



Producción biológica de hidrógeno mediante fermentación oscura

Feria Lara Andrea Lizbeth, de la Cruz Romero Durvel*, Pérez Vidal Hermicenda,
Pacheco Sosa José Guadalupe, Torres Torres José Gilberto, López Cuauhtémoc Ignacio

División Académica de Ciencias Básicas, Universidad Juárez Autónoma de Tabasco,
Cunduacán, Tabasco, C.P. 86690, México.

*delacruzdurvel@gmail.com

Resumen

La fermentación oscura es uno de los procesos más estudiados, en ausencia de luz y oxígeno; los microorganismos pueden producir hidrógeno a partir de una variedad de sustratos e inóculos. En esta investigación se pretende conocer el estado del arte del tema en estudio y realizar una investigación bibliográfica de revistas indexadas en bases de datos confiables para encontrar las condiciones de mayor tasa de producción de hidrógeno mediante la fermentación oscura. Se plantea una metodología que describe claramente el proceso de búsqueda bajo un estudio comparativo considerando revistas a nivel mundial en el periodo 2016 al 2022. Los resultados óptimos demuestran que la mejor tasa de producción es de 7.52 L H₂/L día bajo condiciones de operación: reactor UASB (Upflow Anaerobic Sludge Blanket), pH de 5.5, tiempo de retención hidráulica (TRH) de 4 horas, temperatura de 35°C y carga orgánica de 11.26 g.

Palabras claves: Inóculo, reactor UASB, sustrato, tiempo de retención hidráulica.

Abstract

The dark fermentation is one of the most studied processes, in the absence of light and oxygen; microorganisms can produce hydrogen from a variety of substrates and inoculums. This research aims to know the state of the art of the subject under study and to carry out a bibliographic research of journals indexed in reliable databases to find the conditions with the highest rate of hydrogen production by dark fermentation. A methodology is proposed that clearly describes the search process under a comparative study considering journals worldwide in the period 2016 to 2022. Results show that the best production rate is 7.52 L H₂/L per day under operating conditions: UASB (Upflow Anaerobic Sludge Blanket) reactor, pH 5.5, hydraulic retention time (HRT) 4 hours, temperature 35°C and organic load 11.26 g.

Keywords: Inoculum, reactor UASB, substrate, hydraulic retention time.

Recibido: 15 de febrero 2022. Aceptado: 05 de abril de 2022. Publicado: 15 de agosto 2022.



1. Introducción

La fermentación oscura es una alternativa prometedora para la obtención de energías renovables debido a su baja contaminación ambiental por efecto de gases invernaderos. Actualmente se están desarrollando investigaciones enfocadas a la producción de hidrógeno por diferentes medios tal es el caso de la fermentación oscura en donde no se han encontrado resultados concluyentes, existiendo aún la incógnita de ¿Cuáles serán las condiciones óptimas de operación para disminuir la contaminación ambiental y encontrar nuevas alternativas de energía renovable?. En este trabajo se encontraron estudios realizados por *Hernández (2018) "Hydrogen production in a novel configuration of UASB reactor under different hydraulic retention time"* donde concluye que utilizar la fermentación oscura es óptima por vía metabólica para la obtención de energía. En esta investigación se pretende conocer el estado del arte del tema en estudio y realizar una revisión crítica de revistas indexadas a bases de datos confiables para encontrar las condiciones de operación óptimas para la producción de hidrógeno y plantear una metodología que describa el proceso de búsqueda realizado.

2. Estado del arte

La sustentabilidad energética cada vez está más cerca de ser real, la eficiencia energética y energías renovables se integran para dar una visión de la transición energética de los combustibles fósiles al uso de energía verde o renovable. La organización de las naciones unidas (ONU) adopto los objetivos del desarrollo sostenible para la agenda 2030 en el cual incluyen objetivos como garantizar el acceso a una energía asequible, segura, sostenible y moderna en donde propone aumentar la producción de energía fiable, suficiente y con preparación para una recuperación económica más sostenible, por otra parte, adoptan medidas urgentes para combatir el cambio climático y sus efectos donde proponen inversiones para acelerar la descarbonización, tener crecimiento sostenible, hacer que la sociedad sea más resiliente para optar por una transición energética verde [1].

El consumo energético tiene amplias consecuencias ambientales por las emisiones de gases de efecto invernadero (dióxido de carbono, óxido de nitrógeno, metano y ozono) [2]. La energía procede de combustibles fósiles que representa el 80% del consumo energético que contribuye a los cambios climáticos [3]. El gas natural es un combustible fósil sin embargo está constituido principalmente por metano; la fuga de gas natural es una de las principales fuentes de emisión de metano; la energía solar, hidroeléctrica y energía eólica tienen impactos negativos, los materiales tóxicos y productos químicos que utilizan causan afectaciones al medio ambiente y las represas hidroeléctricas causan impactos al hábitat y ecosistemas de los animales [4]. Actualmente se están desarrollando investigaciones enfocadas a la producción de biohidrógeno por diferentes procesos que se pueden clasificar en sistemas de síntesis como la fermentación oscura, fotofermentación y biofotólisis utilizando cultivos mixtos y cultivos puros de bacterias productoras de hidrógeno [5].

2.1 Fermentación oscura

El hidrógeno se descubrió en 1781 por Henry Cavendish donde fue aislado y se le dio el nombre de hidrógeno molecular. Dado sus características se ha utilizado en la invención de electrolizadores y celdas de combustión y desde la crisis petrolera ha surgido el interés en emplearlo como energía alterna [6]. Este biogás se considera un combustible limpio porque solo se produce agua en su proceso de fermentación,

no libera monóxido de carbono y dióxido de carbono. Además, que la obtención de este combustible se realiza a partir de materias primas renovables como efluentes industriales y desechos orgánicos.

La alternativa a esta fuente de producción de hidrógeno es la fermentación de azúcares por el grupo de bacterias entéricas que resulta eficiente como fuente de energía por ser incapaz de causar fuertes impactos ambientales [7]. Desacuerdo con lo anterior, en este artículo se pretende realizar una revisión crítica de la producción de hidrógeno mediante fermentación oscura con el objeto de encontrar las condiciones óptimas de operación para su producción y plantear una posible metodología.

Las rutas bioquímicas son características porque los catalizadores en este proceso son los microorganismos. Estos procesos se pueden llevar a cabo por bacterias anaeróbicas y la producción puede diferir entre los microorganismos y sustratos utilizados [6].

La fermentación oscura, es uno de los procesos más estudiados, en ausencia de oxígeno los microorganismos pueden producir el hidrógeno a partir de una variedad de sustratos (hidrolizados, aguas residuales, residuos orgánicos) e inóculos (lodos anaeróbicos de plantas de tratamiento y cultivos puros de bacterias como *Enterobacter* y *Clostridium*) [5]. Usualmente la principal fuente de carbono viene de los carbohidratos de los sustratos colocados, los más utilizados son la glucosa, xilosa, almidón y celulosa, sin embargo, también se han podido encontrar estudios donde utilizan hidrolizados de efluentes industriales como suero de queso, lodo anaeróbico de plantas de tratamiento, agua residual de textiles, estiércol, pañales desechables y residuos sanitarios. La fermentación oscura se realiza a partir de la digestión anaeróbica, el proceso de la digestión se compone en cuatro etapas (Figura 1).

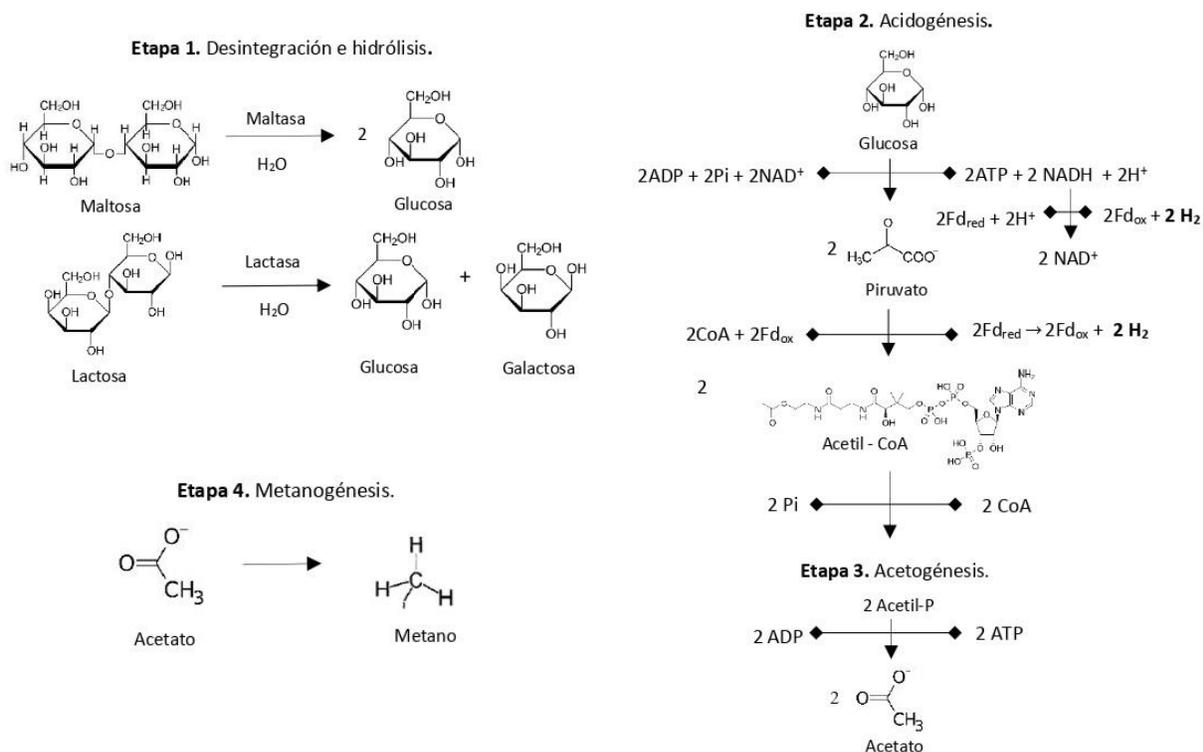


Figura. 1. Modificado (Palomo,2018) proceso de digestión anaeróbica en cuatro etapas.



La primera etapa de desintegración e hidrólisis donde se hidrolizan los compuestos orgánicos complejos (carbohidratos, proteínas y lípidos) para convertirse en compuestos orgánicos más simples o de menor peso molecular (azúcares, aminoácidos y ácidos grasos). La segunda etapa de acidogénesis se convierten los compuestos orgánicos simples en ácidos grasos volátiles (acetato, propionato, butirato, etc.), esto es a través de la ruta bioquímica de Embden-Mayerhof (glucólisis). El piruvato puede seguir diferentes reacciones de óxido-reducción dando lugar a diferentes ácidos generales como el lactato, succinato, acetato, butirato y formiato. La tercera etapa es la acetogénesis en el cual los ácidos grasos volátiles se convierten en hidrógeno gas [8]. Y la última etapa metanogénesis en donde la materia orgánica va transformándose en distintos compuestos intermedios hasta convertirse en biogás. De acuerdo con la figura 2 podemos describir en forma general la fermentación oscura a partir de la glucosa.

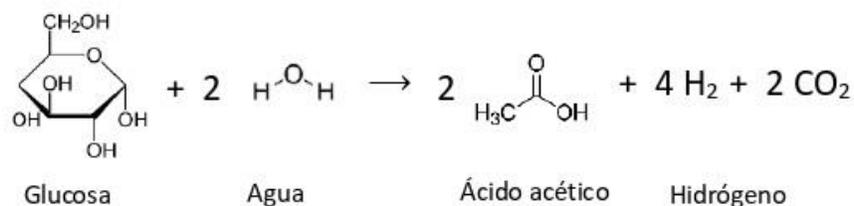


Figura 2. Ecuación general de la producción de hidrógeno por vía del ácido acético.

En la reacción la producción máxima teórica es de 4 moles de H_2 por mol de glucosa consumida cuando el ácido acético es el único ácido graso volátil. Por otro lado, existe otra vía de producción de hidrógeno cuando el producto final es el ácido butírico donde solamente se producen 2 moles de H_2 por mol de glucosa [9].

3. Metodología

La presente investigación comparativa fue realizada de manera exhaustiva en las bases de datos confiables REDALYC, DOAJ, Dialnet, Elsevier, Springer Link y Science Direct, empleando palabras claves para efectos de búsqueda *dark fermentation*, *hydrogen production*, *fermentación oscura*, *biological production of hydrogen*.

Se realizó un análisis de los artículos científicos publicados donde se tomaron en cuenta criterios de inclusión determinantes para la selección de artículos, los cuales se describen a continuación:

- Artículos experimentales indexados en revistas científicas de alta confiabilidad.
- Estudios experimentales con fecha de publicación desde el 2016 hasta la actualidad.
- Estudios con resultados precisos y metodología descrita correctamente.
- Se tomaron en cuenta estudios de diversos países que cumplan con los criterios de confiabilidad.
- Se limitó la búsqueda a investigaciones en inglés y español.

Los criterios de exclusión fueron estudios descriptivos y bibliográficos, que no ofrecen información experimental detallada de la metodología, estudios con metodologías mal fundamentadas, artículos con resultados desconfiables o incompletos y con fecha de publicación menores al 2015.

Por último, atendiendo los objetivos de la investigación, se enfocó la búsqueda a una comparación entre las metodologías y resultados descritos por cada autor con el objeto de determinar la mejor tasa de producción de hidrógeno y conocer las condiciones de operación.



En las diferentes bases de datos consultadas se obtuvieron 34 artículos con información sobre la producción biológica de hidrógeno por fermentación oscura.

4. Resultados

La optimización de la producción de hidrógeno se realiza de acuerdo al seguimiento de las condiciones de operación, dentro de los parámetros que tienen impacto y relevancia en la producción del biohidrógeno se encuentran el pH, temperatura, tiempo de retención hidráulica, carga orgánica. Con forme a los resultados obtenidos de la revisión crítica, se realizó una tabla (tabla 1) con 34 artículos de revistas indexadas de bases de datos confiables donde se compararon las condiciones operacionales en función de la tasa de producción de diversos autores.

Tabla 1. Tabla comparativa de las condiciones de operación de diversos autores.

T °C	pH	TRH horas	Reactor	Carga orgánica g	Tasa de producción L H ₂ / L día	Rendimiento mol H ₂ / mol consumido	Inóculo	Sustrato	Referencia
30	6.8	---	Frascos serológicos	22.5	0.25	1.23	<i>Enterobacter asburiae</i>	Suero de queso en polvo	[10]
30	5.5	6	Frascos Erlenmeyer herméticos	10	0.23	---	Lodo de planta de tratamiento	Biomazas agroindustriales	[11]
35	5.5	5	Reactor discontinuo	12	0.70	---	Digestor anaeróbico	Mucilago de residuos de cacao	[12]
37	7.0	3	Reactor discontinuo	10	0.19	---	Digestor de estiércol de vaca	Glucosa	[13]
35	7.0	4	UASB	11.3	6.2	---	Lodo residual anaerobio	Sacarosa	[14]
30	6.5	4	Reactor discontinuo	0.05	1.2	---	Lodo residual anaerobio	Residuos de frutas y mucilago de café	[15]
35	5.4	12	UASB	11.26	4.8	---	Agua sintética	Sacarosa	[16]
35	7.0	8	Reactor discontinuo	4.76	1.9	---	Lodos anaeróbico	Suero de queso	[17]
37	6.0	6	Reactor discontinuo	13.55	4.05	---	Lodos anaeróbico	Pañales desechables y residuos sólidos caducados	[18]
30	7.0	8	Biorreactor	20	2.3	---	Efluente de alimentos líquidos	Sólidos orgánicos (papa, zanahoria, repollo y pasta).	[19]
60	6.5	6	Reactor de lecho fijo	22.5	7.15	---	Agua residual de matadero	Hidrolizado de tronco de palma	[20]
35	6.0	8	Reactor de tanque agitado	5	0.86	---	Lodo anaeróbico de agua residual	Mucilago de café, cacao y estiércol porcino	[21]
55	4.8	12	Reactor semicontinuo	2.1	0.21	---	Lodo anaeróbico	Suero de queso y estiércol de búfalo	[22]
55	5.0	24	CSTR	6	0.06	---	Lodo alimentado de estiércol de cerdo	Hidrolizado de paja de arroz	[23]
37	6.5	24	Frascos serológicas	0.5	0.01	0.04	Lodo anaeróbico	Hidrolizado de lodo residual crudo	[24]
37	5.5	1	Biorreactor	10	0.03	---	Lodo anaeróbico	Paja de <i>Secale cereale</i>	[25]
35	6.0	--	Botellas de fermentación de vidrio	10	0.02	0.40	<i>E coli</i> . Cepa TFYM	Hidrolizado celulosa trigo, bagazo de caña	[26]



T °C	pH	TRH horas	Reactor	Carga orgánica g	Tasa de producción L H ₂ / L día	Rendimiento mol H ₂ / mol consumido	Inóculo	Sustrato	Referencia
37	5.5	--	Fermentador de acero inoxidable cilíndrico	17	0.03	0.52	Lodo semillas de cultivo anaeróbico	Mezclas de aguas agroindustriales	[27]
37	7.0	12	Biorreactor	10	0.19	---	<i>Clostridium beijerinckii</i>	Agua residual de molinos de arroz con nanopartículas NiO y CoO	[28]
45	7.5	24	Frascos serológicos	12	1.56	0.85	Lodo anaeróbico	Agua residual lactato	[29]
37	5.7	--	Reactor por lotes	26	0.41	0.003	<i>Clostridium beijerinckii</i>	Hidrolizado de <i>Sargazo sp.</i> , con zeolitas 13X	[30]
35	6.5	7	Botellas de plástico	16	0.13	---	Lodo de semillas anaeróbico	Agua residual de almidón	[31]
40	5.0	5	Reactor discontinuo	5	0.16	---	Lodo residual agrícola	Desechos textiles de algodón	[32]
37	7.2	--	Reactor discontinuo	4	0.01	---	Agua residual cerveza	Antidepresivo Fluoxetina	[33]
50	7.0	1.3	Reactor discontinuo	2	0.26	4e-6	----	Pulque (agua miel, semilla y contrapunta)	[34]
35	5.5	8	Lecho fijo	6	1.21	0.87	Aguas residuales sintéticas peixoto	Sacarosa	[35]
35	5.5	4	UASB	11.26	7.52	---	Lodo anaeróbico	Aguas residuales sintéticas	[36]
30	6.5	12	Reactor discontinuo	73	1.20	---	---	Mucilago fresco, frutas y verduras	[37]
35	6.0	2	Botellas de suero	10	0.20	0.85	Lodo anaeróbico	Aguas residuales de azúcar moreno	[38]
70	7.0	24	Viales por lotes	7.5	0.24	1.29	Lodo anaeróbico	Xilosa	[39]
40	7.4	24	Vial de vidrio	0.15	0.007	0.04	---	<i>Cianobacterias</i> inmovilizadas	[40]
50	5.0	12	Biorreactor	20	0.17	---	Granulados anaeróbicos del digestor	Hidrolisis de biomasa de <i>Clorella sp.</i>	[41]
37	7.2	3	Reactor discontinuo	5	0.01	1.11	<i>Clostridium acetobutylicum</i>	Glucosa	[42]
35	6.3	15	UASB	24	0.05	0.01	Lodo anaeróbico	Agua residual de hierbas medicinales	[43]

A partir de la tabla comparativa se realizaron diversos gráficos que describen la tasa de producción obtenida para diferentes autores a partir de las condiciones de operación. En la figura 3, podemos observar los resultados sobre cómo trabaja la producción de hidrógeno bajo ciertas temperaturas, describen el efecto de las condiciones de operación bajo criterios de pH, carga orgánica y tiempo de retención hidráulica. Las gráficas se realizaron a partir de la comparación de resultados y se relaciona la tasa de producción de cada autor con el orden descendente de la tabla comparativa (tabla 1).

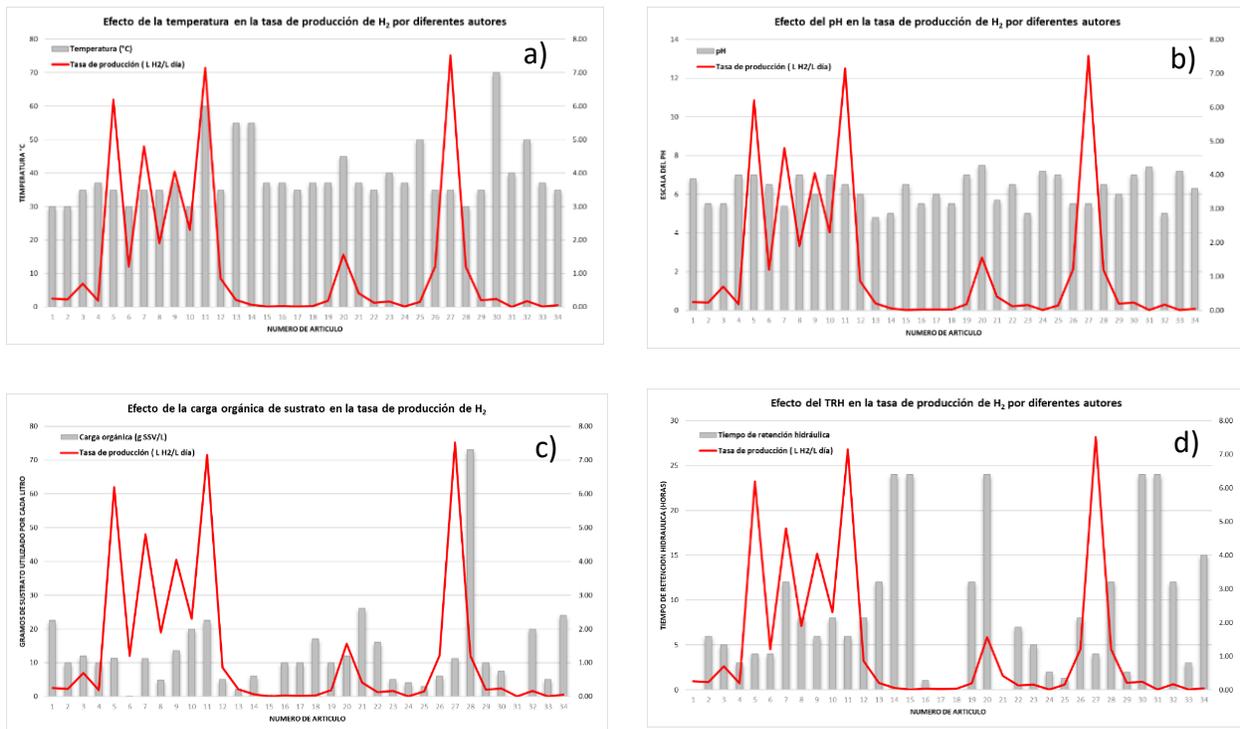


Figura 3. Tasa de producción de hidrógeno bajo diferentes condiciones a) temperatura, b) pH, c) carga orgánica y d) tiempo de retención hidráulica.

Las tasas de producción de hidrógeno a partir de la temperatura se describen en la figura 3a, se puede observar que el promedio de la temperatura de los diversos autores es de 30 – 37 °C, la temperatura con mejor tasa de producción es de 35°C. La influencia de la temperatura afecta el rendimiento debido a que se utilizan microorganismos en la reacción metabólica, utilizar altas temperaturas podría ocasionar una desnaturalización de proteínas y desorganización de las membranas.

En la figura 3b se presenta la influencia del pH en el rendimiento del hidrógeno, en promedio el pH utilizado por los autores es de 7 y esto es debido a que se utilizan microorganismos con rango óptimo de crecimiento de 6.0 a 8.5 por lo que controlar la reacción en pH ácido hacen que crezcan los microorganismos, pero no en la misma proporción y solo muy pocos prefieren pH básico.

Utilizar cargas orgánicas de mayor cantidad coadyuvará a mantener enriquecido el reactor, se presenta en la figura 3c por lo que se puede observar la influencia de la carga orgánica donde las tasas de producción mejor reportadas son las que tienen mayor carga orgánica.

Por último, utilizar un tiempo de retención hidráulica corto, hará que no esté saturada la presión del sistema y pueda haber mayor producción de hidrógeno, como se describe en la figura 3d.

Se planteó una posible metodología experimental como resultado de la investigación bibliográfica realizada, se describe en la figura 4 como un esquema experimental que consiste en utilizar como fuente inicial de microorganismos un lodo anaeróbico residual de plantas de tratamiento de aguas residuales municipales tratados térmicamente, la utilización de aguas industriales lácticas (suero de queso) como

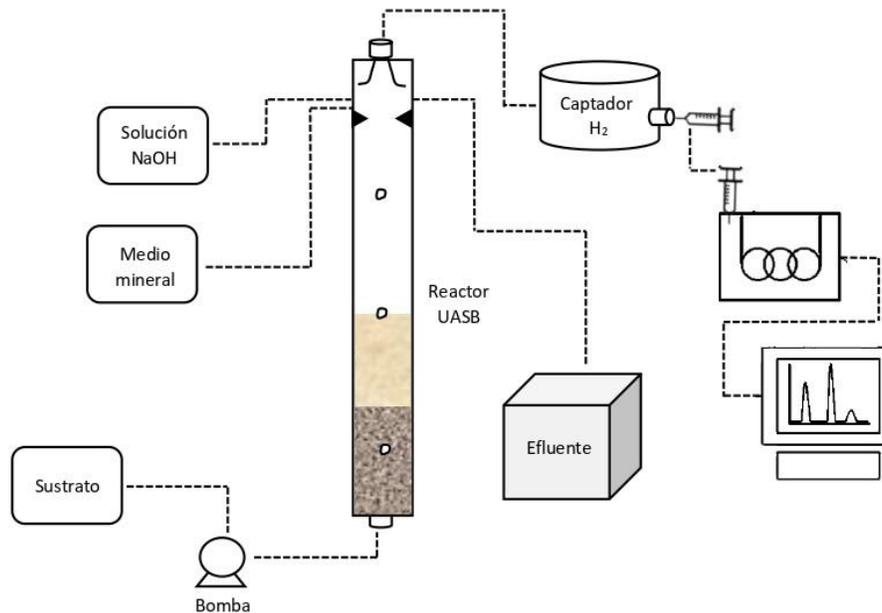


Figura 4. Representación esquemática del reactor en el laboratorio.

fuentes de hidratos de carbono y preparar soluciones minerales (fosfato sódico, fosfato disódico, fosfato potásico, cloruro de magnesio, cloruro de zinc, sulfato de hierro y sulfato de cobre) para maximizar la fermentación.

Se propuso utilizar un reactor UASB (Upflow Anaerobic Sludge Blanket) reactor de lecho de lodos de flujo ascendente) para la producción de hidrógeno donde agregar cantidades significativas de sustrato, adicionar una cantidad considerable de lodo anaeróbico y realizar este proceso bajo las condiciones de 35°C, pH de 5.5 ayudara a obtener mayor tasa de producción.

El artículo descrito por Hernández, 2018 fue el de mayor eficiencia con una tasa de producción de 7.52 L H₂ / L día con condiciones operacionales optimas pH de 5.5, TRH de 4 horas, temperatura de 35°C, carga orgánica de 11.26 g utilizando como inóculo lodo anaeróbico.

Es evidente en los gráficos, utilizar temperaturas mesofílicas ayudara a tener una producción eficiente de hidrógeno por lo que las bacterias productoras (*Enterobacter*, *Clostridium*) estarán en ambiente por el contrario si estuvieran a temperaturas termofílicas donde se desnaturalizarían. La implementación de pH neutros coadyuva a la obtención del hidrógeno porque el pH es un factor importante que influye sobre el crecimiento de los microorganismos ya que solo se desarrollan en rangos de 3 a 8.5. La influencia de la carga orgánica sobre la eficiencia del biohidrógeno es muy evidente, como podemos observar en el grafico 3, utilizar cantidades significativas de sustrato ayuda a mantener enriquecido el reactor para lograr óptimos resultados. El efecto del tiempo de retención hidráulica (TRH) juega un papel importante en la eficiencia porque teniendo tiempos cortos hace que no se sature el volumen del reactor y al ser tiempos más prolongados hace poco eficiente la producción.



Por último, utilizar soluciones básicas ayuda a mantener un pH neutro en el sistema porque al obtener el hidrogeno también se obtienen ácidos grasos volátiles por lo que cada vez más se vuelve alcalino el medio.

5. Conclusiones

Se ha revisado una amplia información donde resulta evidente que el proceso de la fermentación oscura es factible para el desarrollo de energía renovable como una fuente de energía limpia; utilizando residuos, condiciones operativas, reactores adecuados y pretratamientos hacen que se optimice la obtención de hidrógeno.

La fermentación oscura es una buena alternativa para obtener hidrógeno cuando se trabaja en un reactor UASB (Upflow Anaerobic Sludge Blanket), pH de 5.5, tiempo de retención hidráulica (TRH) de 4 horas, temperatura de 35°C y carga orgánica de 11.26 g.

A pesar de que la fermentación oscura enfocado en la producción de hidrógeno ha sido muy estudiada, actualmente muchos autores siguen mejorando las condiciones de operación, sustrato, inóculo, requerimientos nutricionales y reactores para obtener la máxima producción teórica de hidrógeno.

6. Agradecimientos

El autor le agradece al programa Verano de la Investigación Científica (VIC) UJAT 2021 por el apoyo otorgado durante toda la estancia de investigación.

7. Referencias

- [1] Organización de las Naciones Unidas ONU. “Objetivos del desarrollo sostenible”, 2021. Recuperado de: [Objetivos y metas de desarrollo sostenible - Desarrollo Sostenible \(un.org\)](https://www.un.org/).
- [2] Escoto, C.A. “Hogares y energía eléctrica en México.”, *Revista Espihnaco*, Vol. 5, No.2, 2016, 30-43.
- [3] Romao, B.B., Moreira, F.T., Barcelos, H.C., Soares, T., Cardoso, SL, Souza, J., Xavier, F.R. y Cardoso V.L. “Técnicas alternativas para mejorar la producción de hidrógeno por fermentación oscura”. *CrossMark*, Vol. 9, No. 18, 2019, 1-8.
- [4] Martínez, E., Rivas, L.A., y Vera, P.S. “El sector eólico en México y España” *Perfiles latinoamericanos*, No. 53, 2019. *Redalyc*. 1-19.
- [5] Khairul, I., Dunlop, P., Hewit, N., Lenihan, R., y Brandoni. “Producción de biohidrógeno a partir de aguas residuales: un estudio comparativo de procesos de producción intensivos de bajo consumo energético. *Limpio tecnologías*, MDPI, Vol. 3, No. 1, 2021, 156-182.
- [6] Brijaldo, M.H., Castillo, C., y Pérez, G. “Principales rutas en la producción de hidrogeno. *Ingeniería y competitividad*. *Redalyc*, Vol. 23, No. 2, 2021, 1-42.
- [7] López, J.P. “Microbiología de la producción de hidrógeno”. *Revista Eureka Enseñanza y Divulgación de las Ciencias*. *Redalyc*. Vol. 8, No. 2, 2011, 201 – 204.
- [8] Mamani, J., Llumipanta, F., Ramos, S., Rea, J., Alucho, J., Saltos, D., Llantos, F. y Jacome Cc. “Sistemas de producción de biogas: fundamento, técnicas de mejora, ventajas y desventajas. *Agroindustriales Science*. *Redalyc*, Vol. 11, No. 2, 2021, 239 – 247.
- [9] Sanjay, K.S., Jung-Kul, L., Vipin, C.K., “Bevond the theoretical yields of dark fermentative biohydrogen. *CrossMark*. Springer link, Vol. 58, 2018, 529-530.



- [10] Álvarez, G.C., Cisneros, C.S., H.V., Smoliriski, A., y León, R.A. "Biohydrogen production from cheese whey powder by enterobacter asburis: Effect of operating conditions on hydrogen yield and chemometric study of the fermentative metabolites". *Energy Reports*, vol. 6, No. 1, 2020, 1170-1180.
- [11] Rangel, C., Sstoque, J., Calderon, J., Mosquera, J., Velasquez, P., Cabeza, I., y Acevedo, P. "Hydrogen production by dark fermentation process: effect of initial organic load". *Chemical Engineering Transactions*, vol. 79, no. 8, 2020, 133-138.
- [12] Rojas, J.C., Ramirez, K.G., Velasquez, P.E., Acevedo, P. y Santis, A. "Evaluation of bio-hydrogen production by dark fermentation from Cocoa Waste Mucilage chemical Engineering Transactions". *AIDIC*, vol. 79, no. 1, 2020, 283-288.
- [13] Damayanti, A., Sarto, Sediawan, y W.B. "Biohydrogen Production by Reusing Immobilized Mixed Culture in Batch System". *Journal of Renewable Energy Development*, vol. 9, no. 1, 2020, 37 – 42.
- [14] Hernández, D.M., Hurtado, L.A., Rodríguez, C., & Tatiana, A. "Hydrogen production in a novel configuration of UASB reactor under different hydraulic retention time." *Revista Ion, DYNA*, vol. 85, no. 205, 2018, 57-162.
- [15] Cárdenas, M., León, E., Zapata, Z., y David, A." Biohydrogen production by co-digestion of fruits and vegetable waste and coffee mucilage". *Revista Facultad Nacional de Agronomía Medellín, Redalyc*, vol. 72, no.3, 2019, 9007-9018.
- [16] Hernández, D.M., Grisales, P.D., Rodríguez, C., y Tatiana, A. Efecto de la configuración de reactores anaeróbicos de alta tasa en la producción de hidrógeno: biomasa fija y UASB-híbrido, *Revista ION*, vol. 29, no. 1, 2016, 27-36.
- [17] Mikheeva, E.R, Katraeva, I.V.,Kovalev, A.A., Kovalev, D.A., Nozhevnikova A.N., Panchenko, V., Fiore, U., y Litti, Y.V. "The Start-Up of Continuous Biohydrogen Production from Cheese Whey Comparison of Inoculum Pretreatment Methods and Reactors with Moving and Fixed Polyurethane Carriers". *Applied Sciences. MDPI*, vol. 11, no. 5, 2021, 1-16.
- [18] Zagklis, D., Papadionysiou, M., Tsigkou, K., Tsafrakidou, P., Zafiri, C., y Kornaros, M. "Effect of pH on the Economic Potential of Dark Fermentation Products from Used Disposable Nappies and Expired Food Products". *Applied Sciences. MDPI*, vol. 11, no. 1, 2021, 1-12.
- [19] Hovorukha, V., Havryliuk, O., Gladka, G.,Tashyrev, O., Kalinichenko, A., Sporek, M., y Dolhanczuk, A. "Hydrogen Dark Fermentation for Degradation of Solid and Liquid Food Waste. *Energies*". *MDPI*, vol. 14, no. 2, 2021, 1-12.
- [20] Khamtib, S., Sittijunda, S., Imai, T., y Reugsang, A. "Co-digestion of Oil Palm Trunk Hydrolysate and Slaughterhouse Wastewater for Biohydrogen Production in a Fixed Bed Reactor by Immobilized *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* KKU19 on Expanded Clay". *Frontier in Energy Research*, vol. 9, no. 1, 2021, 1-10.
- [21] Amado, M., Barca, C., Hernandez, A.M., y Ferrasse, J.H. "Evaluation of Energy Recovery Potential by Anaerobic Digestion and Dark Fermentation of Residual Biomass in Colombia". *Frontiers in Energy Research*, vol. 9, no. 1, 2021, 1-12.
- [22] Ghimire, A., Luongo, V., Frunzo, L., Pirozzi, F., Lens, P.N.L., y Esposito, G. "Continuous biohydrogen production by thermophilic dark fermentation of cheese whey: Use of buffalo manure as buffering agent". *ScienceDirect. ELSEVIER. Hydrogen energy*, vol. 42, no. 8, 2017, 4861-4869.



- [23] Chen, H., Wu, J., Huang, R., Zhang, W., He, W., Deng, Z., Han, Y., Xiao, B., Luo, H., y Qu, W. "Effects of temperatura and total solid content on biohydrogen production from dark fermentation of rice Straw: Performance and microbial community characteristics. Chemosphere". ELSEVIER. Recuperado de: Effects of temperature and total solid content on biohydrogen production from dark fermentation of rice straw: Performance and microbial community characteristics - ScienceDirect, vol. 286, no. 1, 2021, 1-8.
- [24] Ilgi, K., y Onur, B. "Biohydrogen production from acid hydrolyzed wastewater treatment sludge by dark fermentation". ScienceDirect. Hydrogen Energy. ELSEVIER, vol. 45, no. 5, 2020, 3499-3508.
- [25] Domanski, J., Marchut, O., Cieciora, W., Patelski, P., Dzieknoska, U., Januszewicz, B., Zhang, B., y Dziugan, Production of Methane, Hydrogen and Ethanol from Secale cereale L". Straw Pretreated with Sulfuric Acid. Molecules. MDPI, vol. 25, no. 1013, 2020, 1-20.
- [26] Morsy, F.M., Elbadry, M., y Elbahloul, Y. "Semidry acid hydrolysis of cellulose sustained by autoclaving for production of reducing sugars for bacterial biohydrogen generation from various cellulose feedstock." PeerJ. Ela Eruglu, vol. 9, no. 3, 2021, 1-21.
- [27] Dareioti, M.A., Vavouraki, A.I., Tsigkou, K., & Zayri, C. (2021). "Dark Fermentative of Sweet Sorghum Stalks, Cheese Whey and Cow Manure Mixture: Effect of pH, Pretreatment and Organic Load". Processes MDPI., vol. 9, no. 25, 2021, 1-16.
- [28] Rambabu, K., Bharath, G., Thanigaivelan, A., Das, D.B., Show, P.L., y Banat, F. "Augmented biohydrogen production from rice mil wastewater through nano-metal oxides assisted dark fermentation". 2021. Bioresource Technology. ELSEVIER, vol. 319, no. 5, 2021, 1-10.
- [29] Ziara, R.M., Miller, D.N., Subbiah, J., y Dvorak, B.I. "Lactate wastewater dark fermentation: The effect of temperatura and initial pH on biohydrogen production and microbial community". ScienceDirect. Hydrogen Energy. ELSEVIER, vol. 44, no. 2, 2019, 661-673.
- [30] Sinbuathong, N., y Sillapacharoenkul, B. "Dark Fermentation of starch Factory eastewater with acid- and base-treated mixed microorganisms for biohydrogen production". Hydrogen Energy. ScienceDirect, vol. 46, no. 31, 2021, 16622-16630.
- [31] Solowski, G., Konkol, I., Shalaby, M., y Cenian, A. Rapid hydrogen generation from cotton wastes by mean of dark fermentation. Short Communication. SN Applied Sciences . Springer link, vol. 2, no. 1, 2020, 1-7.
- [32] Gao, Y., Zhao, J., Qin, C., Yuan, Q., Zhu, J., y Sun, Y. "Evaluating the effect of fluoxetine on mesophilic anaerobic dark biohydrogen fermentation of excess sludge". Bioresource Technology. ELSEVIER, vol. 336, no. 54, 2021, 1-9.
- [33] Rivera, G.A., Matsumoto, Y., & Baquero, R. "Análisis para la obtención de hidrogeno a partir de biogás proveniente de la fermentación de bebidas naturales". Ingeniería. Investigación y Tecnología, Redalyc, vol. 17, no. 2, 2016, 251-256.
- [34] Méndez, A.A., Torres, Y.V., y Rodríguez, T. "Effect of Organic Loading Rate in Hydrogen Production with Different Support Materials in Anaerobic Fixed-Bed Reactors". Ingeniería, Investigación y Tecnología. REDALYC, vol. 8, no. 2, 2017, 223-232.
- [35] Hernández, D.M., Hurtado, L.A., Rodríguez, C., y Tatiana, A. "Hydrogen production in a novel configuration of UASB reactor under different hydraulic retention time". DYNA, vol. 85, no. 205, 2018, 251-256.



- [36] Moreno, C., León, E., Zapata, Z., Arley, D. "Producción de biohidrogeno por codigestion de residuos de frutas y verduras y mucilagos de café. Revista Facultad Nacional de Agronomía Medellín". Redalyc, vol. 72, no. 3, 2019, 9007-9018.
- [37] Ding, J., y Zhao, J. "Effect of hydrogen partial pressure control on fermentative hydrogen production from organic wastewater". Nefes. Earth and Enviromental Science, vol. 188, no. 56, 2018, 1-8.
- [38] Chunsheng, Q., Puyu, S., Shumin, X., y Liping, S. "Effects of Ph and substrate concentrations on dark fermentative biohydrogen production from xylose by extreme thermophilic mixed culture". CrossMark. Microbiol Biotechnol, vol. 33, no. 7, 2017, 1-7.
- [39] Pansook, S., Incharoensakdi, A., y Phunpruch, S. "Enhanced dark fermentative H₂ production by agar-immobilized cyanobacterium *Aphanothece halophytica*". Journal of Applied Phycology. Springer link, vol. 31, no. 39, 2019, 2869-2879.
- [40] Subhashis, D., Rajnish, K.C., Ranjana, C., Kaustav, N., & Fasil, E.E. "Product Inhibition of Biological Hydrogen Production in Batch Reactors". Energies. MDPI, vol. 13, no. 34, 2020, 1-13.
- [41] Ziara, R., Miller, D.N., Subbiah, J., Dvorak, B.I. "Lactate wastewater dark fermentation: The effect of temperatura and initial Ph on biohydrogen production and microbial community", vol. 44, no. 2, 2019, 661-673.
- [42] Palomo, R. "Estrategias de control de las comunidades microbianas durante la fermentación oscura. Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica" A.C. IPICYT. 2018. 1-125.
- [43] Caiyu, S., Ping, H., Vida, Q., Bing, W., Xueying, D., y Yongfeng, L. "Co-production of hydrogen and methane from herbal medicine wastewater by a combined UASB system with immobilized sludge (H₂ production) and UASB system with suspended sludge (CH₄ production)", vol. 73, no. 1, 2016, 1-7.