

Producción de hidrógeno mediante microorganismos extremófilos

Etchelet, Inés; Orientadora: Etchebehere, Claudia; Orientadora: Fuentes, Laura
etchelet.ines@gmail.com; cetchebehere@iibce.edu.uy; laurafuentes281@gmail.com

Laboratorio de Ecología Microbiana, Departamento de Bioquímica y Genómica Microbiana
Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable
Facultad de Ciencias
Universidad de la República

Resumen

Existe la necesidad de buscar fuentes de energía limpias y renovables, ya que por más de un siglo se han explotado los combustibles fósiles al punto de provocar graves problemas ambientales y agotamiento de las reservas de estos combustibles. El hidrógeno representa una de las alternativas a los combustibles fósiles. En el marco de una colaboración con investigadores de Brasil, se están estudiando las comunidades microbianas de dos reactores de producción de hidrógeno por fermentación oscura operados en condiciones extremas de temperatura (70°C, reactor termófilo) o pH (pH 3, reactor acidófilo). El objetivo de este trabajo fue aislar y caracterizar los microorganismos presentes en estos reactores para poder inferir cuál es su rol en la comunidad microbiana y por ende en la producción de hidrógeno. Se aislaron microorganismos anaerobios formadores y no formadores de esporas, aerobios y bacterias ácido lácticas, para lo que se utilizaron varias técnicas de aislamiento, medios de cultivo y condiciones de incubación. Los aislamientos se caracterizarán morfológicamente por tinción de gram y filogenéticamente por análisis de la secuencia del gen ARNr 16S. Para estudiar el metabolismo de los aislamientos se determinará el volumen, composición y concentración del gas generado mediante desplazamiento de agua y cromatografía de gases, y se determinará la concentración de metabolitos producidos por HPLC. También se evaluará la tolerancia al pH y el crecimiento a altas temperaturas de los microorganismos aislados del reactor acidófilo y termófilo, respectivamente. Hasta el momento se aislaron 54 microorganismos que están siendo caracterizados. Este conocimiento permitirá avanzar en el entendimiento de la producción biológica de hidrógeno.

Palabras clave: Bio-hidrógeno, fermentación oscura, energía sustentable, microorganismos termófilos, microorganismos acidófilos

Introducción

En la actualidad existe la necesidad de buscar fuentes de energía alternativas limpias y renovables, ya que por más de un siglo se han explotado los combustibles fósiles al punto de provocar graves problemas ambientales y agotamiento de las reservas de estos combustibles (Sinha & Pandey, 2011). El hidrógeno (H_2), considerado un vector de energía con un futuro prometedor, representa una de las alternativas a los combustibles fósiles (Azwar *et al.*, 2014). Es un gas valioso por su rol como fuente de energía efectiva, limpia y renovable (Trchounian & Trchounian, 2015). Posee la mayor cantidad de energía por unidad de masa de todos los combustibles (142 kJ/g) (Hay *et al.*, 2013) y su combustión no produce gases de efecto invernadero, siendo el agua el único subproducto (Das & Veziroglu, 2001). Además, puede ser producido a partir de fuentes ilimitadas como agua o desechos orgánicos (Trchounian & Trchounian, 2015).

A diferencia de los combustibles fósiles, el hidrógeno no se encuentra disponible en la naturaleza en su estado elemental sino formando parte de compuestos químicos como el agua o los hidrocarburos, los cuales deben ser transformados químicamente para obtener H_2 (Crabtree *et al.*, 2004). Esto, junto con la necesidad de desarrollar métodos de producción económicos, representa uno de los

mayores retos para su utilización (Nikolaidis & Poullikkas, 2017). Actualmente los métodos de generación de hidrógeno pueden ser agrupados en dos grandes categorías: convencionales, que involucran el uso de combustibles fósiles y por ende grandes cantidades de gases que producen efecto invernadero; y alternativos, que incluyen la producción de hidrógeno a partir de materias primas renovables, ya sea agua o biomasa (Kothari *et al.*, 2012).

Para que el hidrógeno sea un combustible limpio y sustentable debe provenir de procesos que minimicen o eviten las emisiones de CO_2 , tales como los procesos biológicos (Ghimire *et al.*, 2015). Estos pueden ser llevados a cabo por biofotólisis del agua, fermentación oscura, fotofermentación, o celdas de electrólisis microbianas (Hay *et al.*, 2013).

La fermentación oscura es un proceso llevado a cabo por microorganismos en ausencia de luz y oxígeno, mediante el cual un sustrato orgánico es convertido en ácidos grasos volátiles, CO_2 y H_2 (Hay *et al.*, 2013, Azwar *et al.*, 2014). Durante este proceso un 30-40% del sustrato es destinado a la producción de hidrógeno, y el 60-70% restante es convertido en otros metabolitos (Sarma *et al.*, 2015), entre los que se encuentran los ácidos grasos volátiles como el ácido acético, butírico y propiónico (Kapdan & Kargi, 2006). Muchos de los metabolitos pueden ser

recuperados ya que tienen valor comercial, e incluso el residuo líquido completo de la producción de hidrógeno puede convertirse en productos de valor agregado, como bioplásticos (Sarma *et al.*, 2015). La fermentación oscura presenta varias ventajas frente a otros procesos biológicos de producción de hidrógeno dada su simplicidad, la utilización de desechos orgánicos como sustrato y la independencia de una fuente de luz (Saratale *et al.*, 2008).

La producción de H_2 resulta de la necesidad de las células de eliminar el exceso de electrones producidos durante la degradación anaerobia de la materia orgánica (Toledo-Alarcón *et al.*, 2018). Para ello, los microorganismos reducen protones (H^+) a H_2 mediante la actividad de enzimas específicas llamadas hidrogenasas (Lee *et al.*, 2011). Dependiendo del microorganismo, la producción de hidrógeno se da por una de dos vías metabólicas diferentes: la vía de la piruvato:ferredoxina oxidorreductasa (PFOR, común en microorganismos anaerobios estrictos) o la vía de la piruvato:formato liasa (PFL, característica de microorganismos facultativos) (Cabrol *et al.*, 2017; Ramirez-Morales *et al.*, 2015). Un amplio número de microorganismos pertenecientes a diferentes grupos fisiológicos y taxonómicos son capaces de producir hidrógeno (con diferentes tasas y rendimientos) a partir de aguas residuales

(Lin *et al.*, 2012). Las bacterias productoras de hidrógeno (BPH) pueden ser divididas en tres grupos: i) bacterias anaerobias estrictas formadoras de esporas, ii) bacterias anaerobias estrictas no formadoras de esporas y iv) bacterias anaerobias facultativas (Cabrol *et al.*, 2017). Sin embargo, al utilizar cultivos mixtos como inóculo de los reactores de producción de H_2 por fermentación oscura, además de encontrarse BPH también se podrían encontrar microorganismos consumidores de H_2 , como los metanogénicos u homoacetogénicos, y/o microorganismos competidores por el sustrato orgánico, como las bacterias ácido lácticas (Toledo-Alarcón *et al.*, 2018).

Las comunidades microbianas productoras de hidrógeno pueden ser caracterizadas por una gran variedad de métodos, desde abordajes bioquímicos convencionales o microscopia hasta técnicas moleculares altamente específicas (Sinha *et al.*, 2016). Estas últimas permiten el estudio de las comunidades independientemente de la naturaleza cultivable de los microorganismos, lo que representa una ventaja frente al resto de las técnicas (Sinha *et al.*, 2016). A pesar de ello, el aislamiento de los microorganismos en cultivos puros permite generar conocimiento sobre su genética y metabolismo, el cual puede ser utilizado

para crear herramientas de mejoramiento de la producción de hidrógeno. Por ejemplo, Zhao *et al.* (2016) mediante ingeniería genética sobreexpresaron los genes de la subunidad mayor y menor de la hidrogenasa 3 de *Enterobacter aerogenes* con el objetivo de mejorar la producción de hidrógeno de este microorganismo. Los resultados mostraron que la actividad hidrogenasa, la producción de acetato y butirato, y los rendimientos de hidrógeno fueron significativamente mayores en las cepas modificadas genéticamente en comparación con la cepa salvaje. Además, los cultivos permiten realizar ensayos sobre las interacciones entre los diferentes microorganismos, lo que también conlleva al desarrollo de nuevas estrategias de mejoramiento.

En una colaboración entre el Laboratorio de Ecología Microbiana e investigadores de la Escuela de Ingeniería Química de Sao Carlos de Brasil, se están estudiando las comunidades microbianas de reactores de producción de hidrógeno operados en condiciones extremas de pH o temperatura, específicamente pH 3 y 70°C, respectivamente.

Objetivos

Aislar y caracterizar los microorganismos presentes en dos reactores de producción de hidrógeno operados en condiciones extremófilas de temperatura (70°C) o pH

(3). Determinar el posible rol de cada uno de estos microorganismos en el reactor conociendo su metabolismo.

Materiales y Métodos

1. Reactores estudiados

Reactor termófilo

Se operó un reactor de lecho fijo, mantenido a 70°C y alimentado con vinaza de caña de azúcar, la cual es generada como agua residual durante la producción de etanol de primera generación (Ferraz Jr. *et al.*, 2014). La vinaza se produce a altas temperaturas, por lo que la operación a 70°C evita el gasto energético y económico de enfriar este producto para utilizarlo como sustrato del reactor. Se tomaron cuatro muestras, dos de ellas de biomasa suspendida tomadas durante la operación, y otras dos al final de la operación, tanto de biomasa suspendida como adherida. Las muestras se conservaron a 4°C hasta su utilización.

Reactor acidófilo

El otro reactor, de configuración UASB flocular, fue operado a 30°C sin la adición de reguladores de pH, por lo que el pH dentro del reactor fue en promedio 2.7. El reactor fue operado sin control de este parámetro para evitar los costos que implica mantenerlo en valores cercanos a la neutralidad. Como sustrato se utilizó agua residual a base de sacarosa. En este caso, se tomaron muestras al final de la

operación. Una fue conservada a 4°C y la otra a -70°C con glicerol como crioprotector. Los métodos se adaptaron a las condiciones extremófilas correspondientes a cada reactor.

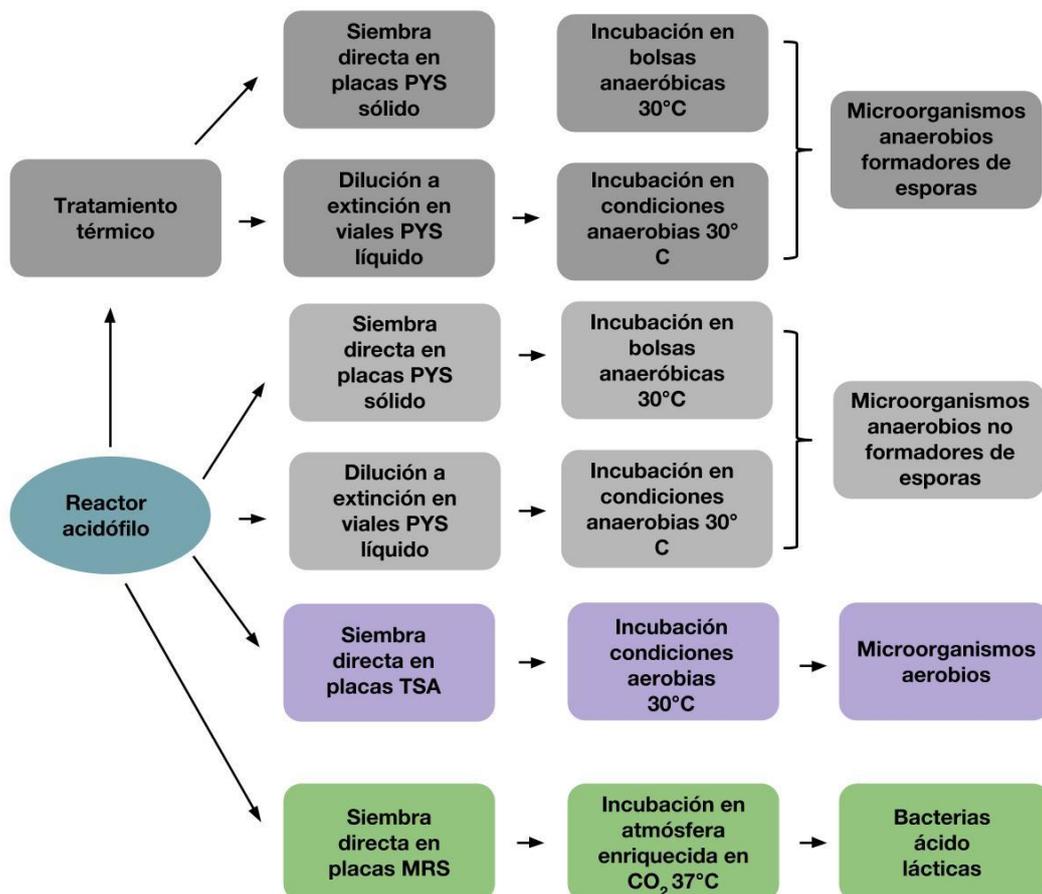
2. Aislamiento de los microorganismos

Las técnicas de aislamiento utilizadas se basaron en las propuestas por Fuentes et al. (2018), quienes en un trabajo previo realizado en el Laboratorio de Ecología Microbiana del IIBCE diseñaron estrategias para aislar los microorganismos preponderantes en los reactores de producción de hidrógeno. Con la metodología propuesta en dicho trabajo fue posible recuperar más del 80% de la diversidad de microorganismos presentes en estos reactores. Estos

2.1. Aislamiento a partir de las muestras del reactor termófilo

Aislamiento de microorganismos anaerobios

Para aislar microorganismos anaerobios a alta temperatura se realizó siembra directa de cada muestra en placas de petri con medio PYG sólido (composición: 10 g/L glucosa (Sigma-Aldrich, MO, USA), 5 g/L extracto de levadura (Difco Laboratories, Detroit, MI, USA), 5 g /L peptona (Difco Laboratories, Detroit, MI, USA), 5 g/L extracto de carne (Frigonal, Uruguay) y



Universidad Nacional de Cuyo | Mendoza | Argentina

17, 18 y 19 de octubre de 2018

agar al 15% (Sigma-Aldrich), pH ajustado a 6.8), las cuáles se incubaron en jarra para anaerobiosis (Oxoid™ AnaeroJar™ 2.5L). Las colonias crecidas se repicaron en carpa para anaerobiosis (Captair Pyramid 2200 A, Erlab) a viales con 10 ml de medio PYG líquido. A partir de cada vial crecido se hicieron dos repiques: uno para análisis del gas producido por cromatografía de gases, y otro para extracción de ADN. También se utilizó una segunda estrategia experimental para aislar este tipo de microorganismos que constó, en primer lugar, de la dilución hasta extinción de cada muestra mediante sucesivas diluciones 1:10 en viales con medio PYG líquido. Luego se seleccionó de cada muestra una de las diluciones con evidencia macroscópica de crecimiento y se repicó a vial con PYG sólido. Tras la incubación de los viales con medio sólido se realizó un repique en carpa para anaerobiosis a viales con medio PYG líquido, de los cuáles a su vez se realizó un nuevo repique a placas con medio PYG sólido que se incubaron en jarra para anaerobiosis. Por último, de las placas se repicaron colonias a viales con PYG líquido. Todos los cultivos mencionados hasta el momento se incubaron en un rango de temperatura entre 60 y 70°C. Por último, para aislar microorganismos anaerobios a 37°C se realizó siembra directa de las muestras en placas con PYG sólido, las cuales se incubaron en

bolsas anaeróbicas (Anaerocult® A mini, Merck, Germany). Las colonias crecidas en las placas se repicaron a viales, a partir de los cuáles se realizó un nuevo repique para extracción de ADN.

Aislamiento de microorganismos aerobios y aerobios facultativos

Para aislar microorganismos aerobios, se realizó siembra directa de cada muestra en placas con medio TSA (Acumedia, Lansing, MI, USA), las cuáles fueron incubadas en condiciones aerobias a 37°C. De cada placa se repicaron las colonias morfológicamente diferentes hasta obtenerlas de forma pura. Una vez en cultivo puro los aislamientos se repicaron a tubos de ensayo con 5 ml de medio TSB líquido y se incubaron en shaker a 37°C. Una vez crecidos, una parte del cultivo se destinó a la extracción de ADN y otra a formar parte del stock de cepas al guardarse en glicerol a -80°C.

Aislamiento de bacterias ácido lácticas

Para favorecer el crecimiento de las bacterias ácido lácticas se realizó siembra directa de las muestras en placas con medio MRS sólido (Difco Laboratories, Detroit, MI, USA), las cuáles se incubaron a 37°C en atmósfera enriquecida en CO₂. Para el stock de cepas y extracción de ADN se realizó el mismo procedimiento descrito para las bacterias aisladas en aerobiosis.

Universidad Nacional de Cuyo | Mendoza | Argentina

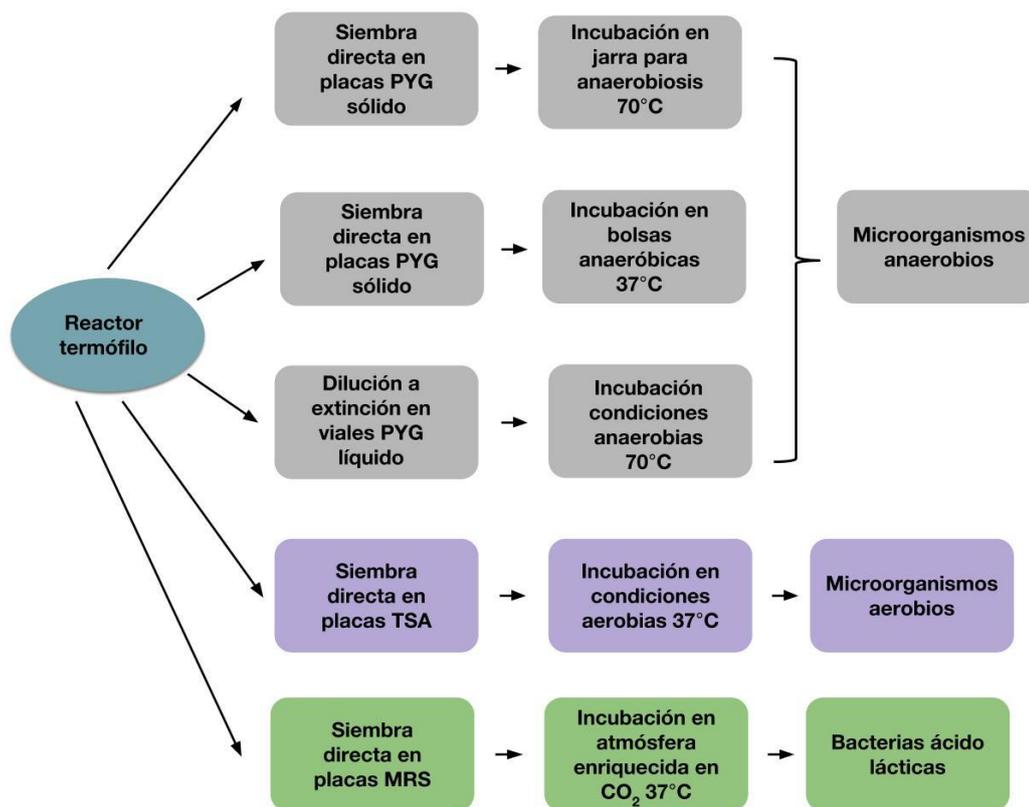
Todos los viales utilizados fueron gaseados con nitrógeno durante 5 minutos para generar condiciones anaerobias en su interior. Además, antes de ser inoculados se les inyectó solución reductora para eliminar cualquier posible resto de oxígeno.

Con el fin de focalizar el análisis a aquellos microorganismos que contribuyen en mayor medida a la comunidad microbiana y que, por ende, afectan directa o indirectamente la producción de hidrógeno, se seleccionarán las cepas que sean capaces de crecer a alta temperatura. Para ello, los microorganismos que fueron aislados a 37°C se incubarán a 70°C.

17, 18 y 19 de octubre de 2018

2.1. *Aislamiento a partir de las muestras del reactor mesófilo operado a pH3*

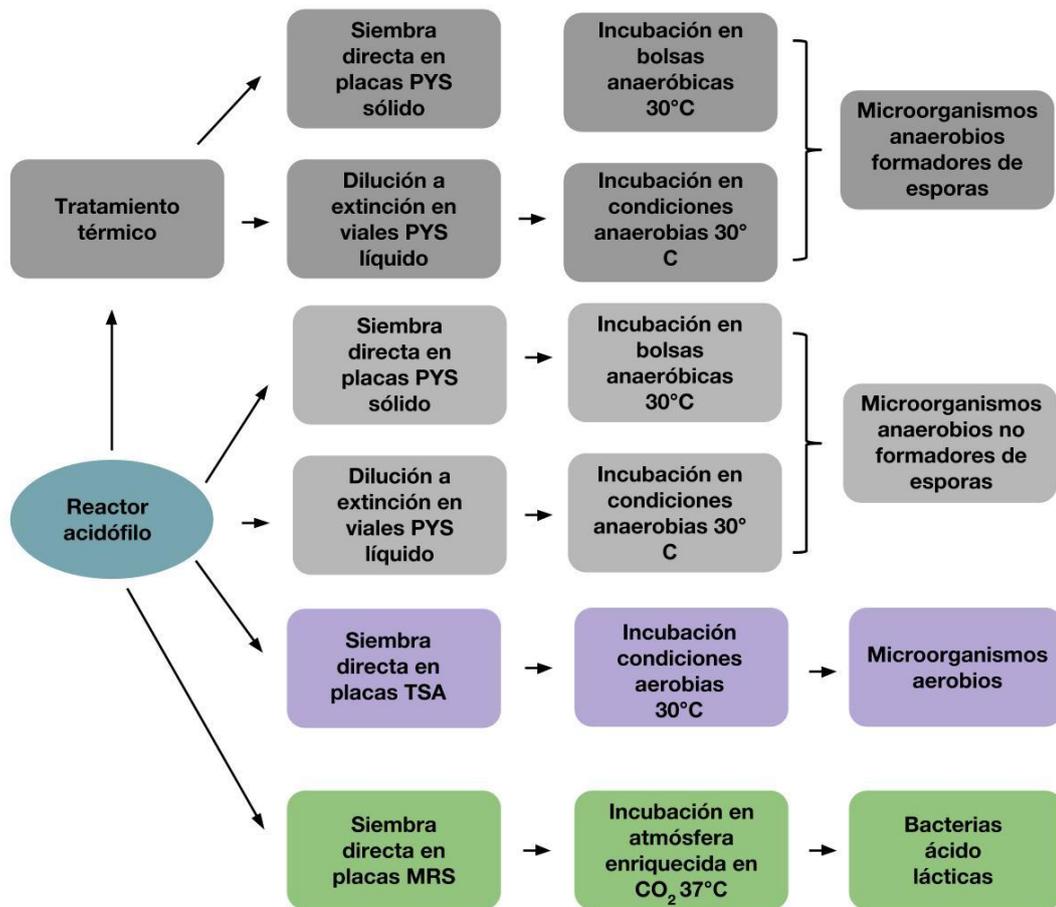
Los microorganismos anaerobios se aislaron por dilución hasta extinción en viales con medio PYS ajustado a pH 3 (la composición fue igual a la del medio PYG a excepción de la glucosa que se sustituyó por 5g/l de sacarosa). A partir de la última dilución que presentó crecimiento macroscópico se hicieron repiques a placas con medio PYS suplementado con agar (13%) a pH 7 (dado que el agar no solidificó a pH 3), las cuáles se incubaron en bolsas anaeróbicas. A partir de las placas se repicaron las colonias crecidas a viales con medio PYS líquido para el stock



de la cepa. Esta técnica se llevó a cabo utilizando las muestras con y sin tratamiento térmico previo, el cual constó de la exposición de las mismas a 90°C durante 15 minutos. El fin de este tratamiento fue eliminar las células vegetativas y seleccionar los microorganismos formadores de esporas. Para aislar microorganismos anaerobios también se realizó siembra directa de las muestras en placas con medio PYS a pH 7 incubadas en bolsas anaeróbicas, a partir de las cuáles se hicieron repiques a

viales con medio líquido para stock de las cepas. Nuevamente, este ensayo se realizó utilizando las muestras con y sin tratamiento térmico.

Por su parte, los microorganismos aerobios y bacterias ácido lácticas se aislaron siguiendo el mismo procedimiento utilizado en el caso del reactor termófilo, a excepción de la temperatura de incubación, ya que todos los cultivos provenientes de este reactor se llevaron a cabo a 30°C.



3. Caracterización filogenética de los aislamientos

Una vez obtenidos todos los aislamientos se procederá a la caracterización morfológica mediante tinción de Gram. Además, se realizará la caracterización filogenética mediante el análisis de la secuencia del gen del ARNr 16S. Para ello se realizará la extracción de ADN y se amplificará por PCR el gen ARNr 16S para su posterior secuenciación y análisis filogenético. La extracción de ADN se realizará utilizando el kit ZR Fungal/Bacterial DNA MiniPrep™ (Zymo

Research, CA, USA) siguiendo las instrucciones del proveedor.

4. Determinación del metabolismo de los microorganismos aislados

Se determinará la capacidad de producir hidrógeno de los aislamientos. Para ello se realizarán cultivos líquidos en medio rico y en condiciones anaerobias. Estos cultivos se incubarán en las condiciones adecuadas de temperatura de acuerdo al origen del aislamiento. Se medirá el volumen de gas producido por desplazamiento de agua y se determinará la concentración y composición del gas generado mediante cromatografía de gases. Se tomarán muestras del líquido al

inicio y final de cada experimento y se determinará la concentración de los metabolitos generados mediante HPLC en el servicio brindado por el IIBCE.

5. Estudio de tolerancia al pH y crecimiento a altas temperaturas de los aislamientos

En el caso de los microorganismos aislados a pH ácido se determinará su tolerancia a pH ácidos, y en el caso de los microorganismos aislados del reactor termófilo se determinará su temperatura óptima de crecimiento para verificar si son termófilos. Para ello se realizarán cultivos de los aislamientos en medios de cultivo con diferente pH o incubados a diferentes temperaturas. En estos experimentos se determinará la densidad óptica de los cultivos en función del tiempo utilizando un espectrofotómetro.

Resultados y Discusión

En total hasta el momento se cuenta con 61 aislamientos, de los cuales 30 corresponden al reactor termófilo y 31 al mesófilo operado a pH ácido (Tabla 1).

Los dos aislamientos anaerobios aislados a alta temperatura del reactor termófilo presentaron capacidad de producir H₂. Los microorganismos aislados en condiciones selectivas para bacterias ácido lácticas de dicho reactor, al incubarse en condiciones aerobias a alta temperatura no mostraron crecimiento.

Tabla 1. Número de aislamientos obtenidos de cada reactor.

Reactor	Microorganismos	n° aislamientos
Termófilo	Anaerobios 70°C	2
	Anaerobios 37°C	7
	Aerobios	14
	Bacterias ácido lácticas	7
Mesófilo	Anaerobios esporulados	2
	Anaerobios	14
	Aerobios	11
	Bacterias ácido lácticas	4

Bibliografía

Azwar, M. Y., Hussain, M. A., & Abdul-Wahab, A. K. (2014). Development of biohydrogen production by photobiological, fermentation and electrochemical processes: a review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 31, 158-173.

Bedoya, A., Castrillon, J. C., Ramirez, J. E., Vasquez, J. E., & ARIAS ZABALA, M. A. R. I. O. (2008). Producción biológica de hidrógeno: una aproximación al estado del arte. *Dyna*, 75(154).

Cabrol, L., Marone, A., Tapia-Venegas, E., Steyer, J. P., Ruiz-Filippi, G., & Trably, E.

(2017). Microbial ecology of fermentative hydrogen producing bioprocesses: useful insights for driving the ecosystem function. *Fems microbiology reviews*, 41(2), 158-181.

Chong, M. L., Sabaratnam, V., Shirai, Y., & Hassan, M. A. (2009). Biohydrogen production from biomass and industrial wastes by dark fermentation. *International journal of hydrogen energy*, 34(8), 3277-3287.

Crabtree, G. W., Dresselhaus, M. S., & Buchanan, M. V. (2004). The hydrogen economy. *Physics Today*, 57(12), 39-44.

Das, D., & Veziroğlu, T. N. (2001). Hydrogen production by biological processes: a survey of literature. *International journal of hydrogen energy*, 26(1), 13-28.

Fuentes, L., Braga, L., Castelló, E., & Etchebehere, C. (2018). Work scheme to isolate the different microorganisms found in hydrogen-producing reactors. *Journal of Applied Microbiology*, accepted for publication march 2018.

Ghimire, A., Frunzo, L., Pirozzi, F., Trably, E., Escudie, R., Lens, P. N., & Esposito, G. (2015). A review on dark fermentative biohydrogen production from organic

biomass: process parameters and use of by-products. *Applied Energy*, 144, 73-95.

Hallenbeck, P. C. (2009). Fermentative hydrogen production: principles, progress, and prognosis. *International Journal of Hydrogen Energy*, 34(17), 7379-7389.

Hallenbeck, P. C., Abo-Hashesh, M., & Ghosh, D. (2012). Strategies for improving biological hydrogen production. *Bioresource technology*, 110, 1-9.

Hay, J. X. W., Wu, T. Y., Juan, J. C., & Jahim, J. M. (2013). Biohydrogen production through photo fermentation or dark fermentation using waste as a substrate: overview, economics, and future prospects of hydrogen usage. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*, 7(3), 334-352.

Júnior, A. D. N. F., Wenzel, J., Etchebehere, C., & Zaiat, M. (2014). Effect of organic loading rate on hydrogen production from sugarcane vinasse in thermophilic acidogenic packed bed reactors. *International journal of hydrogen energy*, 39(30), 16852-16862.

Júnior, A. D. N. F., Etchebehere, C., & Zaiat, M. (2015). Mesophilic hydrogen production in acidogenic packed-bed reactors (APBR) using raw sugarcane vinasse as substrate: influence of support materials. *Anaerobe*, 34, 94-105.

Kapdan, I. K., & Kargi, F. (2006). Biohydrogen production from waste materials. *Enzyme and microbial technology*, 38(5), 569-582.

Kothari, R., Singh, D. P., Tyagi, V. V., & Tyagi, S. K. (2012). Fermentative hydrogen production—An alternative clean energy source. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 16(4), 2337-2346.

Lee, D. J., Show, K. Y., & Su, A. (2011). Dark fermentation on biohydrogen production: pure culture. *Bioresource technology*, 102(18), 8393-8402.

Lin, C. Y., Lay, C. H., Sen, B., Chu, C. Y., Kumar, G., Chen, C. C., & Chang, J. S. (2012). Fermentative hydrogen production from wastewaters: a review and prognosis. *International journal of hydrogen energy*, 37(20), 15632-15642.

Nikolaidis, P., & Poullikkas, A. (2017). A comparative overview of hydrogen production processes. *Renewable and sustainable energy reviews*, 67, 597-611.

Ramírez-Morales, J. E., Tapia-Venegas, E., Toledo-Alarcón, J., & Ruiz-Filippi, G. (2015). Simultaneous production and separation of biohydrogen in mixed culture systems by continuous dark fermentation.

Saratale, G. D., Chen, S. D., Lo, Y. C., Saratale, R. G., & Chang, J. S. (2008). Outlook of biohydrogen production from lignocellulosic feedstock using dark fermentation—a review.

Sarma, S. J., Pachapur, V., Brar, S. K., Le Bihan, Y., & Buelna, G. (2015). Hydrogen biorefinery: potential utilization of the liquid waste from fermentative hydrogen production. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 50, 942-951.

Sinha, P., & Pandey, A. (2011). An evaluative report and challenges for fermentative biohydrogen production. *International Journal of Hydrogen Energy*, 36(13), 7460-7478.

Sinha, P., Roy, S., & Das, D. (2016). Genomic and proteomic approaches for dark fermentative biohydrogen production. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 56, 1308-1321.

Tapia-Venegas, E., Ramirez-Morales, J. E., Silva-Illanes, F., Toledo-Alarcón, J., Paillet, F., Escudie, R., ... & Lin, C. Y. (2015). Biohydrogen production by dark fermentation: scaling-up and technologies integration for a sustainable system.

Reviews in Environmental Science and Bio/Technology, 14(4), 761-785.

Toledo-Alarcón, J., Capson-Tojo, G., Marone, A., Paillet, F., Júnior, A. D. N. F., Chatellard, L., ... & Trably, E. (2018). Basics of Bio-hydrogen Production by Dark Fermentation. In *Bioreactors for Microbial Biomass and Energy Conversion* (pp. 199-220). Springer, Singapore.

Trchounian, K., & Trchounian, A. (2015). Hydrogen production from glycerol by *Escherichia coli* and other bacteria: an overview and perspectives. *Applied Energy*, 156, 174-184.

Zhao, J., Song, W., Cheng, J., Liu, M., Zhang, C., & Cen, K. (2017). Improvement of fermentative hydrogen production using genetically modified *Enterobacter aerogenes*. *International Journal of Hydrogen Energy*, 42(6), 3676-3681.

Financiamiento

Apoyo a proyectos de investigación para estudiantes de Grado (APIPE), Sociedad Uruguaya de Microbiología.