

Producción de biohidrógeno por fermentación: efecto de la concentración de inóculo

María J. Pascualone

Centro de Investigación y Transferencia en Ingeniería Química Ambiental (CIQA), Facultad Regional Córdoba, Universidad Tecnológica Nacional, Argentina.

Fecha de recepción del manuscrito: 11/08/2018

Fecha de aceptación del manuscrito: 05/07/2019

Fecha de publicación: 31/10/2019

Resumen—En la necesidad actual de estudiar bioprocesos limpios para la generación de energía, la producción de biohidrógeno ha atraído una creciente atención global. Se estudió la producción de gas hidrógeno por fermentación a partir de glucosa utilizando un cultivo mixto de vermicompost enriquecido por *shock* térmico. La concentración inicial de la biomasa inoculada fue variada entre 1 y 10 g SSV/l para determinar los efectos sobre el bioproceso, mediante ensayos discontinuos. La mayor producción de hidrógeno (394 ml/l; 34%) y la mayor velocidad de producción específica de hidrógeno (91,3 ml H₂/g SSV/d) se obtuvieron con 2,5 g SSV/l inoculados, conjuntamente con una alta eficiencia de degradación del sustrato (70%). El rendimiento de hidrógeno más alto (79,8 ml H₂/g glucosa) se alcanzó a la concentración de inóculo más baja ensayada (1 g SSV/l), y disminuyó con el incremento en la concentración celular inicial. La distribución de los metabolitos solubles sugirió que la vía metabólica de formación de ácido butírico fue efectiva en la formación de gas hidrógeno. Especies de *Clostridium* fueron los organismos dominantes en el cultivo.

Palabras clave—biohidrógeno, fermentación, cultivo mixto, inóculo, vermicompost.

Abstract—Today, in the need to study clean bioprocesses for energy generation, biohydrogen production has attracted increasing global attention. Fermentative hydrogen gas production from glucose was studied using a mixed culture of vermicompost enriched by heat-shock. The initial inoculum concentration was varied between 1 and 10 g VSS/l to determine the effects on the bioprocess, by batch experiments. The highest hydrogen production (394 ml/l; 34%) and the highest specific hydrogen production rate (91.3 ml H₂/g VSS/d) were obtained with 2.5 g VSS/l inoculated, simultaneously with a high efficiency of substrate degradation (70%). The highest hydrogen yield (79.8 ml H₂/g glucose) was achieved at the lowest inoculum concentration tested (1 g VSS/l), and it decreased with increasing initial cell concentration. The distribution of soluble metabolites suggested that the metabolic pathway leading to the formation of butyric acid was effective in the production of hydrogen gas. *Clostridium* species were the dominant organisms in the culture.

Keywords—biohydrogen, fermentation, mixed culture, inoculum, vermicompost.

INTRODUCCIÓN

El incremento de la demanda energética requiere de nuevos desarrollos en la capacidad de generación de energía que sea segura, diversificada, disponible y de mínimo impacto ambiental. La producción biológica de hidrógeno ha atraído una creciente atención global, debido a su potencial de fuente inagotable, de bajo costo y renovable de energía (Show et al., 2011; Cai y Wang, 2016; Keskin et al., 2018). Actualmente existen distintos procesos para obtener biohidrógeno tales como biofotólisis directa e indirecta, foto-fermentación y fermentación oscura (Bundhoo y Mohee, 2016). Ésta última parece ser favorable debido a su simplicidad, menor requerimiento de energía, mayores tasas de producción de hidrógeno y utilización de desechos como materias primas (Cui y Shen, 2012). Durante la fase acidogénica, las bacterias fermentativas

transforman la materia orgánica soluble en alcoholes y ácidos orgánicos volátiles como compuestos líquidos, y dióxido de carbono e hidrógeno como compuestos gaseosos (Valdez y Poggi, 2009; Krupp y Widmann, 2009).

La producción fermentativa de hidrógeno se puede llevar a cabo tanto con cultivos puros, con gran variedad de cepas de microorganismos, como con cultivos mixtos que por lo general provienen de lodos anaerobios, lodos de plantas de tratamiento, compost y suelo (Wang y Yin, 2017). Sin embargo, en la microflora mixta coexisten bacterias productoras de hidrógeno con consumidoras de hidrógeno. Los organismos pertenecientes al género *Clostridium* spp. son anaerobios estrictos, Gram positivos, que producen gas hidrógeno durante la fase de crecimiento exponencial (Maintinguer et al., 2016). En cultivos por lotes, cuando se alcanza la fase estacionaria de crecimiento, el metabolismo se desplaza de la producción de hidrógeno y ácido, hacia una fase de producción de solvente (Chong et al., 2009). Su atributo de la formación de esporas, los hace fáciles de manejar por tratamiento térmico (Noike y Mizuno, 2000). Entre los principales consumidores de hidrógeno se encuentran los organismos metanogénicos que no son

Dirección de contacto:

María J. Pascualone, Maestro M. López esq. Av. Cruz Roja Argentina, 5016 Córdoba. Tel: 5986000, mariapascualone@gmail.com

formadores de esporas (Valdez y Poggi, 2009) y utilizan el hidrógeno para producir metano. También las bacterias homoacetogénicas son capaces de transformar el hidrógeno y dióxido de carbono a acetato únicamente, disminuyendo así el rendimiento en la producción de hidrógeno (Bundhoo y Mohee, 2016). Por ello, cuando se utiliza como inóculo un consorcio microbiano indefinido, el enriquecimiento de cultivos mixtos se hace necesario para potenciar la producción de biohidrógeno, por un lado, e inhibir a los consumidores de hidrógeno, tales como metanógenos y homoacetógenos, frecuentemente presentes en estos inóculos mixtos, por otro lado (Ghimire et al., 2015).

También han sido estudiados sistemas de producción de hidrógeno por fermentación oscura sin inoculación, aprovechando la microflora natural presente en el propio desecho (Marone et al., 2014; Ghimire et al., 2015). Debido a que la cantidad y calidad de la microflora natural puede ser insuficiente, una cantidad adecuada de inoculación de cultivo externo es esencial para un proceso eficaz. La cantidad de inóculo tiene que ser ajustada en consecuencia ya que la cantidad de sustrato por inóculo ha sido reportado como un parámetro de operación importante que afecta a la vía microbiana (Argun y Dao, 2016).

El objetivo de este estudio fue investigar los efectos de la concentración inicial de la biomasa inoculante en la producción de gas de hidrógeno y metabolitos solubles, así como en la degradación del sustrato, mediante ensayos por lotes. Vermicompost tratado térmicamente se utilizó como inóculo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Inóculo

Se utilizó un cultivo mixto proveniente de compost comercial (humus de lombriz) enriquecido mediante *shock* térmico. El inóculo llevado por dilución con agua destilada a la concentración de sólidos suspendidos volátiles (SSV) deseada, fue pre-tratado para eliminar los microorganismos metanogénicos y seleccionar aquellos productores de hidrógeno, en baño de agua a 100 °C durante 15 min y se incubó en la oscuridad a 35 °C, por 24 h.

Medio de cultivo

Se preparó un medio definido utilizando glucosa en una concentración 10 g/l y sales inorgánicas (Chen et al., 2002), cuya composición se detalla en la Tabla 1.

TABLA 1. Base mineral.

Sales minerales	g/l
NH ₄ Cl	3,545
K ₂ HPO ₄	0,125
MgCl ₂ ·6H ₂ O	0,100
MnSO ₄ ·H ₂ O	0,010
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0,025
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0,005
CoCl ₂ ·6H ₂ O	0,135
NaHCO ₃	6,720

Sistema de reacción

Los experimentos de producción de hidrógeno se llevaron a cabo mediante cultivos por lotes, en botellas serológicas de 120 ml, con 80 ml de caldo de fermentación. Las botellas fueron selladas herméticamente con tapones de caucho y agrafes metálicos. Inicialmente se gasearon con nitrógeno durante 60 s, para lograr condiciones anaeróbicas. Cada botella se inoculó con 8 ml de inóculo enriquecido usando 72 ml de medio de cultivo definido, a 35 °C. Antes de la carga, el medio de cultivo se ajustó a pH 5,5 con H₂SO₄ 1N. El proceso se llevó a cabo con distintas concentraciones de inóculo inicial de 1, 2,5, 5 y 10 g SSV/l.

Métodos analíticos

El gas producido se midió por el método de desplazamiento del émbolo (Owen et al., 1979) utilizando jeringas de 60 ml equipadas con agujas de calibre 20. La composición del biogás (H₂, CO₂ y CH₄) se determinó en un cromatógrafo de gases (HP 5890 series II plus), equipado con un detector de conductividad térmica. Se utilizó una columna capilar HP-PLOT/Q de 30 m x 0,53 mm. El horno operó a 60 °C por 3 min y 15 °C/min hasta 250 °C, la temperatura del inyector fue 200 °C y la temperatura del detector fue 260 °C. Se utilizó He como gas portador. Para determinar la concentración de ácidos grasos volátiles y compuestos orgánicos de bajo peso molecular en fase líquida, se usó headspace (HS) como técnica de preparación de muestra y análisis subsiguiente de la fase gaseosa en un cromatógrafo de gases (Thermo Scientific Trace 1310) con detector de espectrómetro de masas (GC-MS). Se utilizó una columna capilar TG-5SILMS de 60 m de longitud, que operó a 35 °C por 4 min, 4 °C/min hasta 60 °C y 10 °C/min hasta 150 °C. El inyector y la fuente de iones alcanzaron una temperatura de 200 °C. La temperatura de la línea de transferencia fue 250 °C. La técnica de HS se realizó colocando 10 ml de la muestra en un vial de headspace de vidrio; luego, el vial se selló y se calentó a 60 °C durante 30 min en un horno con controlador de temperatura automático. La concentración de glucosa se midió a través de la cuantificación de azúcares reductores por la técnica colorimétrica del DNS (Miller, 1959). Se usaron procedimientos estandarizados para determinar el pH y los sólidos suspendidos volátiles (APHA et al., 2012).

Para la cuantificación de microorganismos asociados al género *Clostridium* sp. se siguió el método del número más probable (NMP) de anaerobios sulfito-reductores descrito en la norma internacional ISO 6461/1-1986 (ISO, 1986).

Modelado cinético

La ecuación modificada de Gompertz (1) ha sido ampliamente utilizada para describir el progreso de la producción acumulada de hidrógeno obtenida en un experimento por lote (Wang y Yin, 2017):

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

donde, H (ml) corresponde a la cantidad de hidrógeno producido en el tiempo de incubación t (h), H_{máx} (ml) es la cantidad máxima de hidrógeno producido, R_{máx} (ml/h) es la velocidad máxima de producción de hidrógeno, e es la base de los logaritmos naturales (2,718) y λ (h) representa el tiempo de la fase lag (Bo et al., 2012). Los valores de H_{máx},

$R_{m\acute{a}x}$ y λ para cada lote se determinaron con el mejor ajuste de los datos de producción de hidrógeno para la ecuación (1) con Matlab (R2016a).

El rendimiento de hidrógeno se calculó a partir de $H_{m\acute{a}x}$ y se definió como la cantidad de hidrógeno producido por cantidad de sustrato consumido (ml H_2 /g glucosa). La velocidad de producción específica de hidrógeno se calculó dividiendo $R_{m\acute{a}x}$ por el peso de biomasa añadida (SSV) y se expresa en unidades de ml/g SSV/d (Hao et al., 2006).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Efecto sobre la producción de hidrógeno

El efecto del tiempo de fermentación sobre la producción acumulada de hidrógeno para las diferentes concentraciones de inoculación se muestra en la Fig. 1. El volumen de gas hidrógeno aumentó con el tiempo durante un cierto período y se mantuvo constante después. La producción de gas hidrógeno alcanzó el nivel más alto luego de 120 h de incubación cuando se inoculó con 2,5 g SSV/l. En todos los experimentos, el biogás producido estuvo libre de metano, constituido por hidrógeno (27-34%) y dióxido de carbono (66-73%).

Los datos sobre la formación de gas de hidrógeno se correlacionaron con la ecuación modificada de Gompertz (1), y se obtuvo una alta correlación ($R^2 > 0,97$) en todas las series. La Tabla 2 resume los parámetros cinéticos calculados para el proceso fermentativo y la Fig. 2 muestra la variación de la producción de hidrógeno y del contenido del mismo en el biogás a diferentes concentraciones iniciales de inóculo. Los resultados mostraron que el valor de $H_{m\acute{a}x}$ en los distintos cultivos aumentó (1,6 veces) cuando el contenido de la inoculación se incrementó de 1 a 2,5 g SSV/l, y disminuyó ligeramente con nuevos incrementos en las concentraciones de inóculo hasta 10 g SSV/l. La mayor producción de hidrógeno alcanzada fue 31,5 ml (394 ml/l) con 34% v/v del mismo en el biogás cuando se inoculó con 2,5 g SSV/l. Por su parte, $R_{m\acute{a}x}$ se vio afectada significativamente con las variaciones en la inoculación. Su valor aumentó de 0,3 a 1,5 ml/h con concentraciones crecientes de biomasa inoculada en el rango estudiado, produciéndose el mayor incremento (2,7 veces) con el cambio en la inoculación de 1 a 2,5 g SSV/l. Con respecto a los valores obtenidos de la fase lag, éstos revelaron que el tiempo de adaptación al medio requerido por las bacterias productoras de hidrógeno, disminuyó a medida que se incrementó el tamaño de la inoculación de 86 h (1 g SSV/l) hasta 40 h (10 g SSV/l).

TABLA 2. Parámetros cinéticos de Gompertz.

Inóculo (g SSV/l)	$H_{m\acute{a}x}$ (ml)	$R_{m\acute{a}x}$ (ml/h)	λ (h)
1	19,5	0,3	86
2,5	31,5	0,8	55
5	29,2	1,0	47
10	26,6	1,5	40

$H_{m\acute{a}x}$ = cantidad máxima de hidrógeno producido.
 $R_{m\acute{a}x}$ = velocidad máxima de producción de hidrógeno.
 λ = tiempo de la fase lag.

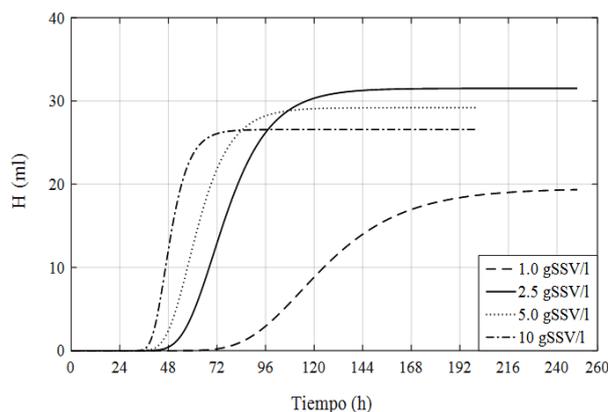


Fig. 1. Variación de la acumulación de gas hidrógeno con el tiempo según la concentración inicial de inóculo.

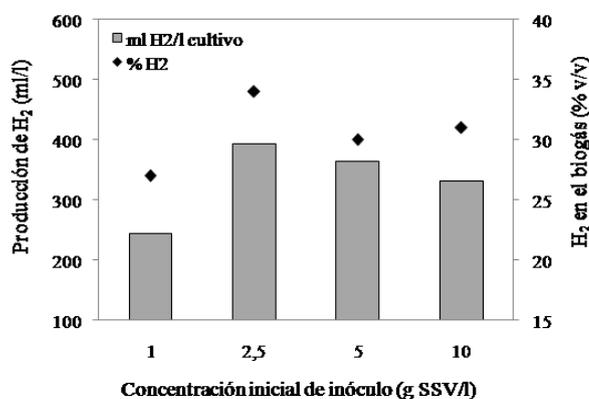


Fig. 2. Producción de gas hidrógeno y su concentración en el biogás.

Las altas concentraciones de células favorecieron la alta velocidad de producción de hidrógeno y los períodos de latencia más cortos, pero el grado de formación de gas de hidrógeno se vio disminuido.

La Fig. 3 muestra el rendimiento de hidrógeno y su tasa de producción específica en función de la concentración de inoculación.

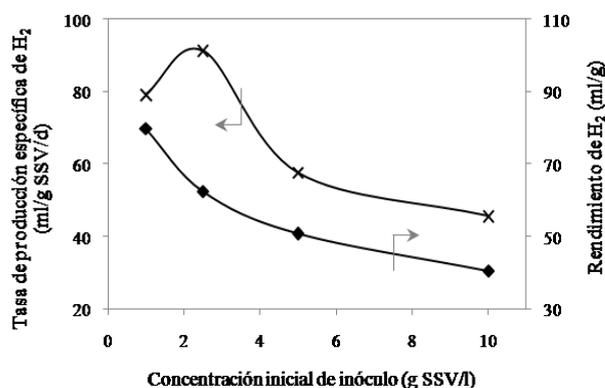


Fig. 3. Rendimiento de hidrógeno y su tasa de producción específica.

El rendimiento de gas hidrógeno disminuyó a la mitad de su valor cuando el contenido inicial del inóculo se incrementó en 10 veces (de 1 a 10 g SSV/l). Se obtuvo el valor más alto (79,8 ml H₂/g glucosa) a la concentración de inoculación más baja ensayada (1 g SSV/l). Por su parte, la tasa de producción específica de hidrógeno alcanzó su máximo valor (91,3 ml H₂/g SSV/d) en el ensayo inoculado con 2,5 g SSV/l.

En comparación con estudios de la literatura, pocos informan el efecto de la concentración de inoculación en la producción mesofílica de biohidrógeno. Asimismo, se encontró variabilidad en los sustratos utilizados, por ejemplo, Eker y Sarp, (2017) investigaron el bioproceso a partir de una solución de azúcar resultante del hidrolizado de papel y alcanzaron un rendimiento de 47 ml H₂/g azúcar. Argun et al., (2008) fermentaron una solución de almidón, logrando 57,1 ml H₂/g almidón, mientras que Eker y Erkul, (2018) obtuvieron 109,8 ml H₂/g COT (carbono orgánico total), utilizando azúcar extraída de remolacha como sustrato. Al igual que en este trabajo, dichos autores concluyeron que las altas concentraciones de inoculación afectaron negativamente al rendimiento de hidrógeno y su tasa de producción específica. Sin embargo, todos ellos utilizaron lodo anaeróbico tratado térmicamente como inóculo, mientras que en este trabajo se usó un cultivo mixto proveniente de vermicompost y una solución de glucosa como sustrato, por lo que es difícil hacer una comparación directa entre los valores de la producción de hidrógeno reportados. Además, la producción fermentativa de hidrógeno es un proceso muy complejo e influenciado por diversos factores tales como la fuente de inóculo, el tipo de sustrato, el pH y la temperatura de cultivo. Estos regulan las vías metabólicas de los microorganismos afectando directamente la concentración de producto, el rendimiento y la velocidad de producción específica de hidrógeno (Ghimire et al., 2015; Wang y Yin, 2017). Si bien, deben esperarse diferencias con los valores reportados en la literatura, ya que las características de los cultivos pueden ser muy variables, los resultados obtenidos aquí demuestran la viabilidad del uso de vermicompost como inóculo.

Efecto sobre la degradación del sustrato

La eficiencia de degradación del sustrato se estimó dividiendo la cantidad de glucosa consumida por la cantidad de glucosa inicial. El efecto de las distintas concentraciones de inoculación sobre dicho parámetro se muestra en la Fig. 4. La eficiencia de degradación de la glucosa aumentó marcadamente (al doble de su valor) con concentraciones crecientes de biomasa inoculante, de 34% (1 g SSV/l) a 70% (2,5 g SSV/l), y se mantuvo alrededor del 80% para concentraciones superiores de inoculación.

Efecto sobre la producción de metabolitos solubles

La formación de hidrógeno es acompañada con la generación de ácidos grasos volátiles (AGV) y otros productos de bajo peso molecular. Su distribución depende de las condiciones en las que transcurre el proceso y de los organismos involucrados (Bansal et al., 2013; Silva et al., 2018). Los metabolitos solubles producidos fueron ácido butírico y butanol (Fig. 5). Entre ellos, el ácido butírico (76-88%) fue el metabolito principal formado durante el proceso de fermentación.

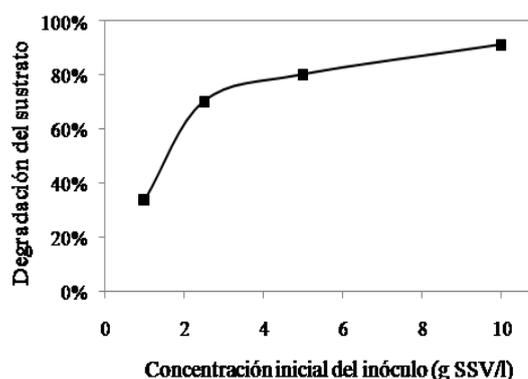


Fig. 4. Eficiencia de degradación del sustrato.

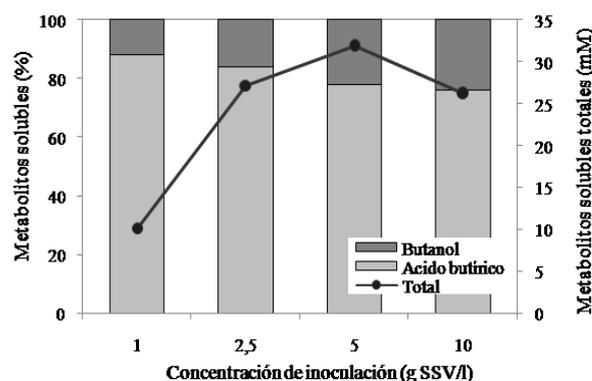


Fig. 5. Producción de metabolitos solubles.

La generación de metabolitos solubles alcanzó su pico (31,8 mM) cuando se inoculó con 5 g SSV/l, pero no se observó el mismo comportamiento en la producción de gas hidrógeno. Esto puede atribuirse al mayor incremento en la producción de butanol con respecto a la del ácido butírico, alcanzando una proporción por encima del 20%. De acuerdo a lo informado por Bedoya et al. (2008), la generación de alcoholes debe ser evitada, debido a que contienen poder reductor significativo y no conduce a la formación de gas hidrógeno. Las bajas concentraciones de inoculación, dentro del rango ensayado, dieron como resultado una producción de ácido butírico cuya proporción con respecto a la del butanol fue cercana al 90%. Conjuntamente, se obtuvieron los valores más altos del rendimiento de hidrógeno y de su tasa de producción específica.

El pH final para cada condición de inoculación, disminuyó desde 5,5 hasta 4,2-5,0 consecuente de las altas concentraciones de ácido butírico, las cuales revelan que la reacción fue un tipo de fermentación butírica y se considera como una vía metabólica óptima para la generación efectiva de hidrógeno. Especies de *Clostridium* podrían considerarse los organismos dominantes en el cultivo, ya que estos son responsables de la fermentación butírica (Kim et al., 2013). Esto fue confirmado con las pruebas bioquímicas realizadas al inóculo, cuyos resultados revelaron que contenía principalmente organismos asociados al género *Clostridium* spp. (2,2x10⁵ NMP/100 ml). Esto era de esperarse, ya que Hong et al., (2011) investigaron la biomasa de lombrices epigeas responsables del vermicompostaje, proceso

mesofílico donde el material orgánico pasa a través del intestino de la lombriz de tierra y su estiércol resultante es abundante en actividad microbiana. Ellos identificaron una variedad de microorganismos entre los cuales se hallaron especies de *Clostridium*. Asimismo, la fase líquida no contenía ácido acético ni ácido propiónico, lo que puede atribuirse a la supresión de homoacetógenos y productores de propionato, además de los metanógenos, luego del pre-tratamiento al inóculo (Bundhoo et al., 2015).

CONCLUSIONES

Se estudió la producción biológica de hidrógeno por fermentación discontinua, empleando vermicompost como biomasa inoculante en distintas concentraciones iniciales. La cantidad de hidrógeno producida se vio afectada significativamente por las variaciones en la concentración de inoculación. Comparativamente, se observó un mayor valor de rendimiento de hidrógeno (79,8 ml/g glucosa) y de su tasa de producción específica (91,3 ml/g SSV/d) en los experimentos realizados con las menores concentraciones iniciales de inóculo (1 y 2,5 g SSV/l respectivamente). El pre-tratamiento de *shock* térmico al inóculo fue eficaz en la inhibición de microorganismos metanogénicos, ya que no se detectó metano. *Clostridium* spp. responsables de la fermentación butírica, fueron los organismos dominantes en el bioproceso.

Se prevé que los resultados de este estudio contribuyan a obtener conocimiento aplicable al desarrollo de una fuente de energía limpia.

AGRADECIMIENTOS

Se desea agradecer el apoyo financiero del CIQA-UTN de Córdoba, Argentina, y reconocer a la UTN Argentina por la beca de investigación otorgada.

REFERENCIAS

- [1] APHA, AWWA, WEF, (2012), *Standard methods for the examination of water and wastewater*. 22nd edn. American Public Health Association, Washington.
- [2] Argun H. y Dao S., (2016), "Bio-hydrogen production from waste peach pulp by dark fermentation: Effect of inoculum addition", *International Journal of Hydrogen Energy*, 42(4):2569-2574.
- [3] Argun H., Kargi F., Kapdan I. K. y Oztekin R., (2008), "Batch dark fermentation of powdered wheat starch to hydrogen gas: Effects of the initial substrate and biomass concentrations", *International Journal of Hydrogen Energy*, 33:6109-6115.
- [4] Bansal S. K., Sreerishnan T. R. y Singh R., (2013), "Effect of heat pretreated consortia on fermentative biohydrogen production from vegetable waste", *National Academy Science Letters*, 36:125-131.
- [5] Bedoya A., Castrillón J. C., Ramírez J. E., Vásquez J. E. y Zabala M. A., (2008), "Producción biológica de hidrógeno: una aproximación al estado del arte", *Dyna*, 75(154):137-157.
- [6] Bo W., Yongye L., Yahua Q., Yang Y., Qiang S., Wei W. y Jianlong W., (2012), "Technology research on bio-hydrogen production", *Procedia Engineering*, 43:53-58.
- [7] Bundhoo M. y Mohee R., (2016), "Inhibition of dark fermentative bio-hydrogen production: A review", *International Journal of Hydrogen Energy*, 41(16):6713-6733.
- [8] Bundhoo M., Mohee R. y Hassan M. A., (2015), "Effects of pre-treatment technologies on dark fermentative biohydrogen production: A review", *Journal of Environmental Management*, 157:20-48.
- [9] Cai J. y Wang G., (2016), "Comparison of different pre-treatment methods for enriching hydrogen-producing bacteria from intertidal sludge", *International Journal of Green Energy*, 13:292-297.
- [10] Chen C. C., Lin C. Y. y Lin M. C., (2002), "Acid-base enrichment enhances anaerobic hydrogen production process", *Applied Microbiology Biotechnology*, 58:224-228.
- [11] Chong M. L., Sabaratnam V., Shirai Y. y Hassan M. A., (2009), "Biohydrogen production from biomass and industrial wastes by dark fermentation", *International Journal of Hydrogen Energy*, 34:3277-3287.
- [12] Cui M. y Shen J., (2012), "Effects of acid and alkaline pretreatments on the biohydrogen production from grass by anaerobic dark fermentation", *International Journal of Hydrogen Energy*, 37:1120-1124.
- [13] Eker S. y Erkul B., (2018), "Biohydrogen production by extracted fermentation from sugar beet", *International Journal of Hydrogen Energy*, 43:10645-10654.
- [14] Eker S. y Sarp M., (2017), "Hydrogen gas production from waste paper by dark fermentation: Effects of initial substrate and biomass concentrations", *International Journal of Hydrogen Energy*, 42:2562-2568.
- [15] Ghimire A., Frunzo L., Pirozzi F., Trably E., Escudie R., Lens P. N. L. y 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.
- [16] Hao X., Zhou M., Yu H., Shen Q. y Lei L., (2006), "Effect of sodium ion concentration on hydrogen production from sucrose by anaerobic hydrogen-producing granular sludge", *Chinese Journal of Chemical Engineering*, 14(4):511-517.
- [17] Hong S. W., Lee J. S. y Chung K. S., (2011), "Effect of enzyme producing microorganisms on the biomass of epigeic earthworms (*eisenia fetida*) in vermicompost", *Bioresource Technology*, 102:6344-6347.
- [18] ISO, International Standard Organization, (1986), ISO 6461/1, Water quality: detection and enumeration of the spores of sulphite-reducing anaerobes (Clostridia).
- [19] Keskin T., Arslan K., Abubackar H. N., Vural C., Eroglu D., Karaalp D., Yanik J., Ozdemir G. y Azbar N., (2018), "Determining the effect of trace elements on biohydrogen production from fruit and vegetable wastes", *International Journal of Hydrogen Energy*, 43:10666-10677.
- [20] Kim S., Choi K., Kim J. O., Chung J., (2013), "Biological hydrogen production by anaerobic digestion of food waste and sewage sludge treated using various pretreatment technologies", *Biodegradation*, 24:753-764.
- [21] Krupp M. y Widmann R., (2009), "Biohydrogen production by dark fermentation: Experiences of continuous operation in large lab scale", *International Journal of Hydrogen Energy*, 34:4509-4516.
- [22] Maintinguer S. I., Sakamoto I. K., Adorno M. A. T. y Varesche M. B. A., (2016), "Bacterial diversity from environmental sample applied to bio-hydrogen production", *International Journal of Hydrogen Energy*, 40(8):3180-3190.
- [23] Marone A., Izzo G., Mentuccia L., Massini G., Paganin P., Rosa S., Varrone C. y Signorini A., (2014), "Vegetable waste as substrate and source of suitable microflora for bio-hydrogen production", *Renewable Energy*, 68:6-13.
- [24] Miller G. L., (1959), "Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar", *Analytical Chemistry*, 31:426-428.
- [25] Noike T. y Mizuno O., (2000), "Hydrogen fermentation of organic municipal wastes", *Water Science and Technology*, 42(12):155-162.
- [26] Owen W. F., Stuckey D. C., Healy Jr. J. B., Young L. Y., McCarty P. L., (1979), "Bioassay for monitoring biochemical methane potential and anaerobic toxicity", *Water Research*, 13(6):485-492.
- [27] Show K. Y., Lee D. J. y Chang J. S., (2011), "Bioreactor and process design for biohydrogen production", *Bioresource Technology*, 102:8524-8533.
- [28] Silva J. S., Mendes J. S., Correia J. A. C., Rocha M. V. P. y Micoli L., (2018), "Cashew apple bagasse as new feedstock for the hydrogen production using dark fermentation process", *Journal of Biotechnology*, 286:71-78.
- [29] Valdez-Vazquez I. y Poggi-Valardo H., (2009), "Hydrogen production by fermentative consortia", *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 13:1000-1013.
- [30] Wang J. y Yin Y., (2017), *Biohydrogen production from organic wastes*. Green Energy and Technology. Springer Nature, Singapore.