



Ingeniare. Revista Chilena de Ingeniería

ISSN: 0718-3291

facing@uta.cl

Universidad de Tarapacá

Chile

Blanco Londoño, Sergio Andrés; Rodríguez Chaparro, Tatiana
Producción de biohidrógeno a partir de residuos mediante fermentación oscura: una revisión crítica
(1993-2011)
Ingeniare. Revista Chilena de Ingeniería, vol. 20, núm. 3, diciembre, 2012, pp. 398-411
Universidad de Tarapacá
Arica, Chile

Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=77225004014>

- Cómo citar el artículo
- Número completo
- Más información del artículo
- Página de la revista en redalyc.org

redalyc.org

Sistema de Información Científica
Red de Revistas Científicas de América Latina, el Caribe, España y Portugal
Proyecto académico sin fines de lucro, desarrollado bajo la iniciativa de acceso abierto

Producción de biohidrógeno a partir de residuos mediante fermentación oscura: una revisión crítica (1993-2011)

Biohydrogen production from wastes via dark fermentation: A critical review (1993-2011)

Sergio Andrés Blanco Londoño¹ Tatiana Rodríguez Chaparro¹

Recibido 22 de marzo de 2012, aceptado 13 de agosto de 2012

Received: March 22, 2012 Accepted: August 13, 2012

RESUMEN

El hidrógeno es una energía atractiva debido a su alto contenido energético y combustión amigable. Entre los diferentes mecanismos existentes para la producción de hidrógeno, la fermentación oscura es uno de los más interesantes debido a que se aprovechan residuos como materia prima. Actualmente, la investigación en hidrógeno se encuentra en desarrollo, sin embargo, los resultados no han sido concluyentes, existiendo aún un vacío en los factores que se deben tener en cuenta y sobre todo no se ha llegado al nivel máximo de producción. En este sentido, este trabajo pretende, por medio de una revisión crítica de estudios realizados en el periodo 1993-2011, mostrar los factores más estudiados, configuraciones más empleadas y los principales resultados en este tema. Con base en esto, se encontró no sólo la necesidad de optimizar los factores que influyen en la producción, sino también la necesidad de incrementar la realización de estudios en escala real y régimen continuo.

Palabras clave: Biohidrógeno, energía renovable, fermentación oscura, optimización, residuos.

ABSTRACT

Hydrogen is an attractive energy source due to its high energy content and friendly combustion. Among the various mechanisms for hydrogen production, dark fermentation is one of the most interesting, because it uses the wastes as feedstock. The research on hydrogen production is to date in study, but the results are not yet conclusive. In this sense, this paper aims to do a critical review between 1993 and 2011 to show the most studied factors, the configurations most employed and the main results on this topic. Our findings showed the need, not only to optimize the factors that influence the production, but also to do more studies on real scale and in continuous flow.

Keywords: Biohydrogen, renewable energy, dark fermentation, optimization, waste.

INTRODUCCIÓN

El hidrógeno es una alternativa prometedora para reemplazar los combustibles convencionales porque es renovable y limpio y produce durante su combustión únicamente vapor de agua y energía. Además, posee el mayor contenido energético por unidad de peso, 122-142 kJ/g, comparado con cualquier combustible

conocido [1-2]. Sin embargo, el H₂ no está disponible en forma natural como los combustibles fósiles, por lo tanto el mayor interés está dado en la forma de producirlo y especialmente a partir de materiales renovables tales como la biomasa o el agua.

Actualmente, el 40% del gas H₂ se obtiene de la oxidación catalítica de gases naturales, el 30% de

¹ Laboratorio de Saneamiento. Programa de Ingeniería Civil. Universidad Militar Nueva Granada. C.P.: 110111. Bogotá, Colombia.
E-mail: sergio.blanco@unimilitar.edu.co; adela.rodriguez@unimilitar.edu.co

metales pesados y nafta, el 18% de carbón, el 4% de la electrólisis y cerca del 1% de biomasa [2]. Entre las formas de obtención de hidrógeno no está disponible en forma natural como las anteriormente mencionadas; la producción biológica a partir de biomasa presenta un mayor interés por ser potencialmente una forma de producción inagotable.

Los estudios en la producción de hidrógeno biológico se han enfocado principalmente en la biofotólisis del agua empleando algas y cianobacterias, la fotofermentación de compuestos orgánicos por bacterias fotosintéticas y la fermentación oscura de compuestos orgánicos ricos en carbohidratos mediante bacterias anaerobias; en la Figura 1 se muestra una breve comparación de estos procesos.

La obtención de hidrógeno por procesos fermentativos o fermentación oscura aparenta ser la más favorable puesto que se puede generar de forma continua y a altas tasas de producción comparado con los otros procesos biológicos [3-4]. Además, si se utiliza materia orgánica de residuos es posible obtener un producto con valor agregado a partir del tratamiento de un desecho. Los estudios en relación con la producción de hidrógeno vía fermentación oscura no presentan resultados conclusivos.

De acuerdo con lo anterior, en este artículo se pretende realizar una revisión crítica de la producción de biohidrógeno mediante la fermentación oscura de residuos. Igualmente, se explica todo el proceso de

obtención de este gas comenzado por la fermentación oscura, pasando por las rutas metabólicas hasta los factores que afectan la producción. Adicionalmente, se ha incluido una lista de diferentes estudios realizados y una discusión de estos para evidenciar cuáles han sido las condiciones experimentales más empleadas y qué resultados se han obtenido. Todo esto con el objetivo de presentar el estado del arte de la producción de biohidrógeno por fermentación oscura y con ello plantear retos y perspectivas futuras alrededor de este tema.

Fermentación oscura

La generación de biohidrógeno a través de la fermentación oscura se logra principalmente por bacterias estrictamente anaerobias o anaerobias facultativas. En general, son especies del género *Clostridium* formadoras de esporas, facultativas de los géneros *Enterobacter* y *Bacillus* [5-9], algunas bacterias termofílicas [10-12] y acidogénicas anaerobias provenientes de lodos [5,13].

Usualmente, los monosacáridos son la principal fuente de carbono donde se destaca particularmente la glucosa seguido de la xilosa, el almidón, la celulosa y otras fuentes que pueden ser generadas a partir de la hidrólisis de polisacáridos, proteínas y lípidos, por esta razón la reacción de biotransformación de la glucosa a ácido acético, H_2 y CO_2 (ecuación ((1)), es la ecuación ampliamente aceptada como referencia para la estimación de la producción teórica del hidrógeno fermentativo [1,14].

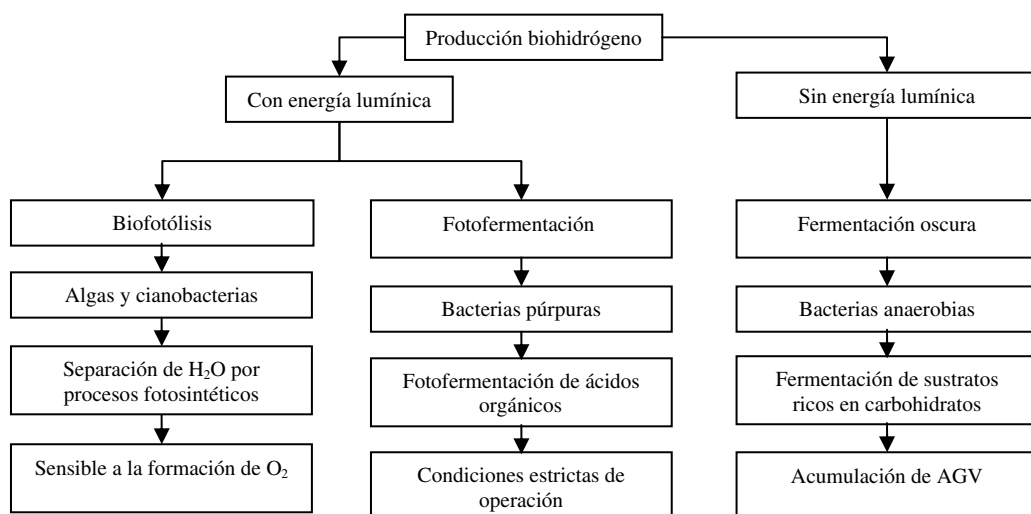
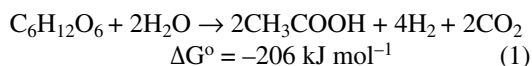
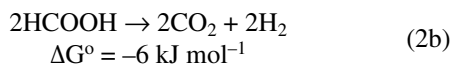
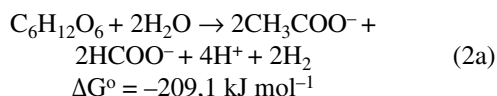


Figura 1. Comparación de los diferentes procesos de producción de biohidrógeno.



De acuerdo con esta reacción la producción máxima teórica de biohidrógeno a partir de la fermentación de la glucosa es de 4 moles de H_2 por mol de glucosa consumida cuando el ácido acético es el único ácido graso volátil (AGV) producido. En cuanto a la energía libre de Gibbs el valor negativo indica que en la reacción se forman productos espontáneamente sin necesidad de requerimientos energéticos externos.

La máxima producción teórica de hidrógeno también se puede lograr en un proceso de dos etapas mediante la fermentación de la glucosa a acetato y formiato de acuerdo con las reacciones 2a y 2b [15].



Sin embargo, en la práctica se obtienen bajas producciones de H_2 debido a que parte de la glucosa es empleada por los microorganismos para su sustento y crecimiento microbiano. Adicionalmente, cuando la transformación genera como subproducto ácido butírico se producen 2 moles de H_2 por mol de glucosa y si se genera ácido propiónico se produce un consumo de 1 mol de H_2 por mol de ácido propiónico generado [1]. La fermentación de ácido láctico y etanol no genera consumo ni producción de H_2 . Si se produce ácido acético y butírico al mismo tiempo como subproducto en la fermentación se generan 2,5 moles H_2 por mol de glucosa.

La presencia de consumidoras de H_2 tales como las bacterias homoacetogénicas, metanogénicas [15] y reductoras de nitratos y sulfatos son otro factor que reduce la producción de hidrógeno. Otros factores importantes que afectan el desempeño de la fermentación oscura están relacionados con las condiciones de operación tales como pH, tiempo de retención hidráulico, nutrientes, temperatura, concentración del sustrato, inóculo y tipo de sustrato.

La cantidad de hidrógeno obtenido por procesos fermentativos se puede cuantificar en términos de rendimiento y tasa. El rendimiento se define como la cantidad de H_2 producido por cantidad de

sustrato consumido y se expresa en unidades de mol H_2 /mol de glucosa. La tasa de producción de hidrógeno (TPH) se define como la cantidad de H_2 (ml) producido por unidad de tiempo y por unidad de volumen de reactor (tasa volumétrica) o por unidad de biomasa (tasa específica) [1].

Es importante mencionar que es posible ajustar matemáticamente la producción de hidrógeno por fermentación oscura mediante la ecuación modificada de Gompertz (ecuación (3)), la cual es un modelo adaptado para describir el progreso acumulativo de producción de H_2 en un experimento batch.

$$H = H_{\text{máx}} \exp \left\{ -\exp \left[\frac{R_{\text{máx}} \times e}{H_{\text{máx}}(\lambda - t)} + 1 \right] \right\} \quad (3)$$

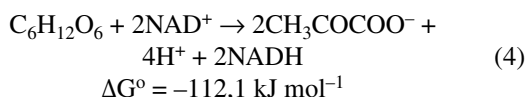
donde H corresponde a la producción acumulada de H_2 (ml), $H_{\text{máx}}$ a la producción acumulada máxima de H_2 en (ml), $R_{\text{máx}}$ la tasa de producción máxima de H_2 en (ml/h), t el tiempo del cultivo en (h) y λ el tiempo de retardo en (h) requerido para comenzar la evolución del H_2 . Esta ecuación ha sido empleada por diferentes autores [10, 16-18] con muy buenos ajustes $r^2 > 0,90$, donde se ha querido correlacionar resultados experimentales con un modelo matemático de tipo predictivo.

Rutas de producción de hidrógeno fermentativo

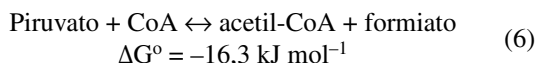
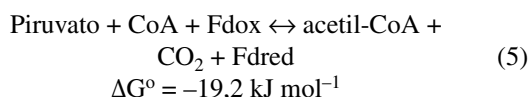
En ambientes anóxicos, los protones pueden actuar como un aceptor de electrones en presencia de la enzima hidrogenasa, la cual es clave en el proceso de catalización para la producción de H_2 [1-2]. En estas condiciones las bacterias anaerobias sin requerimientos de energía lumínica fermentan sustratos ricos en carbohidratos. En este proceso interactúan diversas clases de microorganismos, las cuales convierten la materia orgánica en otros compuestos, incluido el hidrógeno, y en nuevas células bacterianas. El proceso se divide en varias rutas metabólicas con la participación de diferentes grupos microbianos, cada uno con un comportamiento fisiológico distinto.

La formación de hidrógeno comienza con la hidrólisis de materiales particulados complejos en materiales disueltos más simples, entre ellos la glucosa, por bacterias fermentativas hidrolíticas. En este punto se desarrolla una serie de reacciones enzimáticas donde la glucosa es convertida a través de la vía

metabólica de la glucólisis también conocida como vía Embden-Meyer-Parnas (EMP) al ácido pirúvico, ecuación (4), a través de la cual 2 moles de hidrógeno pueden ser generados durante la regeneración del NADH ($\text{NADH} + \text{H}^+ \rightarrow \text{NAD}^+ + \text{H}_2$) [14, 19].



A continuación, el ácido pirúvico sufre un proceso de descarboxilación oxidativa por la coenzima acetil-CoA que dependiendo del sistema enzimático que tengan los microorganismos puede ser metabolizada en acetato, butirato o formiato de los cuales se generan entre 2 o 4 moles de H_2 /mol de glucosa consumida [15]. De esta manera el acetil-CoA se puede generar a través de dos reacciones, ecuación (5) o (6).



La reacción de la Ecuación (5) es catalizada mediante la enzima piruvato-ferredoxinoxidorreductasa, donde el ferredoxín es la coenzima que actúa como receptor de electrones [20]. El acetil-CoA puede además ser metabolizado a acetato (Figura 2a), o a butirato (Figura 2b), y en los dos casos de la

reoxidación de cada mol de ferredoxín se genera un mol de H_2 con la ayuda de la enzima hidrogenasa.

Si el acetato es el producto final, se genera un mol extra de H_2 de la reducción de cada mol de NADH a NAD^+ generando de esta manera una producción de H_2 total de 4 moles/mol de glucosa consumida. Si el butirato es el producto final, el NADH es empleado para la oxidación del acetil-CoA a butirato, por lo tanto la producción de H_2 será de 2 moles/mol de glucosa consumida. Dependiendo de las condiciones de cultivo así como del tipo de microorganismos, se puede generar simultáneamente acetato y butirato produciendo entre 2 y 4 moles de H_2 .

La otra manera de generación de acetil-CoA es como se muestra en la reacción de la Ecuación 6, la cual conduce a la formación de formiato [14]; la reacción que se presenta en la Figura 3 es catalizada por la enzima piruvato formiato liasa, donde se obtienen 2 moles de H_2 por mol de glucosa consumida.

Factores que afectan la producción de biohidrógeno

La producción de hidrógeno depende de varios factores, los cuales están asociados con condiciones ambientales, operacionales y químicas. Estos factores han sido evaluados por diferentes investigadores con el objetivo de obtener la máxima producción de 4 moles de H_2 por mol de glucosa. En esta sección se tratará cada uno de ellos explicando cómo afectan la producción de biohidrógeno.

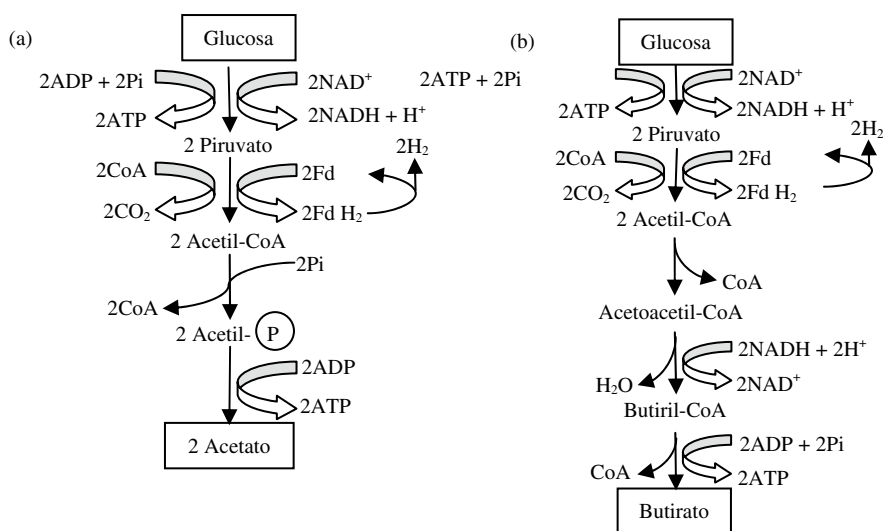


Figura 2. Generación de hidrógeno con producción de acetato (a) y butirato (b) a través de la ruta de la glucólisis. Adaptado de [14].

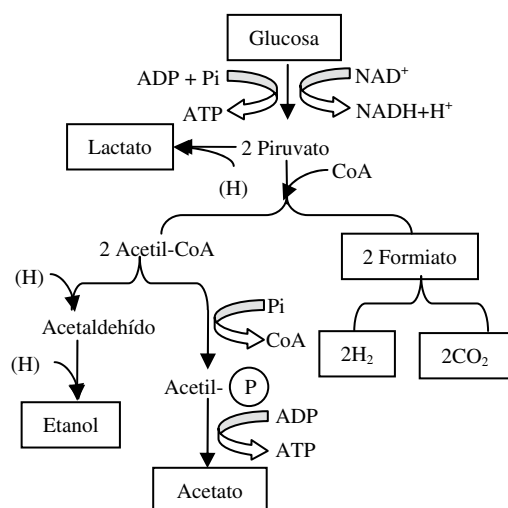


Figura 3. Generación de hidrógeno con producción simultánea de acetato, etanol, lactato y formiato a través de la ruta de la glucólisis. Adaptado de [14].

Inóculo

Para la obtención de H_2 se han empleado bacterias en cultivos puros y mixtos como inóculos que para el primer caso en su mayoría corresponden a especies del género *Clostridium* y *Enterobacter* [3, 21]. Los organismos de las diferentes especies del género *Clostridium* son bacilos gram-positivos, estrictamente anaerobios y formadores de esporas, mientras las *Enterobacter* son bacterias bacilos gram-negativas y anaerobias facultativas [21]. La mayoría de los estudios para la obtención de H_2 se han realizado con cultivos puros, en régimen batch y empleando glucosa como sustrato [2, 21].

Actualmente, los cultivos mixtos de bacterias de lodos anaerobios, lodos de plantas de tratamiento, compost y el suelo se han empleado como inóculo para la producción de H_2 [22], debido a que existe una amplia fuente de alimentos que los contienen y son potencialmente más resistentes a cambios en las condiciones ambientales en relación con los cultivos puros. Sin embargo, en la producción de H_2 empleando cultivos mixtos, el H_2 producido puede ser consumido. Por esta razón, para proteger las bacterias productoras de H_2 , el inóculo es pretratado empleando métodos tales como: choque térmico, acidificación, alcalinidad, congelación y descongelación, aireación y adición de cloroformo, los cuales inactivan la actividad bacteriana de las

bacterias consumidoras de H_2 para impedir que estas proliferen [23].

pH del cultivo

El pH es un factor importante que influye en la actividad de las bacterias productoras de H_2 , porque afecta la actividad de la hidrogenasa así como las rutas metabólicas [2-3, 21]. Estudios comparativos con respecto al efecto del pH en la producción de H_2 han mostrado que el rango de pH óptimo para lograr la máxima producción de H_2 está entre 4,5 y 6,0 [3].

Sustrato

Para la producción de H_2 se han empleado diferentes clases de sustratos. La glucosa, sacarosa y el almidón son los que más se han empleado como sustrato [21]. En muy pocos estudios se han utilizado residuos orgánicos como sustrato para la producción de H_2 [2].

Para la producción de H_2 no es ideal emplear sustratos con estructuras moleculares complejas debido a que estos son difíciles de asimilar por los microorganismos, sin embargo después de emplear un pretratamiento con algunos métodos estos sustratos pueden ser fácilmente asimilados por las bacterias productoras de H_2 [21].

Los pretratamientos más conocidos para la degradación de sustratos difíciles son la ultrasonificación, acidificación, el congelamiento y descongelamiento, esterilización y las microondas.

Temperatura

La temperatura es un factor que influye en la actividad de las bacterias productoras de H_2 y en la producción de H_2 fermentativo, siendo un parámetro de tipo selectivo pues afecta la tasa de crecimiento y la ruta metabólica de los microorganismos. Las bacterias son capaces de producir H_2 en rangos de temperatura que van desde 15 hasta 85°C, en rango mesofílico (25-30 °C), termofílico (40-65 °C) e hipertermofílico (>80 °C).

Nutrientes

En los procesos fermentativos para producción de H_2 el nitrógeno, los fosfatos y algunos iones metálicos son importantes para el crecimiento celular de las bacterias productoras de H_2 .

El nitrógeno es un componente de las proteínas, ácidos nucleicos y enzimas, por lo tanto una concentración

de nitrógeno apropiada favorece el crecimiento de las bacterias productoras de hidrógeno y la producción de H_2 fermentativo [24].

En relación con los fosfatos estos son necesarios para la producción de H_2 debido a su valor nutricional, así como a su capacidad de tamponamiento [21] y [24] mencionan que en un rango apropiado, aumentar la concentración de fosfatos incrementa la capacidad de las bacterias productoras de H_2 de producir H_2 fermentativo.

Los iones metálicos más importantes en la producción de H_2 fermentativo son el Mg^{2+} , Na^+ , Zn^{2+} y Fe^{2+} , dado que estos elementos son necesarios para los cofactores enzimáticos, los procesos de transporte y las deshidrogenasas [25]. De estos iones el Fe^{2+} es el que más se ha investigado al ser un componente clave en la actividad enzimática de la hidrogenasa [26]. Los metales pesados han sido reportados como tóxicos por [22] para la producción de H_2 fermentativo de acuerdo con el siguiente orden de toxicidad: $Cu > Ni > Zn > Cr > Cd > Pb$.

A continuación se presenta un resumen de trabajos publicados relacionados con la producción de biohidrógeno que abarcan un periodo de tiempo de

1993-2011, las diferentes condiciones con las cuales se realizaron los experimentos de producción de H_2 fermentativo y los principales resultados obtenidos por los autores. Esta información se resume en forma cronológica en la Tabla 1.

Una revisión de las investigaciones referenciadas en la Tabla 1 evidencia que la mayoría de estudios se han realizado en reactores tipo batch y son pocos los experimentos efectuados en régimen continuo, esto se debe probablemente a la simple operación y control de los primeros. Los volúmenes de los reactores en batch y la cantidad de botellas utilizadas fueron muy diferentes empleando botellas de vidrio de capacidad de 70 hasta 4.000 ml y desde 1 hasta 12 botellas, lo que se debe a la cantidad de inóculo y sustrato empleados así como a las diferentes réplicas que hace cada autor para justificar la validez de sus resultados.

En la mayoría de experimentos se emplearon como inóculo lodos anaerobios provenientes de PTAR seguido de lodos provenientes de reactores CSRT, RALFH y UASB; estos inóculos fueron pretratados principalmente mediante choque térmico y se utilizaron cultivos mixtos de bacterias. Los estudios que emplearon cultivos puros de bacterias

Tabla 1. Literatura relacionada con producción de biohidrógeno.

Ref.	Proyecto experimental	Principales resultados
[27]	Régimen continuo. Inóculo proveniente de PTAR. Glucosa 11.700 g como sustrato. Nutrientes 100 g extracto de levadura, 5223 $NaHCO_3$, 38,2 NH_4Cl , 17,3 Na_2HPO_4 , 2,6 KH_2PO_4 , 16 $MgCl_2 \cdot 6H_2O$, 2,6 $MnSO_4 \cdot H_2O$, 0,8 $CuSO_4 \cdot 5H_2O$, 0,015 $CaCl_2 \cdot 2H_2O$, 4 $FeSO_4 \cdot 7H_2O$. Temperatura 36 °C, volumen reactor 1,0l, TRS 2, 4, 6, 8 y 10 h.	El valor del pH en el efluente varió desde 5,7 a 6,3. La cantidad de bacterias anaerobias en general aumentó (formadoras de ácidos y las del género <i>Clostridium</i>), las reductoras de sulfatos disminuyeron. Cuando se incrementó de 2 a 10 h el TRS el contenido de H_2 disminuyó de 12 a 9%.
[28]	Régimen batch. Se emplearon dos clases de inóculo, la primera de lodo de digestión anaerobia, el otro de un lodo de compost. Se empleó celulosa en polvo 10 g/l como sustrato. Nutrientes (g/l): KH_2PO_4 , 1,5; $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$, 4,2; NH_4Cl , 0,5; $MgCl_2 \cdot 6H_2O$, 0,18; extracto de almidón, 2,0. Se inocularon 15 g de la microflora en 3l del medio de cultivo a 200 rpm y 60 °C.	Se obtuvo después de 120 h de cultivo 1.375 ml/cultivo de gas para los lodos de digestión anaerobia con (33% H_2 , 50% CO_2 y 17% CH_4) y 3325 para el lodo de compost con (58% H_2 , 42% CO_2 y N.D. CH_4). Los lodos de digestión produjeron AGV (mg/l): 1.154 acetato, 630 butirato, y compuestos de lodos activados 1.724 acetato, 1.281 butirato.

Ref.	Proyecto experimental	Principales resultados
[29]	Régimen batch. Se emplearon como inóculo lodos anaerobios activados de una empresa de azúcares. Agitado a 200 rpm a 60°, pH 6,8. El volumen de gas se midió por el método de desplazamiento de agua.	La máxima producción de H ₂ se obtuvo a un corto TRH (14 mmol/g carbohidratos a TRH de 0,5 d), la producción de AGV incrementó con el TRH. La fermentación homoacetogénica en la cual no hay producción de H ₂ podría ser el proceso dominante a lo largo del TRH.
[30]	Régimen continuo (Digestor anaerobio de lecho fluidizado de alta tasa). Residuos de panadería (con DQO aprox. de 12,000 mg O ₂ /l). Operado a 37 °C, consistente en dos reactores conectados en paralelo (volumen total líquido 11 l). La tasa de biogás se midió con un medidor de gas en línea con adquisición de datos cada 6 minutos.	Al aumentar la tasa volumétrica de sustrato (kg DQO/m ³ /día) se generaron picos en la presión parcial de H ₂ . No se encontró una clara relación entre los niveles de digestión del ácido propiónico y el biogás de hidrógeno. Se presentaron variaciones considerables en la presión del H ₂ dependiendo del grado de acidificación del sustrato.
[16]	Régimen batch. Se emplearon residuos sólidos municipales mezclados con lodos y agua de PTAR y dos clases de bacterias, la primera netamente productora de H ₂ y la otra de un lodo de digestión anaerobia pretratado por 15 min con calor. Se empleó (g/l): 200 NH ₄ HCO ₃ , 100 KH ₂ PO ₄ , 10 MgSO ₄ ·7H ₂ O, 1,0 NaCl, 1,0 Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O, 10 CaCl ₂ ·2H ₂ O, 1,5 MnSO ₄ ·7H ₂ O y 0,278 FeCl ₂ . Se realizó a 37 °C, agitación 1,5 rpm.	El porcentaje de hidrógeno en el biogás fue mayor a 60% y nunca se obtuvo metano de forma significativa. Con una alta relación de alimento/microorganismo (A/M), el lodo de digestión pretratado tuvo una alta productividad de H ₂ . Los resultados experimentales mostraron que se presenta un cambio en la producción de solventes a un pH de 5,6.
[31]	Régimen continuo, reactor CSRT. El inóculo se obtuvo de frijol soya. La operación del reactor CSTR fue 8,5 h TRH, 100 rpm, 35 °C, pH 6,0. Se empleó N ₂ como gas de burbujeo a una tasa de 110 ml/min. Después de 50 días de operación, el N ₂ se burbujeo por 49 h, seguido por un retorno a las condiciones normales por 5 días. El segundo periodo de burbujeo duró 4,5 días.	Se obtuvo una concentración de biomasa floculante de 1,5 g/l (peso seco) en el CSTR sin burbujeo y una biomasa no floculante de una baja concentración durante el burbujeo. Se obtuvo una producción de H ₂ de 0,85 y 1,43 mol/mol glucosa bajo condiciones de no burbujeo y burbujeo; el burbujeo con N ₂ incrementó en un 68% el H ₂ .
[32]	Régimen continuo. Inóculo proveniente de una PTAR. Sustrato sacarosa (20.000 mg /l) con contenido de suplementos inorgánicos que incluyen NH ₄ HCO ₃ (5240 mg/l), K ₂ HPO ₄ (125 mg/l), MgCl ₂ ·6H ₂ O (100 mg/l), MnSO ₄ ·6H ₂ O (15 mg/l), FeSO ₄ ·7H ₂ O (25 mg/l), CuSO ₄ ·5H ₂ O (5 mg/l), CoCl ₂ ·5H ₂ O (0,125 mg/l) y NaHCO ₃ (6720 mg/l). Temp. 33 °C y pH 6,7.	Se observó que la TPH mejoró con un cambio en la tasa de dilución de 0,02 a 0,075 h ⁻¹ . El ácido butírico fue el metabolito predominante durante la operación. La relación óptima de ácido butírico/ácido acético empleando glucosa para <i>Clostridium butyricum</i> y <i>Bacillus methylotrophicum</i> fue 2 y 0,75, respectivamente.

Ref.	Proyecto experimental	Principales resultados
[15]	Régimen batch. Se emplearon cuatro especies diferentes de bacterias metanogénicas: <i>Methanothermobacter marburgensis</i> con un precultivo a 65 °C y pH 7,5 en un medio de sales minerales. <i>Methanosarcina barkeri</i> con una temp. 37 °C y pH 6,7 en sales minerales, estas dos bacterias crecieron en un sustrato únicamente con H ₂ y CO ₂ . <i>Methanosaeta thermophila</i> creció a 61 °C y pH 6,5 en un medio con acetato. <i>Methanosaeta concilii</i> que es obligatoriamente acetoclástica creció empleando el mismo medio a 35 °C y pH 7.	Las dos especies de <i>Methanosaeta</i> emplean rutas que difieren significativamente de las rutas de H ₂ /CO ₂ . Los resultados indican que la producción de H ₂ en <i>Methanothermobacter marburgensis</i> y <i>Methanosarcina barkeri</i> es controlada biológicamente y que el H ₂ se produce de los metabolitos elaborados durante el crecimiento de los precultivos. La producción estimada de H ₂ para las tres especies productoras varió de 0,16 a 0,25 µmol H ₂ .
[33]	Régimen batch. El inóculo se tomó de un digestor a escala laboratorio. Un litro del medio contenía NH ₄ HCO ₃ 2g, KH ₂ PO ₄ 1g, MgSO ₄ ·7H ₂ O 100 mg, NaCl 10 mg, Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O 10 mg, CaCl ₂ ·2H ₂ O 10 mg, MnSO ₄ ·7H ₂ O 15 mg. Temp. 37 °C, pH 6,0. A cada botella se adicionaron 20 ml de inóculo, 20 ml de sustrato, 20 ml de la solución de sacarosa (40 g/l) y 20 ml de solución de FeCl ₂ (varió de 0 a 16 g FeCl ₂ /l). La producción de biogás se determinó empleando el método Owen.	La TPH de H ₂ fue 24 ml/g SSV/h a una concentración de 4000 mg FeCl ₂ /l. La TEP de butirato incrementó con el aumento en la concen. de Fe de 0-20 mg FeCl ₂ /l, y dismin con un aument. en la concentración de Fe de 20-4000 mg FeCl ₂ /l. La producción máxima de acetato (389,3 mg/g sacarosa), propionato (37,8 mg/g sacarosa) y butirato (196,5 mg/g sacarosa) se obtuvo a una concentración de Fe de 3, 200 y 200 mg FeCl ₂ /l respectivamente.
[34]	Régimen batch por liberación periódica (método Owen) o continua (método respirométrico) de gas del headspace. Inóculo se tomaron 10 cm de profundidad. Cada muestra se realizó choque térmico 104 °C por 2 h. Las muestras se tamizaron en malla #20. Sustrato glucosa, sacarosa, lactato y almidón de papa, celulosa y molasas. La solución de nutrientes contenía (por l) 2,0g NH ₄ HCO ₃ , 1,0g KH ₂ PO ₄ , 100 mg MgSO ₄ ·7H ₂ O, 15 mg MnSO ₄ ·7H ₂ O y 2,78 mg FeCl ₂ . Todas las botellas se agitaron y se mantuvieron a temperatura constante 26 °C	La producción de H ₂ fue 43% mayor en las botellas con los respirometros que en las botellas con el método Owen. El máximo porcentaje de H ₂ (64%) se alcanzó a las 44 h y empezó a declinar a partir de este tiempo. Las pruebas de fermentación con dos azúcares (glucosa y sacarosa) produjeron altas concentraciones de H ₂ 62%. La baja producción de H ₂ con el método Owen comparado con el respirométrico sugiere que la acumulación del gas inhibe la producción de H ₂ .
[35]	Régimen continuo. Se obtuvo inóculo de PTAR, se acidificó a pH 3-4 por 24 h y después se cambió a pH 7. El medio contenía 20 g/l sacarosa y (g/l): NH ₄ HCO ₃ 5,24; NaHCO ₃ 6,72; K ₂ HPO ₄ 0,125; MgCl ₂ ·6H ₂ O 0,100; MnSO ₄ ·6H ₂ O 0,015; FeSO ₄ ·7H ₂ O 0,025; CuSO ₄ ·5H ₂ O 0,005 y CoCl ₂ ·5H ₂ O 1,25x10 ⁻⁴ . El reactor fue operado a TRH de 0,5-5h, Temp. 35 °C y un pH 6,7. Las columnas tenían como material de soporte esponja estropajo EE, arcilla expansiva AE y carbón activado CA.	Las columnas con medio de CA, AE, EE acumularon 5,53, 1,85 y 0,94 g SSV/l de biomasa, respectivamente. La producción de H ₂ al final de la operación fue 1010 y 980 ml para el reactor de CA y AE para el reactor EE solo 190 ml. En este estudio la mejor tasa de producción de H ₂ fue 1,32 l/h/l para el reactor CA y THR=1 h y 0,42 l/h/l para AE a un TRH=2h. El mejor reactor para producción de H ₂ fue el CA.

Ref.	Proyecto experimental	Principales resultados
[36]	Régimen continuo, reactor CSTR. Inóculo se obtuvo de una PTAR. El medio contenía sacarosa 20.000 mg/l, con nutrientes (mg/l): 5240 NH_4HCO_3 , 125 K_2HPO_4 , 100 $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 15 $\text{MnSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 25 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 5 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 0,125 $\text{CoCl}_2 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 6720 NaHCO_3 . El sustrato se alimentó en continuo a TRH 13,3 h, la temp. de operación fue 35 °C.	La producción de H_2 aumentó cuando se disminuyó el TRH hasta 2 h, después de este valor la producción de H_2 disminuyó. Bajo condiciones estables se obtuvo una producción de H_2 de 4,52 ml H_2 /mol sacarosa y una tasa de producción específica de 841 mmol H_2 /g SSV día.
[37]	Régimen batch. Se empleó lodo de un digestor anaerobio. Se utilizó glucosa (3 g/l) en una solución que contenía (por litro): 0,5 g NH_4Cl , 0,25 g KH_2PO_4 , 0,25 g K_2HPO_4 , 300 mg $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 25 mg FeCl_3 , 16 mg NiSO_4 , 25 mg CaCl_2 , 11,5 mg ZnCl_2 , 10,5 $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 5 mg $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ y 15 mg $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$.	Se obtuvo una tasa máxima de biogás de 145 ml cuando el inóculo fue pretratado con calor y se operó a un pH 6,2. Los AGV predominantes fueron acetato, propionato y butirato. Bajar el pH 7,5 hasta 6,2 para las muestras no tratadas y tratadas reduce la producción de metano.
[38]	Régimen batch. Inóculo obtenido de compost pretratado a 105 °C por 2h. Se adicionó 1,5 g de sacarosa o 10 ml de solución de almidón (150 g/l) y 0,5 ml de solución de nutrientes que contenían (g/l): 200 NH_4HCO_3 , 100 KH_2PO_4 , 10 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1 NaCl , 1 $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 1 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 1,5 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ y 0,278 FeCl_2 . El pH se varió de 4,5-6,5 en incremento de 0,5, agitación 180 rpm a 37 °C.	Se encontró que el pH inicial tiene un efecto en la producción de H_2 . A un pH inicial bajo existe mayor potencial de producción de H_2 , pero se presenta una baja tasa. La máxima producción de H_2 fue 214 ml H_2 /g DQO y 125 ml H_2 /g DQO a un pH de 4,5 para la sacarosa y el almidón respectivamente. Se encontró que el rango de pH óptimo estuvo entre 5,5-5,7.
[39]	Régimen batch. Cultivo puro con bacterias <i>Clostridium saccharoperbutylacetonicum</i> . Se empleó como inóculo suero de queso, el cual se diluyó a 87,5% y se adicionaron 0,3 g/l de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ y 50 mg/l de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ como nutrientes. La fermentación se realizó en botellas de 200 a 250 ml a 30 °C agitadas a 50 rpm, con variación de pH de 5,0-10.	Se encontró que el pH inicial afecta la producción de H_2 , la fase de crecimiento microbiano y los tiempos de fermentación. Un pH inicial levemente ácido favorece la producción de H_2 . El máximo potencial, rendimiento y tasa de producción de H_2 fue de 1432 ml, 7,89 mmol/g lactosa y 47,07 ml/h respectivamente a un pH de 6,0.
[40]	Régimen batch. Inóculo de PTAR. Sustrato de pasta de arroz con (mg/l): NaHCO_3 1250, NH_4Cl 2500, KH_2PO_4 250, K_2HPO_4 250, CaCl_2 500, NiSO_4 32, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 320, FeCl_3 20, $\text{Na}_2\text{BO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 7,2, $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 14,4, ZnCl_2 23, $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 21, $\text{CuCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 10, $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 30, extracto de almidón 50.	La producción de H_2 a partir de pasta de arroz fue óptima a pH 4,5, 37 °C, con contenido de pasta de 5,5 g carbohidratos/l, empleando un lodo de digestión pretratado a 100 °C por 30 min. Se obtuvo un máximo de 346 ml/g carbohidrato y TPHE 2,1 l/g SSV.d después de 36 h de aclimatación.
[41]	Régimen batch. Compost pretratado a 85 °C por 3h. Se emplearon granos de malta como sustrato con nutrientes (g/l): 80 NH_4CO_3 , 40 KH_2PO_4 , 4 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ y 11 FeCl_2 . Se realizaron 24 experimentos donde se varió el pH de 5,0-6,5 con increm. 0.5 y agitación desde 25 hasta 250 rpm.	El pH fue más importante que la velocidad de agitación en la producción de H_2 . La condición óptima de pH y velocidad de agitación fue 6,0 y 120 rpm generando 161 ml H_2 /g SST/d y 13 ml H_2 /g SST.

Ref.	Proyecto experimental	Principales resultados
[42]	Régimen continuo, reactor RAHLF. Las bacterias se obtuvieron por fermentación natural de agua residual sintética, la cual se recirculó en el RAHLF. El sustrato contenía glucosa y minerales como nutrientes. El reactor se operó por 366 días en 7 fases experimentales. Las 2 iniciales tenían un TRH de 2,0h, la 3ra varió de 2-0,5 h y las otras tenían un TRH constante de 0,5 h.	La producción de H_2 fue de 2,48, 2,15 y 1,81 mol H_2 /mol de glucosa para concentraciones de 0, 1000 y 2000 mg/l de $NaHCO_3$. El aumento del pH por el $NaHCO_3$ afectó la producción de ácidos orgánicos e H_2 a excepción del ácido propiónico, el cual aumentó cuando incrementó la alcalinidad.
[43]	Régimen batch. El inóculo se tomó de un reactor de lecho empacado empleado para producir H_2 de sustrato sintético basado en sacarosa. Se emplearon tres clases de efluentes: agua residual doméstica, vinaza y glicerina y un control con sacarosa como sustrato, se adicionaron nutrientes. Temp. 25 °C sin agitación, pH 5,5.	La máxima producción H_2 fue obtenida de la vinaza equivalente a 25 mmol H_2 /g DQO o 17 mmol H_2 /g SSV. La menor producción se obtuvo con glicerina con 6 mmol H_2 /g DQO. De acuerdo con evaluación microbiológica se encontraron <i>Klebsiella</i> sp consumidora de O_2 y <i>Bacteroides</i> sp productora de H_2 .
[44]	Régimen batch. El inóculo se obtuvo de un reactor UASB de tratamiento de aguas de un frigorífico; posteriormente se realizó un pretratamiento a 90 °C por 15min. Se emplearon cuatro sustratos que contenían xilosa en triplicado con concentraciones de 630, 1341, 1848 y 3588 mg/l respectivamente, urea, peptona y solución de vitamina y suplemento de nutrientes. Temp. 37 °C, sin agitación pH 5,5.	La adición de peptona favoreció el crecimiento de bacterias productoras de H_2 . El análisis genético mostró que el 57% de los microorganismos pertenecían al género <i>Clostridium</i> , 30% al <i>Burkholderia</i> , 8% a <i>Klebsiella</i> y 5% bacterias no cultivadas. La concentración de xilosa de 3588 mg/l generó los mejores resultados en producción de H_2 con 12882,9 μ mol H_2 /l y rendimiento 0,8 mol H_2 /mol de xilosa.
[45]	Régimen batch. Inóculo estiércol de elefante precal. a 100 °C. Sustrato 10 g/L de glucosa y nutrientes por L: 200g NH_4HCO_3 , 100g KH_2PO_4 , 10g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 1g $NaCl$, 1g $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$, 1g $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ y 0,278g $FeCl_2$. Se desarrolló en botellas de 70 ml, con 12 ml de inóculo, 28 ml de bagazo de caña de azúcar y 20 μ l de solución de nutrientes. Temp. 37 °C.	La condición óptima para pretratamiento de bagazo de caña fue una hidrólisis ácida con H_2SO_4 a una concentración de 1,0% (v/v). La máxima producción de H_2 en términos de rendimiento y TPH fue 0,84 mol H_2 /mol de azúcar total y 109,55 ml H_2 /l día, respectivamente, obtenido con un pH inicial de 6,5 y concentración de sustrato de 10 g/l.

se realizaron en régimen batch y empleando glucosa como sustrato. En algunos estudios se emplearon compuestos orgánicos especiales como estiércol de elefante, compost y residuos industriales.

Los estudios han utilizado principalmente glucosa, sacarosa y almidón respectivamente como sustratos, en concentraciones que variaban desde 300 hasta 11.700 mg/l para la glucosa, en los estudios que se empleó sacarosa las concentraciones fueron de 20.000 mg/l y para el almidón de 200 mg/l. Otros

sustratos empleados fueron celulosa en polvo, peptonas, xilosa y lactato, los cuales se utilizaron a diferentes concentraciones.

Los nutrientes empleados contenían una fuente de fosfatos, los cuales se obtenían de la adición de KH_2PO_4 en concentraciones que variaban desde 125 mg/l hasta 250 g/l, una fuente de nitrógeno obtenida de la adición de NH_4Cl principalmente en concentraciones desde 17,3 mg/l hasta 12,5 g/l o NH_4HCO_3 en concentraciones de 2 g/l hasta 200 g/l

y iones metálicos Mg^{2+} , Na^+ , Zn^{2+} y Fe^{2+} obtenidos de diferentes sales con distintas concentraciones.

Los autores reportan diferentes condiciones de operación de temperatura, pH y TRH. La mayoría de estudios se realizaron en un rango de temperatura mesofílico variando desde 26 hasta 37 °C y algunas en rango termofílico con variaciones entre 55 hasta 65 °C, ninguno en rango hipertermofílico >80 °C. El pH inicial utilizado por los autores se desarrolló en un rango entre 4,0-7,5, empleándose en la mayoría de estudios pH ácidos leves entre 6,0-7,0. Los TRH utilizados variaron entre 0,5-13,3 h, empleándose principalmente TRH en un rango entre 6,0-8,0 h.

Los reactores han generado producciones de H_2 muy variables, las cuales no son comparativas en la mayoría de los casos puesto que la cantidad de H_2 se ha cuantificado en términos de rendimiento, TPH, TPEH y en términos de biomasa, las cuales no son unidades homólogas entre sí. Teniendo en cuenta lo anterior, las producciones de H_2 en los estudios variaron en términos de rendimiento entre 0,85 hasta 2,48 mol H_2 /mol de glucosa, TPH entre 4,56 ml H_2 /l.h hasta 1,32 l H_2 /l.h, TPEH entre 3,73 hasta 17 mmol H_2 /g SSV y en términos de biomasa 15,20-24 ml/g SSV/h.

En aquellos estudios donde se realizó un análisis de la producción de AGV se generaron ácidos grasos de acuerdo con el siguiente orden: acético, butírico y propiónico, lo cual indica que se favoreció la ruta de producción donde se genera como subproducto acetato principalmente, siendo esta la ruta que produce más H_2 fermentativo. La producción de los otros ácidos no es tan favorable para la generación de H_2 , por tanto su presencia es un indicativo de que el proceso no ha sido completamente controlado.

Como se evidencia en los estudios no se ha obtenido la máxima producción teórica de H_2 fermentativo, lo cual demuestra que aún es posible mejorar las condiciones que afectan la producción de biohidrógeno.

RETOS Y PERSPECTIVAS FUTURAS

La fermentación oscura, las rutas de producción de H_2 y los factores que afectan la producción de H_2

anteriormente mencionados han sido estudiados por numerosas investigaciones en todo el mundo en los últimos años. Los estudios realizados han buscado obtener la mayor producción factible de H_2 fermentativo, estos a su vez se han basado en la selección de algunos factores, los cuales son variados de manera controlada para evaluar los efectos en la producción de H_2 . Dado que el proceso de producción de H_2 fermentativo está influenciado por múltiples factores, es adecuado que se emplee un estudio experimental para evaluar el efecto de los diferentes factores involucrados en el proceso para comprender mejor y optimizar el desempeño de la producción [2].

De acuerdo con lo anterior y la revisión de la literatura realizada los parámetros no han sido todos optimizados para la producción de H_2 , más aún si se tiene en cuenta que el H_2 se puede obtener de diversas maneras en diferentes cantidades; una evidencia sustancial que muestra que no se han obtenido valores óptimos es que en la producción de H_2 por procesos fermentativos no se ha conseguido llegar al máximo teórico de 4 mol/mol de glucosa. Se espera en el futuro obtener una mayor cantidad de H_2 a partir de la optimización de los factores que influyen en la producción. Adicionalmente, al revisar casi 600 publicaciones en revistas especializadas en recursos energéticos se observa un interés de la comunidad científica en la última década en el tema de producción de biohidrógeno como se observa en la Figura 4, y se espera que esta tendencia se mantenga dadas las desventajas de los combustibles fósiles. Es interesante observar que el mayor interés en la investigación de producción de biohidrógeno se ha enfocado en China y Taiwán; en estos países se ha realizado más del 30 por ciento de las publicaciones en este tema como se muestra en la Figura 5, asimismo es importante resaltar la escasa investigación desarrollada en los países de América Latina donde en su mayoría se ha concentrado en Brasil. Se espera para el futuro un mayor interés en América Latina en el tema de producción de biohidrógeno dada la dependencia actual de combustibles fósiles, el costo de ellos y la poca oferta de fuentes energéticas alternativas, lo cual podría ser un factor determinante en el crecimiento económico de la región.

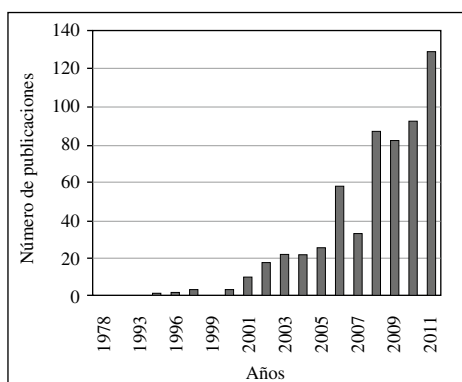


Figura 4. Publicaciones en biohidrógeno entre el periodo 1978-2011.

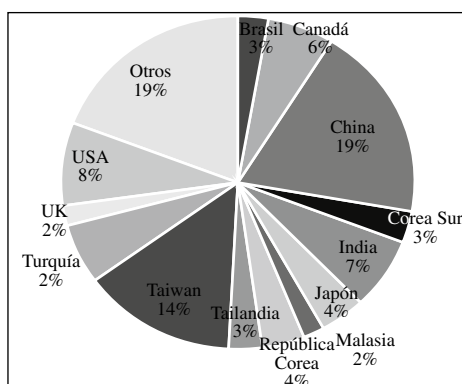


Figura 5. Publicaciones en biohidrógeno por países.

CONCLUSIONES

A pesar de que la producción de biohidrógeno por fermentación oscura de residuos ha sido ampliamente estudiada, aún quedan muchos aspectos por mejorar. En este artículo se ha discutido todo el proceso y cuáles son los factores que afectan la producción. En este sentido se puede concluir lo siguiente: primero, como no se ha obtenido la máxima producción teórica de hidrógeno se deben realizar más estudios que incluyan optimización de los factores, escalamiento de los reactores preferiblemente con producción continua, incrementar los estudios en biología molecular y caracterización de especies productoras.

Finalmente, es importante mencionar que en América Latina debe promoverse el desarrollo de más investigación para así generar una mayor diversidad de fuentes energéticas e independencia de los combustibles fósiles.

AGRADECIMIENTOS

Los autores desean expresar sus agradecimientos por el apoyo financiero al Departamento Administrativo de Ciencia, Tecnología e Investigación - COLCIENCIAS y a la Universidad Militar Nueva Granada - UMNG a través del Programa Jóvenes Investigadores e Innovadores "Virginia Gutiérrez de Pineda" año 2011.

REFERENCIAS

- [1] H. Argun and F. Kargi. "Bio-hydrogen production by different operational modes of dark and photo-fermentation: An overview". International Journal of Hydrogen Energy. Vol. 36, Issue 13, pp. 7443-7459. 2011.
- [2] P. Sinha and A. Pandey. "An evaluative report and challenges for fermentative biohydrogen production". International Journal of Hydrogen Energy. Vol. 36, Issue 13, pp. 7460-7478. 2011.
- [3] K.Y. Show, D.J. Lee and J.S. Chang. "Bioreactor and process design for biohydrogen production". Bioresource Technology. Vol. 102, Issue 18, pp. 8524-8533. 2011.
- [4] P. Hallenbeck and D. Ghosh. "Advances in fermentative biohydrogen production: The way forward?". Trends in Biotechnology. Vol. 27, Issue 5, pp. 287-297. 2009.
- [5] W.M. Chen, Z.J. Tseng, K.S. Lee and J.S. Chang. "Fermentative hydrogen production with *Clostridium butyricum* CGS5 isolated from anaerobic sewage sludge". International Journal of Hydrogen Energy. Vol. 30, Issue 10, pp. 1063-1070. August, 2005.
- [6] X. Liu, Y. Zhu and S.T. Yang. "Butyric acid and hydrogen production by *Clostridium tyrobutyricum* ATCC 25755 and mutants". Enzyme and Microbial Technology. Vol. 38, Issue 3-4, pp. 521-528. February, 2006.
- [7] J.H. Shin, J.H. Yoon, E.K. Ahn, M.S. Kim, S.J. Sim and T.H. Park. "Fermentative hydrogen production by the newly isolated *Enterobacter asburiae* SNU-1". International Journal of Hydrogen Energy. Vol. 32, Issue 2, pp. 192-199. February, 2007.
- [8] H. Jayasinghearachchi, P.M. Sarma, S. Singh, A. Aginihotri, A.K. Mandal and B. Lal. "Fermentative hydrogen production by two novel strain of *Enterobacter aerogenes*

- HGN-2 and HT 34 isolated from sea buried crude oil pipelines". *International Journal of Hydrogen Energy*. Vol. 34, Issue 17, pp. 7197-7207. September, 2009.
- [9] C. Long, J. Cui, Z. Liu, Y. Liu, M. Long and Z. Hu. "Statistical optimization of fermentative hydrogen production from xylose by newly isolated *Enterobacter* sp. CN1". *International Journal of Hydrogen Energy*. Vol. 35, Issue 13, pp. 6657-6664. July, 2010.
- [10] T. Zhang, H. Liu and H.H. Fang. "Biohydrogen production from starch in wastewater under thermophilic condition". *Journal of Environmental Management*. Vol. 69, pp. 149-156. 2003.
- [11] H.S. Shin, J.H. Youn and S.H. Kim. "Hydrogen production from food waste in anaerobic mesophilic and thermophilic acidogenesis". *International Journal of Hydrogen Energy*. Vol. 29, Issue 13, pp. 1355-1363. October, 2004.
- [12] A. Cakir, S. Ozmihci and F. Kargi. "Comparison of bio-hydrogen production from hydrolyzed wheat starch by mesophilic and thermophilic dark fermentation". *International Journal of Hydrogen Energy*. Vol. 35, Issue 24, pp. 13214-13218. December, 2010.
- [13] S.Y. Wu, C.N. Lin and J.S. Chang. "Hydrogen production with immobilized sewage sludge in three-phase fluidized-bed bioreactors". *Biotechnology Progress*. Vol. 19 N° 3, pp. 828-832. 2003.
- [14] I. Ntaikou, G. Antonopoulou and G. Lyberatos. "Biohydrogen production from biomass and wastes via dark fermentation: A review". *Waste Biomass Valorization*. Vol. 1 N° 1, pp. 21-39. 2010.
- [15] D.L. Valentine, D.C. Blanton and W.S. Reebergh. "Hydrogen production by methanogens under low-hydrogen conditions". *Archives of Microbiology*. Vol. 174 N° 6, pp. 415-421. 2000.
- [16] J.J. Lay, Y.J. Lee and T. Noike. "Feasibility of biological hydrogen production from organic fraction of municipal solid waste". *Water Research*. Vol. 33, Issue 11, pp. 2579-2586. 1999.
- [17] C.Y. Chen, M.H. Yang, K.L. Yeh, C.H. Liu and J.S. Chang. "Biohydrogen production using sequential two-stage dark and photo fermentation processes". *International Journal of Hydrogen Energy*. Vol. 33, pp. 4755-4762. 2008.
- [18] V. Gadhamshetty, Y. Arudchelvam, N. Nirmalakhandan and D.C. Johnson. "Modeling dark fermentation for biohydrogen production: ADM1-based model vs. Gompertz model". *International Journal of Hydrogen Energy*. Vol. 35, Issue 2, pp. 479-490. January, 2010.
- [19] P.R. Jones. "Improving fermentative biomass-derive H₂-production by engineering microbial metabolism". *International Journal of Hydrogen Energy*. Vol. 33, Issue 19, pp. 5122-5130. October, 2008.
- [20] K. Uyeda and J.C. Rabinowitz. "Pyruvate-Ferredoxin Oxidoreductase: IV. Studies on the reaction mechanism". *Journal of Biological Chemistry*. Vol. 246 N° 10, pp. 3120-3125. 1971.
- [21] J. Wang and W. Wan. "Factor influencing fermentative hydrogen production: A review". *International Journal of Hydrogen Energy*. Vol. 34, Issue 2, pp. 799-811. January, 2009.
- [22] C. Li and H. Fang. "Inhibition of heavy metals on fermentative hydrogen production by granular sludge". *Chemosphere*. Vol. 67 N° 4, pp. 668-673. 2007.
- [23] J. Wang. "Comparison of different pretreatment methods for enriching hydrogen-producing bacteria from digested sludge". *International Journal of Hydrogen Energy*. Vol. 33, Issue 12 pp. 2934-2941. June, 2008.
- [24] A. Bisaillon, J. Turcot and P.C. Hallenbeck. "The effect of nutrient limitation on hydrogen production by batch cultures of *Escherichia coli*". *International Journal of Hydrogen Energy*. Vol. 31, Issue 11, pp. 1504-1508. September, 2006.
- [25] C.Y. Lin and C.H. Lay. "A nutrient formulation for fermentative hydrogen production using anaerobic sewage sludge microflora". *International Journal of Hydrogen Energy*. Vol. 30, Issue 3, pp. 285-292. March, 2005.
- [26] J. Wang and W. Wan. "Effect of Fe²⁺ concentration on fermentative hydrogen production by mixed cultures". *International Journal of Hydrogen Energy*. Vol. 33, Issue 4, pp. 1215-1220. February, 2008.
- [27] M. Nakamura, H. Kanbe and J. Matsumoto. "Fundamental studies on hydrogen production

- in the acid-formig phase and its bacteria in anaerobic treatment processes-the effects of solids retention time". *Water Science and Technology*. Vol. 28, Issue 7, pp. 81-88. 1993.
- [28] Y. Ueno, T. Kawai, S. Sato, S. Otsuka and M. Morimoto. "Biological production of hydrogen from cellulose by natural anaerobic microflora". *Journal of Fermentation and Bioengineering*. Vol. 79, Issue 4, pp. 395-397. 1995.
- [29] Y. Ueno, S. Otsuka and M. Morimoto. "Hydrogen production from industrial wastewater by anaerobic microflora in chemostat culture". *Journal of Fermentation and Bioengineering*. Vol. 82, Issue 2, pp. 194-197. 1996.
- [30] A.J. Guwy, F.R. Hawkes, D.L. Hawkes and A.G. Rozzi. "Hydrogen production in a high rate fluidised bed anaerobic digester". *Water Research*. Vol. 31, Issue 6, pp. 1291-1298. 1997.
- [31] O. Mizuno, R. Dinsdale, F.R. Hawkes and D.L. Hawkes. "Enhacement of hydrogen production from glucose by nitrogen gas sparging". *Bioresource Technology*. Vol. 73, Issue 1, pp. 59-65. May, 2000.
- [32] C.C. Chen, C.Y. Lin and J.S. Chang. "Kinetics of hydrogen production with continuos anaerobic cultures utilizing sucrose as the limiting substrate". *Applied Microbiology and Biotechnology*. Vol. 57 N^{os} 1-2, pp. 56-64. 2001.
- [33] Y. Joon, T. Miyahara and T. Noike. "Effect of iron concentration on hydrogen fermentation". *Bioresource Technology*. Vol. 80, pp. 227-231. 2001.
- [34] B.E. Logan, S.E. Oh, I.S. Kim and S. Van Ginkel. "Biological hydrogen production measured in batch anaerobic respirometers". *Enviromental Science and Technology*. Vol. 36 N^o 11, pp. 2530-2535. 2002.
- [35] J.S. Chang, K.S. Lee and P.J. Lin. "Biohydrogen production with fixed-bed bioreactors". *International Journal of Hydrogen Energy*. Vol. 27, Issues 11-12, pp. 1167-1174. 2002.
- [36] C.C. Chen and C.Y. Lin. "Using sucrose as a substrate in an anaerobic hydrogen-producing reactor". *Advances in Enviromental Research*. Vol. 7, Issue 3, pp. 695-699. May, 2003.
- [37] Y.K. Oh, E.H. Seol, J.R. Kim and S. Park. "Fermentative biohydrogen production by a new chemoheterotrophic bacterium *Citrobacter* sp. Y19". *International Journal of Hydrogen Energy*. Vol. 28, Issue 12, pp. 1353-1359. December, 2003.
- [38] S. Kumar, W.H. Chen, L. Li and S. Sung. "Biological hydrogen production: effects of pH and intermediate products". *International Journal of Hydrogen Energy*. Vol. 29, Issue 11, pp. 1123-1131. 2004.
- [39] M. Ferchichi, E. Crabbe, G.H. Gil, W. Hintz and A. Almadidy. "Influence of initial pH on hydrogen production from cheese whey". *Journal of Biotechnology*. Vol. 120 N^o 4, pp. 402-409. 2005.
- [40] H. Fang, C. Lin and T. Zhang. "Acidophilic biohydrogen production from rice slurry". *International Journal of Hydrogen Energy*. Vol. 31, Issue 6, pp. 683-692. May, 2006.
- [41] C.H. Chou, C.W. Wang, C.C. Huang and J.J. Lay. "Pilot study of the influence of stirring and pH on anaerobes convering high-solid organic wastes to hydrogen". *International Journal of Hydrogen Energy*. Vol. 33, Issue 5, pp. 1550-1558. 2008.
- [42] J.A.C. Leite, B.S. Fernandes, E. Pozzi, M. Barboza and M. Zaiat. "Application of an anaerobic packed-bed bioreactor for the production of hydrogen and organic acids". *International Journal of Hydrogen Energy*. Vol. 33, Issue 2, pp. 579-586. January, 2008.
- [43] B. Soares, G. Peixoto, F.R. Albrecht, N.K. Saavedra del Aguila and M. Zaiat. "Potential to produce biohydrogen from various wastewaters". *Energy for Sustainable Development*. Vol. 14, Issue 2, pp. 143-148. June, 2010.
- [44] S.I. Maintinguer, B. Fernandes, I.C.S. Duarte, N.K. Saavedra, M.A.T. Adorno and M.B.A. Varesche. "Fermentative hydrogen production with xylose by *Clostridium* and *Klebsiella* species in anaerobic batch reactors". *International Journal of Hydrogen Energy*. Vol. 36, Issue 21, pp. 13508-13517. October, 2011.
- [45] A. Fangkum and A. Reungsang. "Biohydrogen production from sugarcane bagasse hydrolysate by elephant dung: Effects of initial pH and substrate concentration". *International Journal of Hydrogen Energy*. Vol. 36, Issue 14, pp. 8687-8696. July, 2011.