

GENERACIÓN DE BIOHIDRÓGENO POR UN PROCESO DE BIOFOTÓLISIS DIRECTA UTILIZANDO UN CULTIVO MIXTO DE MICROALGAS

Grupo de Investigación: ENERGÍA ALTERNATIVA

*Freddy Alfonso Moreno**, *Diego Rubio Fernández***

RESUMEN

Se desarrolló un proceso de biofotólisis directa para la producción de biohidrógeno empleando cultivos mixtos de microalgas verdes no axénicos, generados a partir de muestras tomadas del humedal Santa María del Lago (Bogotá, Colombia). El sustrato del cultivo de microalgas fue la materia orgánica contenida en su matriz original en el medio natural. Fue posible generar un volumen de gas hidrógeno de 8,5 ml a partir de volúmenes concentrados de microalgas de 250 ml obtenidos en dos muestras de agua en el humedal. Se transformó un volumen bajo del agua, resultado acorde con la literatura referenciada para la producción de hidrógeno a partir de este proceso. Sin embargo, se plantean problemas interesantes en cuanto a la generación de este vector energético y el desarrollo de tecnologías a nivel nacional.

Palabras clave: biohidrógeno, microalgas, biofotólisis directa, cultivos mixtos.

ABSTRACT

It was developed a process of Direct Biophotolysis for the Biohydrogen production using mixed cultures of non-axenic green microalgae generated from samples taken at the Wetland Santa Maria del Lago (Bogota, Colombia). The substrate for the cultivation of microalgae was the organic matter contained in the original matrix in the natural environment. It was possible to generate a volume of 8.5 ml of hydrogen gas from concentrated volumes of microalgae of 250 ml in two samples of water in the wetland. The maximum conversion percentage obtained was low, a result consistent with the literature referenced in the production of hydrogen from this process. However, there are interesting problems in the generation of this energy source and technology development at the national level.

Keywords: Biohydrogen, microalgae, direct biophotolysis, mixed culture.

Fecha de recibido: 16 de marzo de 2010 Fecha de aprobación: 18 de octubre de 2010

* Grupo de Investigación en Energías Alternativas (IENA). Fundación Universidad de América, Correo electrónico: freddy.alfonso@profesores.uamerica.edu.co

** Grupo de Investigación en Energías Alternativas (IENA), Fundación Universidad de América. Correo electrónico: diego.rubio@profesores.uamerica.edu.co

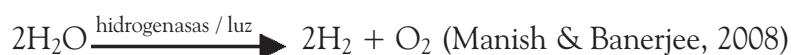
INTRODUCCIÓN

El hidrógeno es uno de los vectores energéticos que en la actualidad se propone como una solución a la crisis ambiental generada por el exceso en el uso de los combustibles fósiles. Mucha información referente al tema ha sido generada en países diferentes a Colombia. Manish & Banerjee (2008) hacen referencia a los procesos de generación de biohidrógeno y comparan los principales procesos usados en la actualidad. Estos autores concluyen que las eficiencias de los procesos de generación se incrementan significativamente cuando los productos derivados de los procesos son considerados en los modelos para determinar las eficiencias. Kovács, et al. (2006) utilizaron la bacteria fototrófica *Thiocapsa roseospirina*, concluyendo que ésta es capaz de generar cantidades significativas de biohidrógeno, por medio de modificaciones de su material genético. Jeong, et al. (2008) desarrollaron un ensayo para comparar cuatro tipos diferentes de bacterias y determinaron que la especie *Chlostridium beijerinckii* es la mayor productora de hidrógeno cuando se usa glucosa como sustrato. Melis & Melnicki (2006) desarrollaron una metodología integrada para la producción del combustible en cuestión basados en algas verdes unicelulares, el cual se acopla con bacterias púrpuras fotosintéticas con el objetivo de utilizar más eficientemente la radiación solar y favorecer la utilización de nutrientes en el proceso, disminuyendo costos en los etapas de producción. Ustak, et al. (2007) compararon dos métodos para la producción de hidrógeno, el fermentativo y el fotosintético, utilizando la bacteria *Chlostridium* y la especie de alga *Scenedesmus*. Estos autores concluyeron que el método fermentativo es más eficiente y permite el uso de desechos biológicos. Hankamer, et al. (2007) desarrollaron un biorreactor para la producción de biohidrógeno, controlando factores como los niveles de distribución de la luz y de nutrientes en un biorreactor, en un proceso de dos fases, separando el crecimiento fotosintético de la producción de hidrógeno, con lo cual evitaron la inhibición de la enzima hidrogenasa por el O₂.

La información generada en Colombia es poca, las principales referencias son el grupo de Investigaciones en Biotecnología Industrial de la Universidad Nacional de Colombia con sede en Medellín (Bedoya, et al., 2008) y el grupo de Procesos Biotecnológicos Medioambientales del Instituto de Planeación de Soluciones Energéticas (IPSE).

Las condiciones climáticas, así como de diversidad de organismos tales como las microalgas, hacen que Colombia tenga un potencial importante en generación de hidrógeno por medios biológicos. El hidrógeno es considerado como una de las formas de energía más prometedoras y sostenibles para el futuro. La viabilidad de este vector energético depende del desarrollo de procesos a escala que sean viables y generen la energía suficiente para reemplazar los procesos con base en gas natural, refinamiento de petróleo y gasificación del carbón (Ruppertch, et al., 2006).

Se desarrolló un proceso de generación de biohidrógeno por medio de biofotólisis directa a partir de microalgas colectadas en el humedal de Santa María del Lago, ubicado en el occidente de Bogotá, D. C. Este proceso se basa en la acción de las hidrogenasas, enzimas que metabolizan el hidrógeno. La reacción general del proceso es:



Este proceso usa la capacidad fotosintética de las algas verdes y cianobacterias de romper una molécula de agua por medio de la energía de la luz directamente absorbida y la transferencia de electrones a enzimas como las hidrogenasas (Kovács, et al., 2006). Es un proceso que requiere condi-

ciones especiales para la generación de hidrógeno porque la actividad de las hidrogenasas es muy sensible al oxígeno (Manish & Banerjee, 2008) que es liberado al medio durante el proceso de la fotosíntesis. La principal ventaja de los procesos de biofotólisis es que para la generación de hidrógeno sólo se requiere agua y luz (Hallenbeck & Benemann, 2002).

Según Esper, Badura & Rogner (2006), el proceso fotosintético utilizado por las microalgas verdes y el proceso de producción de hidrógeno, combinados con el proceso reverso del uso del hidrógeno como fuente de energía, ha sido optimizado en el transcurso de la evolución de estos microorganismos durante millones de años. El problema está en acoplar estos dos procesos para la generación de biohidrógeno, ya que estos son el resultado de presiones evolutivas diferentes.

El hidrógeno era la fuente de energía para las microalgas durante las etapas iniciales de la vida en el planeta tierra, en condiciones atmosféricas reductoras; es decir, en ausencia de oxígeno. Este ambiente anaerobio cambió cuando las plantas en general evolucionaron sus maquinarias fotosintéticas capaces de utilizar la luz incidente más eficientemente. Al perder su rol central de generación energética, no hubo presiones evolutivas para la generación de hidrogenasas resistentes al oxígeno, por lo que, con el incremento del nivel de oxígeno atmosférico, debido a los procesos de hidrólisis, estas enzimas se “apagaron”. Actualmente, las hidrogenasas existen en bacterias y microalgas, pero su actividad sólo se da en condiciones anaerobias (Esper, Badura & Rogner, 2006).

Se buscó realizar una aproximación inicial a la producción biológica de hidrógeno por medio de un proceso de biofotólisis directa, tomando microalgas de fuentes naturales. Las condiciones de Colombia son ideales para la generación de biohidrógeno por la diversidad de algas que se tiene y por las condiciones climáticas del trópico (Borrero, citado en Biocombustibles, 13, 2008).

Con base en los datos colectados durante el proceso y un análisis estequiométrico, fue posible determinar la cantidad de gases generada y el porcentaje de transformación de agua a H_2 y O_2 del proceso. El elevado pH de una de las muestras después de realizado el proceso sugiere que el oxígeno generado por la fotosíntesis de las microalgas se disolvió en el agua, permitiendo generar un biohidrógeno con mayor pureza; sin embargo, la acumulación del oxígeno en el sistema es un factor limitante y es una de las posibles causas por las cuales la cantidad de sustrato transformada fue baja.

MATERIALES Y MÉTODOS

Establecimiento de un cultivo mixto de microalgas

El proceso de biofotólisis directa se basa en procesos fotosintéticos llevados a cabo por microalgas o cianobacterias (Kovács et al., 2006). Para llevar a cabo el proceso se generó un cultivo mixto de microalgas y como sustrato se utilizó el mismo medio natural del humedal donde las algas fueron colectadas (Mohan, et al., 2008). La colecta de agua se llevó a cabo en dos puntos del humedal de Santa María del Lago, seleccionados al azar en la rivera del espejo de agua, un punto ubicado en la zona norte y el otro ubicado en la proximidad occidental. El volumen total de la muestra colectada fue de 10 litros en envases plásticos transparentes tipo PET, los cuales se dejaron durante 24 horas en contacto con la luz solar. El agua fue colectada aproximadamente a 20 cm (2-3 pies) de profundidad donde los microambientes anaerobios profusos son persistentes (Mohan, et al., 2008).

Para comprobar que a partir del agua colectada se podía desarrollar un proceso de biofotólisis en base a microalgas, se determinó la presencia de estos microorganismos por medio de una exploración microscópica de una muestra homogenizada. La muestra homogenizada se fijó en alcohol al 70% para su observación. La microscopia fue realizada con un microscopio óptico de 160X. Durante el proceso de observación las microalgas fueron identificadas taxonómicamente hasta familia, con base en el Atlas de Microorganismos de Agua Dulce (Streble & Krauter, 1987).

El volumen total de agua colectado se pasó por un sistema de filtración al vacío con un embudo Buchner y papel filtro del tipo Whatman filter paper No. 3 (Qualitative) de 7 cm de diámetro y 80 μm de diámetro de poro, con velocidad de filtración mediana y alta retención, Cat 1003070. La biomasa obtenida junto con el agua del humedal con sedimentos se depositó en erlenmeyers de 250 ml sellados (Figura 1), a los cuales se les extrajo el aire para generar un ambiente anaerobio ya que las hidrógenas presentes en las algas se inhiben en presencia de oxígeno (Hallenbeck & Benemann, 2002). Para iniciar el desarrollo de este proceso a través de microalgas, se tomó agua del humedal de Santa María del Lago procurando buscar puntos en los cuales se observarían sedimentos (Figura 2). Parte de esta agua fue homogenizada y preservada en solución de etanol 70%.

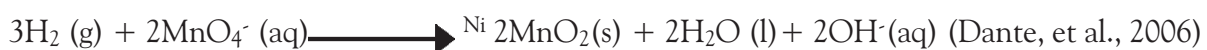


Fuente: los autores.

Figura 1. Filtración de las muestras de agua del humedal y preparación del concentrado de microalgas para el inicio del cultivo.

Generación y medición del volumen de biohidrógeno generado

La producción de biohidrógeno se verificó cualitativamente (Dante, et al., 2006), tomando un volumen del gas producido para luego hacerlo reaccionar en presencia de permanganato de potasio diluido a una concentración 0,6 molar según la reacción:



Para determinar el volumen de gas generado por las algas, se utilizó un montaje experimental con un erlenmeyer de 250 ml de volumen en el cual se encontraban las microalgas con el sustrato, es decir, agua del medio natural. Éste estaba completamente sellado y al vacío, conectado por medio de



Fuente: los autores

Figura 2. Sector del humedal de Santa María del Lago donde se colectaron las muestras.

un tubo de vidrio a las probetas invertidas graduadas con capacidad volumétrica de 50 ml inmersas en un volumen de agua. La cantidad de gas generado se determinó según el volumen de agua desplazado. La medición del gas producido se verificó cada 24 horas. Después de realizado el proceso, se midió el pH del agua donde se habían desarrollado los cultivos de microalgas.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. Pruebas cualitativas de presencia de microalgas en muestras del humedal de Santa María del Lago

El uso de microalgas para diferentes aplicaciones tales como la producción de suplementos alimenticios, la extracción de ficocoloides como agar-agar o la purificación de aguas se encuentra en pleno desarrollo en la actualidad (Pulz & Gross, 2004). Uno de los procesos que se encuentran en investigación a nivel mundial (Hallenbeck & Benemann, 2002; Mohan, et al., 2008) es la generación de biohidrógeno a través de procesos fotosintéticos. Estos procesos se basan en la capacidad de las microalgas de tomar energía continuamente a través de sus fotosistemas I y II, los cuales permiten el paso de electrones hacia las hidrogenasas, donde se metabolizan a hidrógeno (Esper, Badura & Rogner., 2006).

En el proceso del transporte fotosintético de electrones en las microalgas verdes, los electrones y los protones son extraídos del agua por medio de la fotosíntesis y a través de sustrato endógeno por el proceso de clororrespiración (Melis & Chen, 2005, citados en Melis & Melinicki, 2006). La energía potencial de estos electrones aumenta en la membrana de los tilacoides, estructuras especializadas de algunas células vegetales, en las cuales se combinan los electrones con alto potencial energético con

los protones, generando H_2 . Debido a la enorme diversidad de las microalgas, este grupo de organismos representa una de las más prometedoras fuentes de nuevos productos y aplicaciones (Pulz & Gross, 2004).

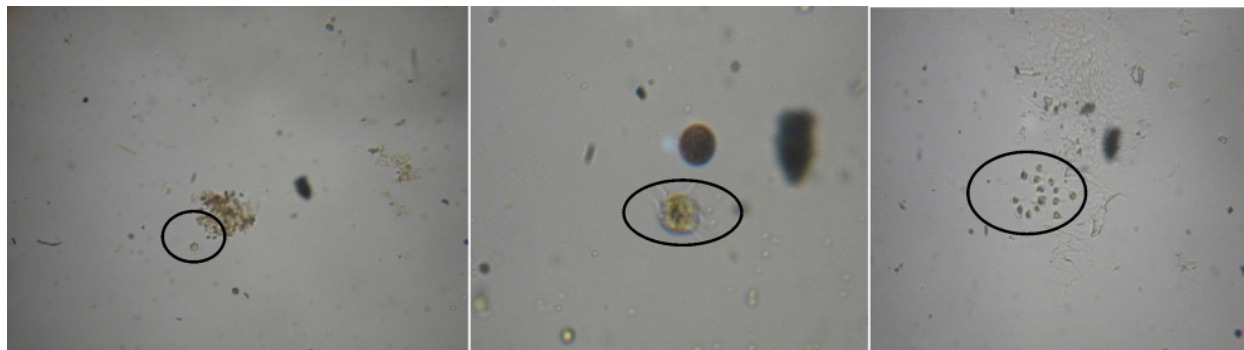
Los resultados cualitativos de la identificación a familia y en algunos casos a género se presentan en la Tabla 1. De las familias observadas, se ha reportado que las microalgas del género *Chlorella*.spp (Figura 3) tienen un potencial elevado para la generación de biohidrógeno; el género *Chlamydomonas* es el más utilizado para la generación de biohidrógeno; sin embargo, en las pesquisas al microscopio no se evidenció su presencia.

Tabla 1. Observaciones de microalgas realizadas en las dos muestras de agua tomadas en el humedal de Santa María del Lago.

Familia	Género
Algas verdes	<i>Dictyosphaerium</i>
	<i>Characium</i>
	<i>Chlorella</i>
Algas conyugadas	<i>Euastrum</i>
	<i>Straurastum</i>
	<i>Cosmarium</i>
Euglenófitos	Euglena

Fuente: los autores.

Los cultivos mixtos fotosintéticos de microalgas fueron utilizados por Mohan, et al. (2008) para la generación de biohidrógeno, estos cultivos mixtos de microalgas son aquellos en los que el hidrógeno se genera por diversas especies de algas. Mohan, et al. (2008) obtuvieron resultados favorables en la generación de H_2 , tomando como variables principales la degradación del sustrato, la presencia de vitaminas en el caso de cultivos con medios específicos, el pH y las condiciones de asepsia o no asepsia del cultivo. Basados en esta metodología, un cultivo mixto de microalgas se utilizó en condiciones anaerobias para el experimento de biofotólisis directa, favoreciendo la activación de las enzimas hidrogenasas, permitiendo la producción del gas combustible H_2 .



Fuente: los autores.

Figura 3. Algas unicelulares colectadas en el humedal de Santa María del Lago (*Chlorella*, *Euastrum*, *Dictyosphaerium*).

2. Mediciones del volumen del gas generado por los cultivos mixtos de microalgas en un proceso de biofotólisis directa

Según las observaciones realizadas (Tabla 2), se generó un volumen total de 8,5 ml de gas, 8 ml en la muestra No. 1 y solo 0,5 ml en la muestra No. 2; cualitativamente fue posible establecer que la muestra No. 1 tenía una mayor concentración de coloración verde, que indicó presencia de clorofila, como un indicador del crecimiento de la población de microalgas. La muestra No. 2 no mostró este tipo de coloración; sin embargo, se reporta una producción baja de gas al mismo tiempo de transcurrido el ensayo con respecto a la muestra No. 1 que se encontraba bajo las mismas condiciones; lo anterior es atribuible a la disponibilidad de nutrientes en el medio de cada una de las muestras, considerando que se usó como sustrato para las algas, su medio natural, es decir, agua con materia orgánica del humedal.

Tabla 2. Resultados del volumen de biohidrógeno obtenido

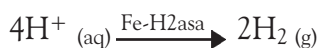
Horas desde inicio del proceso	Muestra 1	Muestra 2
24	No determinable	No determinable
48	Sin medición	Sin medición
72	Sin medición	Sin medición
96	8 ml	0,5 ml
120	8 ml (Mismo volumen)	0,5 ml (Mismo volumen)
144	8 ml (Mismo volumen)	0,5 ml (Mismo volumen)
168	8 ml (Mismo volumen)	0,5 ml (Mismo volumen)

Fuente: los autores.

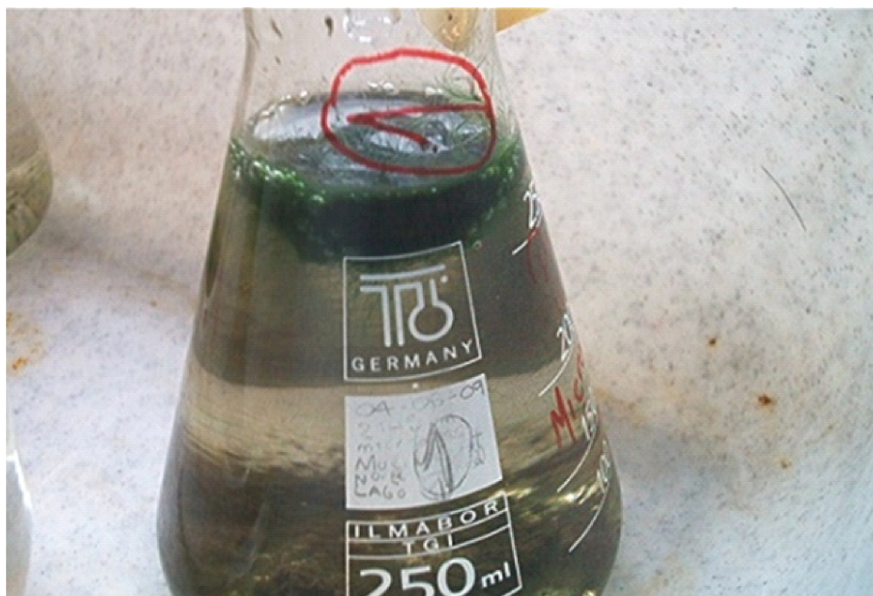
3. Transformación del agua del medio por biofotólisis directa a hidrógeno

Las algas verdes bajo condiciones anaeróbicas (Figura 4) usan H_2 como un donador de electrones en el proceso de fijación de CO_2 que se lleva a cabo durante la fotosíntesis. En la biofotólisis directa, el aparato fotosintético captura luz y de esta luz incidente, sólo el 10% es aprovechable. Esta energía es utilizada para que la planta genere el flujo de electrones que en el caso de la biofotólisis, divide la molécula de agua y sintetiza el H_2 molecular, es decir, el flujo de electrones es usado para provocar la división de una molécula de agua que genera un agente reductor de bajo potencial. Este reduce la enzima hidrogenasa generando la producción de hidrógeno molecular H_2 (Hallenbeck & Benemann, 2002), proceso llevado a cabo en las membranas de los cloroplastos, sitio donde se encuentran las hidrogenasas del tipo Fe- H_2 asa, cuya función es la producción de hidrógeno (Das, et al., 2006).

Bajo estas condiciones se consideran las siguientes reacciones químicas:



Para 250 ml de agua (13,88 moles)



Fuente: los autores.

Figura 4. Cultivo mixto de microalgas para la generación de biohidrógeno.

El gas que se generó se comporta como un gas ideal, a las condiciones de Bogotá (presión atmosférica de 560 Torr y una temperatura de 15°C).

$n = PV/RT = (0,73 \times 8 \times 10^{-3}L)/0,082 \times 288K = 2,5 \times 10^{-4}$ moles totales de gas generado (2,75 mg de O_2)/0,250 L = 11 ppm; considerando que la solubilidad del O_2 en agua es de 4 mg/L tenemos que se obtienen $1,75 \times 10^{-3}$ g sin disolver, equivalentes a $5,46 \times 10^{-5}$ moles de O_2 .

Tabla 3. Cantidad de hidrógeno y oxígeno producido en cada ensayo.

Muestra 1	Muestra 2
$1,64 \times 10^{-4}$ moles H_2	$1,03 \times 10^{-5}$ moles de H_2
$8,6 \times 10^{-5}$ moles O_2 (2,75 mg de O_2)	$5,15 \times 10^{-6}$ moles de O_2

Fuente: los autores.

Determinación de las moles de hidrógeno generado en el proceso

$$(2,54 \text{ moles de gas total}) - (5,46 \times 10^{-5} \text{ moles de } O_2) = (1,954 \times 10^{-4} \text{ moles de hidrógeno})$$

Considerando la estequiometría de la reacción, 2 moles de hidrógeno son producidos por 2 moles de agua; entonces, para generar $1,954 \times 10^{-4}$ moles de hidrógeno, reaccionaron la misma cantidad de moles de agua, equivalentes a $3,517 \times 10^{-3}$ gramos de agua.

Porcentaje de transformación de sustrato a O_2 y H_2 = (gramos de agua que reaccionan/gramos de agua total) x 100 = $(3.517 \times 10^{-3} \text{ g} / 250 \text{ g}) \times 100 = 1.406 \times 10^{-3} \%$ del agua fue convertida a hidrógeno.

Determinación del porcentaje de conversión en la muestra 2 (0.5 ml producidos)

Total = $1,54 \times 10^{-5}$ moles de gas total producido equivalentes a 0,5 ml

$nH_2 = 1,03 \times 10^{-5}$ moles

$nO_2 = 0,0$ moles obtenidos en la mezcla gaseosa

$1,03 \times 10^{-5}$ moles de H_2O_x (18 g/1 mol)

Porcentaje de transformación = (gramos de agua que reaccionan/gramos de agua total) x 100 = $(1,8 \times 10^{-4} \text{ g de } H_2O / 250 \text{ g de } H_2O) \times 100 = 0,07 \times 10^{-3} \%$ del agua se transformó en hidrógeno.

En general, es posible afirmar, con base en los datos colectados y los análisis, que se obtuvieron porcentajes de transformación muy bajos; sin embargo, la muestra 1 mostró una capacidad de transformación del agua en hidrógeno 58,65 veces más que la medida en la muestra 2, esta correlación se evidencia con la observación del crecimiento de las microalgas mostrado en la muestra 1 con respecto a la muestra 2.

Tabla 4. Valores de pH, volúmenes, masas y eficiencias de las muestras utilizadas para la generación de biohidrógeno.

Muestra	pH	Volumen total de gases	Masa de biohidrógeno	Moles de biohidrógeno	Porcentaje de transformación de agua en el medio a hidrógeno
1	7,5	8 ml	$3,28 \times 10^{-4} \text{ g}$	$1,954 \times 10^{-4}$	$1,406 \times 10^{-3}$
2	6,5	0.5 ml	$2,06 \times 10^{-5} \text{ g}$	$1,031 \times 10^{-5}$	0.07×10^{-3}

Fuente: los autores

Debido a la solubilidad del oxígeno en el agua, es probable que en el desarrollo de la reacción de biofotólisis directa, la enzima hidrogenasa presente en las microalgas haya sido inactivada, lo que explicaría la baja producción de hidrógeno en el proceso fotolítico.

La diferencia en los valores observados de pH (Tabla 4) se puede explicar por las diferencias en las cantidades de gas producido que indirectamente puede correlacionarse con la biomasa y la población de microalgas presentes en las muestras de agua, al existir más nutrientes disponibles en el medio, se observa un mayor crecimiento de los organismos fotosintéticos unicelulares, lo que se refleja en una mayor producción de los gases H_2 y O_2 .

La muestra 1 presentó un nivel más alto en la producción gaseosa, por ende se generó más oxígeno, el cual tendió a disolverse en el agua, por lo que el pH de la muestra 1 aumentó, comparado con el poco oxígeno producido y disuelto en la muestra 2.

En el experimento desarrollado se observó que la producción total de gas, es decir, O₂ y H₂, se dio en las primeras 96 horas del ensayo. Este resultado sugiere que el patrón de generación de biohidrógeno a escala de laboratorio tiene una curva que aumenta inicialmente pero tiende a estabilizarse por las condiciones del cultivo. Según Levin, Pitt & Love, (2004), la producción de hidrógeno por microalgas verdes requiere un tiempo que va desde unos minutos hasta varias horas de incubación anaeróbica en la oscuridad para inducir la síntesis y la activación de las enzimas involucradas en el metabolismo del H₂, dentro de las cuales se encuentran las hidrogenasas.

La enzima hidrogenasa responsable de la producción del H₂ molecular es altamente sensible al oxígeno, por lo que la producción fotosintética de H₂ y O₂ deben estar temporal y espacialmente separadas (Levin, Pitt & Love, 2004). Es decir, el oxígeno generado inhibe las hidrogenasas, por lo que una vez se produce este gas por medio de la reacción de biofotólisis, así como por la fotosíntesis, el proceso queda suspendido. La sensibilidad de las hidrogenasas al O₂ sigue siendo el problema principal de este proceso, un problema que no ha podido superarse desde hace 30 años. Sin embargo, está claro que las microalgas verdes poseen la maquinaria genética, enzimática, metabólica y de transporte de electrones para producir fotosintéticamente el H₂ gaseoso.

CONCLUSIONES

El ensayo realizado permitió determinar la cantidad de sustrato que fue transformado a H₂ y O₂ por medio de un proceso de biofotólisis directa. Los resultados obtenidos son concordantes con los reportados en la literatura en lo referente a las bajas eficiencias de los procesos fotosintéticos para la obtención de biohidrógeno.

Es posible la producción de hidrógeno por biofotólisis a partir de un medio natural como es el agua, por acción de cultivos de microalgas verdes en condiciones de laboratorio. Para aumentar las eficiencias y los rendimientos del proceso, es necesario probar otras condiciones entre las que se encuentran cultivos puros axénicos con microalgas que han sido identificadas y caracterizadas como productoras de hidrógeno a nivel ambiental, entre otras, la *Chlorella spp* o la *Chlamydomonas reidhartii*, el uso de medios de cultivo específicos para microalgas y la separación espacio-temporal de los gases oxígeno e hidrógeno durante el proceso.

BIBLIOGRAFÍA

- Bedoya, A., Castrillón, J.C., Ramírez, J. E., Vasques, J. E., Arias, M. (2006). *Producción biológica de hidrógeno: Una aproximación al estado del arte*. Dyna. Pp. 75-154.
- Biocombustibles, Boletín No. 110,2008 http://www.adnmundo.com/contenidos/bio/colombia_biocombustible_hidrogeno_nl13_14_01_2007_bio.html
- Dante, R. C., Armenta, S., Gutiérrez, M., Celis, J.(2003). Temporal phenomena of hydrogen photobio-production. *International Journal of Hydrogen Energy*. 29: 1219-1226.
- Das, D., Dutta, T., Nath, K., Kotay, S. H., Das, A., Veziroglu, N. (2006). Role of Fe-hydrogenase in biological hydrogen production. *Current Science* 90: 12.
- Das, D., Veziroglu, N. (2008). Advances in biological hydrogen production processes. *International journal of hydrogen energy*. 33: 1-12.

- Esper, B., Badura, A. & Rogner, M. (2006). Photosynthesis as a power supply for (bio-)hydrogen production. *Trends in Plant Science* 11: 11.
- Hallenbeck, P. & Benemann, J. (2002). Biological hydrogen production; fundamentals and limiting processes. *International Journal of Hydrogen Energy*. 27: 1185-1193.
- Hankamer, B., Lehr F., Rupprecht J., Mussgnug J., Posten C., Kruse, O. (2007). Photosynthetic biomass and H₂ production by green algae: from bioengineering to bioreactor scale-up. *Physiologia Plantarum*. 131: 10-21.
- Kovács, K. L., Bagyinta, Cs., Bodrossy, L., Csaki, R., Fodor, B., Gyorfi, K., Hanczar, T., Kalman, M., Osz, J., Perei, K., Poliak, B., Rakhely, Takacs, M., Toth, A., Tuzs, J. (2000). Recent advances in biohydrogen research. *European Journal of Physiology*. 439: 81-83.
- Kovacs, K., Maroti, G., Rakheli, G. (2006). A novel approach for biohydrogen production. *International Journal of hydrogen energy*. 31: 1460-1468.
- Levin, D., Pitt, L., Love, M. (2004). Biohydrogen production: prospects and limitations to practical application. *International Journal of Hydrogen Energy*. 29: 173-185.
- Manish, S. & Banerjee, R. (2008). Comparison of biohydrogen production processes. *International Journal of Hydrogen Energy*. 33: 279-286.
- Melis, A. & Melnicki, M. (2006). Integrated biological hydrogen production. *International Journal of Hydrogen Energy*, 31: 1563-1573.
- Melis, A. & Chen, H.C. (2005). Chloroplast sulphate transport in green algae: Genes, Proteins and Effects. *Photosynthesis research*. 86: 299-307.
- Mohan, V., Srikanth, S., Dinakar, P. & Sarma, P. N. (2008). Photo-biological hydrogen production by the adopted mixed culture: Data enveloping analysis. *International Journal of Hydrogen Energy*, 33: 559-569.
- Pulz, O. & Gross, W. (2004). *Valuable products from biotechnology of microalgae*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 65, 635-648.
- Rupprecht, J., Hankamer, B., Mussgnug, J., Ananyev, G., Dismukes, Ch., Kruse, O. (2006). Perspectives and advances of biological H₂ production in microorganism. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 72: 442-449.
- Streble, H. & Krauter, D. (1987). *Atlas de microorganismos de agua dulce*. Primera Edición. Editorial Omega.
- Ust ak, S., Havland, B., Muñoz, J., Fernandez, E., Lachman, J. (2007). Experimental verification of various methods for biological hydrogen production. *International Journal of Hydrogen Energy*. 32: 1736-1741.
- Yeong, T. Y., Cha, G. C., Yeom, S.H., Choi, S.S. (2008). Comparison of hydrogen production by four representative hydrogen-producing bacteria. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*. 14: 333-337.

