sphaeroides* O.U.001 in a flat plate solar bioreactor. *Int J Hydrogen Energ* 33:531-541.
- Eroglu, E., Melis, A. 2011. Photobiological Hydrogen production: Recent advances and state of the art. *Bioresource Technol* 102:8403-8413.
- Fißler, J., Kohring, J.W., Giffhorn, F. 1995. Enhanced hydrogen production from aromatic acids by immobilized cells of *Rhodospseudomonas palustris*. *Appl Microbiol Biotechnol* 44:43-46.
- Franchi, E., Tosi, C., Scolla, G., Penna, G.D., Rodriguez, F., Pedroni, P.M. 2004. Metabolically engineered *Rhodobacter sphaeroides* RV strains for improved biohydrogen photoproduction combined with disposal of food wastes. *Mar Biotechnol* 6:552-565.
- Ghirardi, M. L., Posewitz, M. C., Maness, P-C, Dubini, A., Yu, J., Seibert, M. 2007. Hydrogenases and hydrogen photoproduction in oxygenic photosynthetic organisms. *Annu Rev Plant Biol* 58:71-91.
- Halbleib, C.M., Ludden, P.W. 2000. Regulation of biological nitrogen fixation. *J Nutr* 130(5):1081-1084.
- Hallenbeck, P. C, Abo-Hashesh, M., Ghosh, D. 2012. Strategies for improving biological hydrogen production. *Bioresource Technol* 110:1-9
- Hunter, C.N., Daldal, F., Thurnauer, M.C., Beatty, J.T. 2009. The purple phototrophic bacteria. In: Govindjee, S., Thomas, D. (Eds.) *Advances in Photosynthesis and Respiration* Vol. 28, Springer Science. New York. 1013 p.
- Imhoff, J.F., Trüper, H.G., Pfenning, N. 1984. Rearrangement of the species and genera of the phototrophic "purple nonsulfur bacteria". *Int J Syst Bacteriol* 34(3): 340-343.
- Imhoff, J. H. 1995. The anoxygenic phototrophic purple bacteria. In: Boone, D. R., Castenholz, R.W., Garrity, G. M. (Eds.) *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2nd ed. Springer, New York.
- International Energy Agency. 2010. *Energy Poverty. How to make modern energy access universal?* OECD/IEA.
- International Energy Agency. 2011. *CO₂ emissions from fuel combustion Highlights.* OECD/IEA.
- Intergovernmental Panel on Climate Change. 2005. *Carbon dioxide capture and storage.* Cambridge University Press.
- Intergovernmental Panel on Climate Change. 2007. *Climate Change 2007: Synthesis Report.* IPCC.
- Intergovernmental Panel on Climate Change. 2012. *Renewable Energy Sources and Climate Change Mitigation-Special Report of the Intergovernmental Panel on Climate*

- Change. Cambridge University Press.
- Kaiser, M. J. 2010. Marginal production in the Gulf of Mexico – I. Historical statistics & model framework. *Appl Energ* 87: 2535-2550
- Keskin, T., Abo-Hashesh, M., Hallenbeck, P.C. 2011. Photofermentative hydrogen production from wastes. *Bioresource Technol* 102:8557–8568
- Keskin, T., Hallenbeck, P. C. 2012. Hydrogen production from sugar industry wastes using single-stage photofermentation. *Bioresource Technol* 112:131-136.
- Kim, M-S, Baek, J-S, Lee, J. K. 2006. Comparison of H₂ accumulation by *Rhodobacter sphaeroides* KD131 and its uptake hydrogenase and PHB synthase deficient mutant. *Int J Hydrogen Energ* 31:121-127.
- Koku, H., Eroglu, I, Gündüz, U., Yücel, M., Türker, L. 2002. Aspects of the metabolism of hydrogen production by *Rhodobacter sphaeroides*. *Int J Hydrogen Energ* 27:315-1329.
- Kondo, T., Arakawa, M., Hiral, T., Wakayaka, T., Hara, M., Miyake, J. 2002. Enhancement of hydrogen production by a photosynthetic bacterium mutant with reduced pigment. *J Biosci Bioeng* 93(2): 145-150.
- Kondo, T., Wakayama, T., Miyake, J. 2006. Efficient hydrogen production using a multi-layered photo-bioreactor and a photosynthetic bacterium mutant with reduced pigment. *Int J Hydrogen Energ* 31:1522-1526.
- Melnicki, M.R., Eroglu. E., Melis, A. 2009. Changes in hydrogen production and polymer accumulation upon sulfur-deprivation in purple photosynthetic bacteria. *Int J Hydrogen Energ* 34: 6157- 6170.
- Madigan, M.T., Brock, T.D. 2009. Brock Biology of Microorganisms, 12th Ed. Pearson/Benjamin Cummings. Sn Francisco. 1061 p.
- Momirlan, M.; Veziroglu, T.N. 2002. Current status of hydrogen energy. *Renew Sust Energ Rev* 6:141-179.
- Nelson, D.L., and M. M. Cox, 2008, Lehninger Principles of Biochemistry 5th Ed. W.H. Freeman 1100 p.
- Niel, C.V. 1944. The culture, general physiology, morphology, and classification of the non-sulfur purple and brown bacteria. *Bacteriol Rev* 8(1):1-118.
- Özgür, E., Mars, A.E., Peksel, B., Louwerse, A., Yücel, A., Gündüz, E., Claassen, E.A.M., Eroglu, I. 2010. Biohydrogen production from beet molasses by sequential dark and photofermentation. *Int J Hydrogen Energ* 35:511-517.
- Öztürk, Y., Yücel, M., Daldal, F., Mandacı, S., Gündüz, E., Turker, L., Eroglu, I. 2006. Hydrogen production by using *Rhodobacter capsulatus* mutants with genetically modified electron transfer chains. *Int J Hydrogen Energ* 31:1545-1552.
- Protein Data Bank. 2002. Molecule of the month: Nitrogenase. RCSB.
- Protein Data Bank. 2009. molecule of the month: Hydrogenase. RCSB.
- Pekgöz, G., Gündüz, U., Eroglu, I, Yücel, M., Kovács, K., Rákhely, G. 2011. Effect of inactivation of genes involved in ammonium regulation on the biohydrogen production of *Rhodobacter capsulatus*. *Int J Hydrogen Energ* 36: 13536-13646.
- Perkins, S. 2013. Global temperatures are close to 11,000-year peak. *Nature* doi:10.1038/nature.2013.12564
- Seifert, K., Waligorska, M., Laniecki, M., 2010. Hydrogen generation in

- photobiological process from diary wastewater. *Int J Hydrogen Energ* 35: 9624-9629.
- Show, K.Y., Lee, D.J., Tay, J.H., Lin, C.Y., Chang, J.S. 2012. Biohydrogen production: Current perspectives and the way forward. *Int J Hydrogen Energ* 37: 15616-15631.
- Sorrell, S., Speirs, J., Bentley, R., Miller, R., Thompson, E. 2012. Shaping the global oil peak: A review of the evidence on field sizes, reserve growth, decline rates and depletion rates. *Energy* 37:709-724
- Uyar, E., Eroglu, I., Yücel, M., Gündüz, U., Türker, M. 2007. Effect of light intensity, wavelength and illumination protocol on hydrogen production in photobioreactors. *Int J Hydrogen Energ* 32:4670- 4677.
- Valdez-Vázquez, I., Poggi-Varaldo, H. M. 2006. Producción de hidrógeno: Una opción Biotecnológica. *En: Cuaderno de Tecnología N° 1. Tecnológico de Estudios Superiores de Ecatepec, México.*
- Vermeoglio, A., Jolit, P. 1999. The photosynthetic apparatus of *Rhodobacter sphaeroides*. *Trends Microbiol* 7(11): 435-440.
- Vincenzini, M., Marchini, A., Ena, A., De Philippis, R. 1997. H₂ and poly-β-hydroxybutyrate, two alternative chemicals from purple non sulfur bacteria. *Biotechnol Lett* 19(8):759-762
- Wu, S.C., Liou, S.Z., Lee, C.M. 2012. Correlation between bio-hydrogen production and poly-hydroxybutyrate (PHB) synthesis by *Rhodopseudomonas palustris* WP3-5. *Bioresource Technol* 113:44-50.
- Yáñez-Arancibia, A., Day, J. W., Hall S., C. A. 2010. Energía, economía y cambio climático: Ecuación insoluble. *Invest Amb* 2(1): 75-82.
- Zhua, H., Suzukia, T., Tsygankov, A.A., Asada, Y. Miyake, J. 1999. Hydrogen production from tofu wastewater by *Rhodobacter sphaeroides* immobilized in agar gels. *Int J Hydrogen Energ* 24:294-209.
- Zhua, H., Ueda, S., Asada, Y., Miyake, J. 2002. Hydrogen production as a novel process of wastewater treatment - studies on tofu wastewater with entrapped *R. sphaeroides* and mutagenesis. *Int J Hydrogen Energ* 27:1349-1357.