

DOI: 10.24850/j-tyca-2022-03-01

Artículos

Biohidrógeno a partir de la fermentación oscura de las aguas residuales de la industria cervecera: evaluación preliminar

Biohydrogen from anaerobic treatment of brewery wastewaters: A preliminary study

Angélica M. Méndez¹

Tatiana R. Chaparro², ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0600-5414>

Juan Rueda-Bayona³, ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3806-2058>

¹Universidad Militar Nueva Granada, Facultad de Ingeniería, Grupo de Investigación en Agua y Energía (AyE), Bogotá, Colombia, angelica.mendezr@hotmail.com

² Universidad Militar Nueva Granada, Facultad de Ingeniería, Grupo de Investigación en Agua y Energía (AyE), Bogotá, Colombia, adela.rodriguez@unimilitar.edu.co

³Universidad Militar Nueva Granada, Facultad de Ingeniería, Grupo de Investigación en Agua y Energía (AyE), Bogotá, Colombia, juan.rueda@unimilitar.edu.co

Autora para correspondencia: Tatiana R. Chaparro,
adela.rodriguez@unimilitar.edu.co

Resumen

El gas hidrógeno se considera como la energía del futuro por ser renovable, limpia y no generar emisiones de gases de efecto invernadero como producto final de su combustión. Entre los procesos que existen para producir hidrógeno se encuentra la producción biológica a partir de aguas residuales con altos contenidos de carbohidratos mediante procesos anaerobios. La utilización del agua residual como fuente de biomasa para producir hidrógeno se considera una alternativa económica debido a que la materia prima es abundante y de fácil acceso. Con base en lo anterior, el presente estudio evaluó la producción de hidrógeno a partir de aguas residuales de la industria cervecera tratadas en un reactor anaerobio de manto de lodos y flujo ascendente (UASB) a escala de laboratorio. Para esto, se aplicó un choque térmico (90 °C/15 min) al inóculo, para inhibir a los microorganismos metanogénicos y promover la producción de H₂. Los resultados mostraron que con un valor de carga orgánica volumétrica de 9.1 gDQO/L.D., pH de 5.5 y un tiempo de detención hidráulica (TDH) de 2 h, el valor máximo de contenido porcentual de hidrógeno en el biogás fue de 21 %, lo que correspondió a un rendimiento de 6.50 mMolH₂/l. A partir de los resultados, se encontró que la variación en la composición inicial del agua residual influyó en la estabilidad y continuidad de la producción del gas hidrógeno (H₂). Por último, este estudio encontró la presencia de gas metano (CH₄) junto con

el gas hidrógeno, a pesar de mantener los valores de pH próximos a 5.5, y haber aplicado el choque térmico al inóculo.

Palabras clave: agua residual industrial, energía limpia, fermentación oscura, hidrógeno.

Abstract

Hydrogen gas is considered the energy of the future because it is renewable, clean, and does not generate greenhouse gas emissions. Among the existing processes for producing hydrogen, it is found biological production from residual wastewater with a high content of carbohydrates treated with an anaerobic process. The utilization of wastewater for hydrogen production is considered an economical alternative because the raw material is abundant and easy to access. In this sense, the present study assessed the hydrogen production from the wastewater of the beer industry treated by Up-flow Anaerobic Sludge Blanket Reactors (UASB). Then, it was applied a thermal shock (90 °C/15 min) to the inoculum, with a previous dark fermentation treatment. The results revealed that with an organic volumetric load of 9.1 gDQO/L.D., pH of 5.5, and a hydraulic retention time (HRT) of 2 h, the maximum percentage of hydrogen gas was 21 % which corresponds to a yield of hydrogen of 6.50 mMolH₂/l. According to the results was found that the initial compound of wastewater influenced the stability and continuity of hydrogen gas (H₂). Finally, this study identified the uncommon presence of methane gas (CH₄) with hydrogen gas, despite keeping pH values nearby to 5.5, and has applied a thermal shock to the inoculum.

Keywords: Clean energy, dark fermentation, hydrogen, industrial wastewater.

Recibido: 22/07/2020

Aceptado: 28/04/2021

Introducción

Actualmente, el 90 % de la energía mundial se produce a partir de los combustibles fósiles, considerados escasos y perjudiciales para el ambiente y los seres humanos. Entre los combustibles alternativos potencialmente aptos para sustituir a los combustibles fósiles está el hidrógeno. El hidrógeno es un combustible limpio, que genera en su combustión agua como único producto y tiene 2.75 veces más potencial energético que los hidrocarburos (Wei, Liu, & Zhang, 2010). Recientemente, la producción de biohidrógeno a partir de diferentes residuos orgánicos se ha convertido en una alternativa de bajo costo y eco amigable. Según Zhong, Stevens, y Hansen (2015), en la Primera Conferencia Mundial de Hidrógeno realizada en el año 2006 se identificó al gas hidrógeno como el primer portador de energía limpia del futuro, no sólo por su alta densidad energética (143 MJ/kg), la cual es 2.6 veces

más alta que el metano y 3.3 veces más alta que la gasolina, sino también porque su combustión sólo genera agua como subproducto. Sivagurunathan, Sen y Lin (2015) indicaron que la producción de hidrógeno a partir de la fermentación oscura ha ganado mucha atención en la actualidad debido principalmente a que existe un amplio rango de sustratos que pueden ser convertidos en hidrógeno sin gasto adicional de energía. Entre los sustratos que más se están estudiando están las aguas residuales de origen industrial con alto contenido de carbohidratos.

No obstante, el biogás no es el único producto de la digestión anaerobia que tiene valor energético; la conversión biológica de sustratos ricos en carbohidratos genera intermediarios como los ácidos grasos volátiles (AGV), que a su vez son constituyentes de otros productos con alto valor agregado como los polihidroxicanoatos (PHA), bioalcoholes, como etanol, butanol y gas hidrógeno (p. ej., subproductos de la fermentación oscura). La producción de hidrógeno y otros intermediarios se da a través del proceso de la fermentación oscura. Las estrategias para asegurar una efectiva producción de hidrógeno y ácidos orgánicos consisten en garantizar que en el sistema se tenga esencialmente organismos productores de hidrógeno, y optimizar las condiciones operacionales para asegurar que esta producción sea continua y estable (Barca, Soric, Ranava, Giudici-Ortoni, & Ferrasse, 2015). Las diferencias fisiológicas entre las bacterias acidogénicas y las *arqueas* metanogénicas representan la base fundamental para desarrollar mecanismos que permitan acumular hidrógeno y ácidos orgánicos. Revisando la literatura se observa que una de las estrategias más comunes consiste en la eliminación de los organismos metanogénicas (Castelló *et al.*, 2020).

El proceso de elaboración de la cerveza implica un gran número de procesos por lotes en el procesamiento de las materias primas para el producto final. Se emplean grandes cantidades de aguas para la producción de la cerveza, así como para el lavado general de suelos y bodegas, envasado y limpieza en el lugar. Estas aguas descargan un volumen significativo de aguas residuales, con altas concentraciones de contaminantes orgánicos, que se caracterizan por su elevado contenido de demanda bioquímica de oxígeno (DBO), demanda química de oxígeno (DQO) y sólidos suspendidos totales (SST) (Arantes *et al.*, 2019). Los tratamientos más empleados por lo general son aquellos que utilizan procesos anaerobios debido a la alta carga orgánica y alta biodegradabilidad de su agua (Arreola-Vargas, Flores-Larios, González-Álvarez, Corona-González, & Méndez-Acosta, 2016; Montiel-Corona & Razo-Flores, 2018). Esta tecnología, en combinación con procesos aerobios, como lodos activados, no sólo le va a permitir al sistema cumplir con la normatividad de vertimientos sino también generar la opción de aprovechar la producción de energía en forma de biogás rico en metano (CH₄) o hidrógeno (H₂). La producción de CH₄ por digestión anaerobia (DA) en este tipo de aguas es una tecnología ya establecida y muy conocida, mientras que la producción biológica de H₂ aún no ha sido ampliamente estudiada (Arantes *et al.*, 2019).

Existen varios estudios sobre producción de hidrógeno y metano a partir de procesos anaerobios tanto en una fase como en dos fases utilizando aguas residuales provenientes de la industria de bebidas alcohólicas. Arreola-Vargas *et al.* (2016) hicieron una evaluación sobre la recuperación de energía, utilizando el proceso de digestión anaerobia en

dos fases y en una fase a partir del tratamiento de aguas provenientes de la industria tequilera. Sus resultados mostraron que utilizando las dos fases, la producción de metano fue 3.3 veces mayor que cuando se operó en una sola fase. Sinbuathong, Somjit y Leungprasert (2015) trataron aguas reales de una industria cervecera en reactores anaerobios tipo Batch de 0.12 l, con la finalidad de producir hidrógeno. Variaron el pH entre 4 y 7, y aplicaron tres tipos diferentes de pretratamiento al inóculo, esto es, choque térmico, acidificación y adición de cloroformo. Se encontró sobre todo que las arqueas productoras de metano en los lodos provenientes del UASB de la cervecería toleraban el cambio de temperatura, además de los pretratamientos por adición de químicos, lo que llevó a que no exista inhibición total de estos microorganismos; por tanto, estos autores indicaron que las aguas residuales de la cervecería y el lodo fueron apropiadas para producir metano en lugar de hidrógeno.

Es importante mencionar que una de las mayores desventajas de la producción de biohidrógeno por medio de la fermentación oscura es la presencia de diferentes organismos, consumidores y/o inhibidores del gas hidrógeno (Sikora, Błaszczuk, Jurkowski, & Zielenkiewicz, 2013). Bundhoo y Mohee (2016) señalan que existen varios grupos de inhibidores, entre los que destacan las bacterias consumidoras de H₂ (p. ej., bacterias homoacetanogénicas, organismos fermentadores del ácido propiónico, arqueas metanogénicas); organismos que compiten por el mismo sustrato (p. ej., bacterias ácido-lácticas), y también se puede tener por la presencia de subproductos de la misma fermentación (p. ej., acumulación de ácidos). En este sentido, para evitar estas bacterias e incrementar la producción del H₂, es importante desarrollar métodos que

inhiban la actividad de tales microorganismos. De acuerdo con Castelló *et al.* (2020), el procedimiento que ha mostrado mejores resultados es la aplicación de pretratamientos al inóculo. En ese sentido, el objetivo de este estudio consistió en evaluar la producción de biohidrógeno por medio de la fermentación oscura aplicando un pretratamiento de choque térmico (90 °C/15 min) al inóculo en un reactor de manto de lodo anaerobio de flujo ascendente (UASB) en escala de laboratorio tratando aguas residuales provenientes de una industria cervecera.

Materiales y métodos

Agua residual

El agua residual proviene de una industria cervecera localizada en la ciudad de Bogotá. Las muestras del agua residual se tomaron una vez por semana durante un año en la canaleta Parshall, ubicada a la entrada de la planta de tratamiento de aguas residuales (PTAR). Una vez recolectadas las muestras se preservaron y almacenaron para su posterior análisis. Para la caracterización del agua se realizaron análisis de sólidos

suspendidos totales (SST), sólidos disueltos totales (SDT), sólidos totales (ST), alcalinidad total, ácidos volátiles totales (AVT), sulfatos (SO_4^{-2}), de demanda química de oxígeno (DQO), pH nitrógeno total, y fosfatos (PO_4^{-2}), utilizando el espectrofotómetro de marca HACH modelo DR5000 y siguiendo las recomendaciones de APHA (2012).

Montaje experimental

Se utilizó un reactor en escala laboratorio tipo UASB construido en acrílico, con diámetro (D) de 50 mm y altura (A) de 590 mm, y un volumen útil de 940 ml, lo que resultó en una relación longitud-diámetro (L/D) de 12 (Figura 1), acorde con las recomendaciones de Chaparro (2010). El reactor UASB convencional operó continuamente por 62 días, con un tiempo de retención detención hidráulica (TRH) de 2 h. El valor de TRH se escogió con base en lo sugerido por autores como Preethi, Banu, Gunasekaran y Kumar (2019), y una carga orgánica volumétrica promedio de 9.41 gDQO/L.D. El inóculo se obtuvo del reactor UASB que trata las aguas residuales de la industria cervecera. A este inóculo se le aplicó el tratamiento por choque térmico a 90 °C durante 15 min, siguiendo las recomendaciones de Lay *et al.* (2019), y Wang, Fang, Fang y Bu (2010). El valor del pH se ajustó a 5.5 con hidróxido de sodio 1N o ácido clorhídrico (10 mol/l), según fuera el caso.

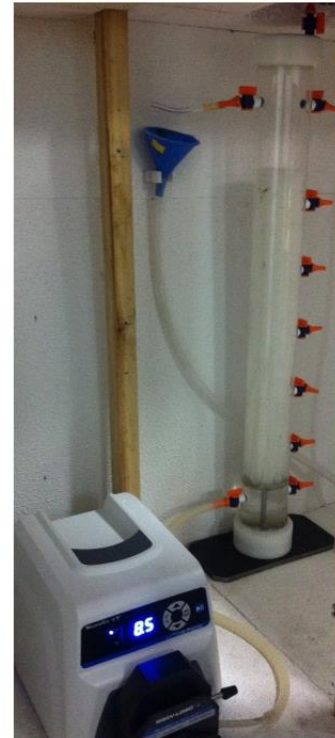
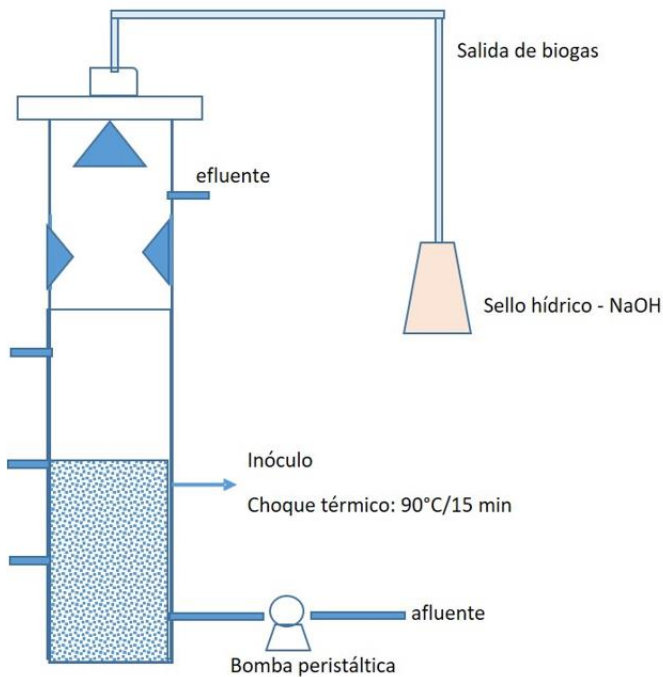


Figura 1. Montaje experimental y fotografía, reactor UASB (elaboración propia).

Determinaciones analíticas

Para evaluar el desempeño del reactor UASB se realizaron los siguientes análisis: demanda química de oxígeno, ácidos volátiles totales, alcalinidad total, alcalinidad parcial, alcalinidad intermedia, sólidos totales, sólidos

suspendidos, sólidos volátiles totales, sólidos volátiles suspendidos y pH; de acuerdo con la metodología descrita en APHA (2012), y Ripley y Boyle (1986), todas las determinaciones se realizaron tres veces por semana en duplicado. La composición del biogás, entre ellos el gas hidrógeno y el gas metano, se analizó en el cromatógrafo marca Agilent modelo 7890A, equipado con un detector de conductividad térmica con helio como gas de arrastre y una columna Carboxen 1010 Plot. La temperatura del inyector y del detector se mantuvo en 200 y 230 °C, respectivamente. El flujo del gas de arrastre fue de 1.5 ml/min; el volumen de la muestra que se inyectó fue de 0.7 ml.

Resultados y discusión

Las aguas residuales de la industria cervecera se generan a partir de varias actividades durante la producción, como limpieza de equipos e instalaciones; circuitos de refrigeración y calderas; envasado; sanitarias, y consumo de fábrica en general. Tal como se observa en la Tabla 1, estas aguas residuales se caracterizan por una alta variabilidad en la mayoría de los parámetros medidos. Una explicación de este resultado puede ser que la muestra se tomó en la canaleta Parshall a la entrada de la PTAR, justo antes del homogeneizador.

Tabla 1. Características del agua residual de la industria cervecera.

Parámetro	Unidad	Media	±	D.S.*
DQO	mg/l	868	±	174
pH	--	7	±	1.1
Alcalinidad total	mg CaCO ₃ /l	1 628	±	492
AVT	mg HAc/l	1 720		317
ST	mg/l	4 915	±	1 279
SST	mg/l	356	±	40
SO ₄ ⁻²	mg SO ₄ ⁻² /l	97	±	61
PO ₄ ⁻²	mg PO ₄ ⁻² /l	76	±	43
Cl	mg Cl ⁻¹ /l	144	±	37
NT	mg NT/l	32	±	10

*D.S.: desviación estándar. Elaboración propia.

A partir de los resultados de la Tabla 1 se puede decir que la composición del agua podría favorecer la producción de hidrógeno por vía anaerobia. Además, se evaluó la toxicidad debida a sulfatos con la relación DQO/SO₄⁻², que resultó en un valor medio de 12.2. De acuerdo con Chernicharo (2007), una relación DQO/SO₄⁻² mayor a 10 no causa problemas de toxicidad por presencia de sulfatos al proceso anaerobio. Finalmente, se observa que el contenido de nitrógeno y fósforo fue alto,

sobre todo como consecuencia de los aportes de levadura a las aguas residuales (Gugulethu-Erogan, 2014).

Producción de hidrógeno

En la Figura 2 se observa que la producción porcentual de hidrógeno no fue constante y no alcanzó el estado estable. Se considera que se alcanza el estado estable cuando la producción de H_2 no presenta una variación de alrededor del 10 % como sugieren Tapia-Venegas *et al.* (2015). El rendimiento máximo alcanzado fue de $6.50 \text{ mMolH}_2/\text{l}$, que correspondió a un 21 % de la composición del biogás para el día de operación 12. La producción de hidrógeno utilizando como materia prima aguas residuales industriales reales ha mostrado en diferentes estudios resultados favorables, pero bajo condiciones operacionales muy diferentes, lo que no permite establecer un patrón o definir valores para los parámetros de diseño y operación en la escala real. Por ejemplo, Amorim, Alves, Martins y Amorim (2014), empleando un reactor anaerobio de lecho fluidizado que trataba aguas residuales provenientes de la extracción de la yuca con un valor de TRH de 2 h produjeron $1.2 \text{ molH}_2/\text{mol}$ glucosa. Pachiega *et al.* (2019) estudiaron también la producción de hidrógeno a partir de las aguas residuales de la industria cervecera, ajustando el valor de pH a 5.5, en reactores anaerobios tipo Batch, pero con un TRH de 180 h; la

producción máxima fue de 15 molH₂/mol fructuosa. Yu, Zhu, Hu y Zhang, (2002) trataron agua residual de la producción de arroz en condiciones termofílicas con un pH de 5.5 y un TRH de 2 h, y su rendimiento máximo fue de 2.14 molH₂/mol hexosa.

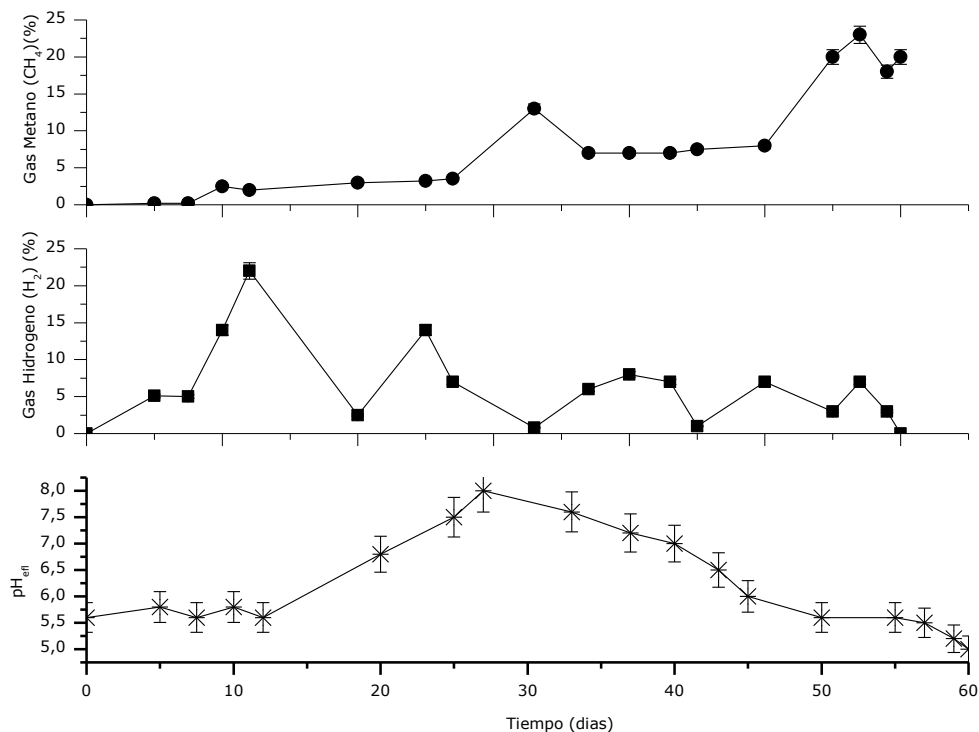


Figura 2. Variación temporal de la producción de hidrógeno, la producción de metano y el pH en el efluente en el reactor UASB. Elaboración propia. Nota: los valores de la producción porcentual del hidrógeno y del metano son el resultado de tres mediciones que hace internamente el cromatógrafo de gases.

La producción de hidrógeno fue inestable en el tiempo, pero continua; este resultado se puede atribuir a diferentes factores, entre ellos, los cambios que sufrieron las comunidades bacterianas por la presencia de consumidores y/o inhibidores de H_2 , y por la configuración del reactor o el tiempo escogido de detención hidráulica. Castelló *et al.* (2020), en una amplia revisión crítica sobre los factores que influyen en la estabilidad de la producción de hidrógeno, afirmaron que no existe hasta el momento un consenso en los valores de parámetros operacionales y configuraciones de los reactores para producir hidrógeno a partir de aguas residuales industriales reales. Varios estudios realizados sobre la producción de hidrógeno a partir de la digestión anaerobia, en particular operando en la fase de fermentación oscura en aguas de origen industrial, anotaron que aproximadamente a partir del día 25 de operación existe una tendencia en la disminución en la producción de hidrógeno, la cual no vuelve a restablecerse a los valores iniciales (Anzola-Rojas & Zaiat, 2014; Moureira, Lima, Kmiecik, & Zaiat, 2013; Penteado, Lazaro, Sakamoto, & Zaiat, 2013).

A pesar de lo anterior, se pueden establecer algunos hallazgos en este estudio: la producción de H_2 no sólo no fue estable, y además no se recuperó en el tiempo; aproximadamente desde el día 20 de operación disminuyó hasta parar por completo cerca del día 60; esta observación fue similar a la de otros autores, como Bundhoo y Mohee (2016); Sivagurunathan, Anburajan, Kumar y Kim(2016), y Si *et al.* (2015). En particular, Si *et al.* (2015) establecen que una de las causas que lleva a

la disminución en la producción de hidrógeno es la presencia de microorganismos homoacetanogénicos.

La preparación del inóculo tiene un papel clave en la producción continua y estable de hidrógeno. Autores como Bundhoo y Mohee (2015) hicieron una revisión extensiva sobre el efecto de varios pretratamientos en la producción de hidrógeno a partir de la fermentación oscura. Entre sus principales hallazgos estos autores indicaron que entre las tecnologías revisadas para el pretratamiento de inóculo, los pretratamientos con calor y ácido son los más estudiados y más efectivos. Además, anotaron que es necesario realizar más investigaciones para determinar las condiciones óptimas de pretratamiento antes de llegar a conclusiones definitivas.

Es importante mencionar que en este estudio en todas las muestras del biogás además del biohidrógeno hubo presencia de gas metano (CH_4) en menores proporciones (Figura 2). Una posible explicación para este fenómeno es que a pesar del pretratamiento térmico que se le hizo al inóculo no fue suficiente para inhibir o eliminar a las *arqueas* metanogénicas. A pesar del ajuste en el valor de pH en 5.5 al afluente del reactor, en el efluente se observaron valores promedio de 6.21, con excepción de los primeros ocho días de operación, en donde se alcanzaron valores cercanos a 8.0; Hawkes, Hussy, Kyazze, Dinsdale y Hawkes (2007), y Palomo-Briones *et al.* (2019) obtuvieron resultados similares.

Variación de los ácidos totales volátiles

La fermentación anaerobia está siempre acompañada por la producción de los ácidos volátiles. Un aspecto a tener en cuenta en este estudio es que en varias ocasiones el agua residual ya presentaba concentraciones altas de ácidos volátiles totales, lo que indica que el agua estaba parcialmente fermentada. Entonces, los valores fueron inicialmente mayores que $> 1\,500$ mgHAc/l y en promedio durante el tiempo de observación el aumento no fue superior al 20 %; como resultado, se alcanzó un valor promedio de $1\,800$ mgHAc/l, lo que indicó que no hubo producción interna de AVT conforme a lo expuesto por Chernicharo (2007).

La producción de hidrógeno se puede inhibir por el propio H_2 y por los ácidos grasos volátiles producidos durante el proceso de fermentación. La fermentación con ácido acético y butírico produce cuatro moles de H_2 por mol de glucosa y 2 mol de H_2 por mol de glucosa, respectivamente. Éstas son las principales rutas metabólicas por las cuales se produce H_2 en la fermentación oscura Sikora *et al.* (2013). Esto indica que para obtener una alta producción de H_2 debería correlacionarse con una alta producción de ácidos, situación que no siempre ocurre debido principalmente a la forma en que el ácido esté en el medio. Tanto el ácido acético como el ácido butírico son ácidos débiles que van a depender del valor del pH; en ese sentido, si el ácido no se disocia es más factible que pueda entrar en el citoplasma de los microorganismos causando un desbalance en el valor del pH, acidificando el medio e incrementando los requerimientos energéticos; como resultado, se generará un desequilibrio en el proceso; por ello, autores como Lee, Chua, Yeoh y Ngho (2014),

Mamimin *et al.* (2015), y Ghimire *et al.* (2015) plantearon que una de las mejores estrategias para producir hidrógeno a partir de aguas residuales con variaciones importantes de carga orgánica y valores de pH en el rango ácido originadas principalmente en la industria deberían implementar el proceso anaerobio en dos fases, pues de esa forma se optimizan los parámetros de operación como el TRH y pH, entre otros, en cada una de ellas, favoreciendo principalmente a los microorganismos que se envuelven en cada una de las etapas.

Finalmente, es relevante anotar que la producción de hidrógeno a partir de aguas residuales reales provenientes de la industria cervecera es una opción atractiva para que las industrias cumplan los límites de vertimientos establecidos en la normatividad ambiental y además puedan recuperar energía por medio de los subproductos generados durante el tratamiento de sus efluentes. Para esto, es necesario que el tratamiento anaerobio se realice en dos etapas: la primera, una fase de fermentación oscura para optimizar la producción de hidrógeno (H_2), y la segunda una fase para producir el gas metano (CH_4). Particularmente, se recomienda aumentar el tiempo de pretratamiento con choque térmico para inhibición de las arqueas metanogénicas; 15 minutos no es suficiente conforme se observó en este estudio, a pesar del bajo tiempo de detención hidráulico empleado y también el valor de pH en 5.5. Deben realizarse, dada la heterogeneidad del agua cruda, ensayos bajo experimentos factoriales para encontrar el rango óptimo de los parámetros operacionales.

Conclusiones

En este estudio se llevó a cabo una evaluación preliminar de la factibilidad de producir hidrógeno a partir de la fermentación oscura tratando aguas residuales reales provenientes de una industria cervecera. Se encontró que es factible producir hidrógeno con este tipo de efluentes utilizando un reactor anaerobio tipo UASB convencional a partir de la fermentación oscura. El rendimiento máximo alcanzado fue de 6.50 mMolH₂/l, que correspondió a un 21 % de la composición del biogás con un valor de la carga orgánica volumétrica de 9.1 gDQO/L.D. Sin embargo, no se logró mantener la estabilidad y continuidad del proceso a pesar de la aplicación del choque térmico al inóculo y el control del pH. Es importante mencionar que es necesario para futuros estudios evaluar la manera en que influyen factores tales como la variabilidad en la composición del agua residual, la configuración del reactor, la forma en que se realiza el pretratamiento al inóculo y su procedencia para mejorar la estabilidad del proceso biológico y, en consecuencia, la continuidad en la generación del gas hidrógeno.

Agradecimientos

Los autores expresan sus agradecimientos a la Universidad Militar Nueva Granada y al Ministerio de Ciencia, Tecnología e Innovación por el Colciencias por su apoyo financiero a la Ing. Angélica Andrea Méndez Revollo por medio de la beca en el programa de Jóvenes Investigadores.

A los Laboratorios de Calidad de Aguas y Saneamiento Ambiental por el apoyo técnico.

Referencias

- Amorim, N. C. S., Alves, I., Martins, J. S., & Amorim, E. L. (2014). Biohydrogen production from cassava wastewater in an anaerobic fluidized bed reactor. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, 31(3), 603-612. Recuperado de <https://doi.org/10.2166/wpt.2019.041>
- Anzola-Rojas, M., & Zaiat, M. (2014). *Estratégias para a produção contínua de hidrogênio em reator anaeróbico de leito fixo* (tese de Doutorado em Ciência). Escola de Engenharia de São Carlos Departamento de Hidráulica e Saneamento, Brazil.
- APHA, American Public Health Association. (2012). *Standard methods for examination of water and wastewater* (22nd ed.). Washington, USA: American Public Health Association.
- Arantes, M. K., Sequinel, R., Alves, H. J., Machado, B., Fiorini, A., & Da Silva, E. A. (2019). Improvement of biohydrogen production from brewery wastewater: Evaluation of inocula, support and reactor. *International Journal of Hydrogen Energy*. Recuperado de <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2019.07.208>
- Arreola-Vargas, J., Flores-Larios, A., González-Álvarez, V., Corona-González, R. I., & Méndez-Acosta, H. O. (2016). Single and two-stage anaerobic digestion for hydrogen and methane production from acid and enzymatic hydrolysates of Agave tequilana bagasse.

- International Journal of Hydrogen Energy*, 41(2), 897-904.
Recuperado de <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2015.11.016>
- Barca, C., Soric, A., Ranava, D., Giudici-Orticoni, M. T., & Ferrasse, J. H. (2015). Anaerobic biofilm reactors for dark fermentative hydrogen production from wastewater: A review. *Bioresource Technology*, 185, 386-398. Recuperado de <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.02.063>
- Bundhoo, M. A. Z., & Mohee, R. (2016). Science direct inhibition of dark fermentative bio-hydrogen production: A review. *International Journal of Hydrogen Energy*, 41(16), 6713-6733. Recuperado de <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2016.03.057>
- Bundhoo, M. A. Z., Mohee, R., & Hassan, M. A. (2015). Effects of pre-treatment technologies on dark fermentative biohydrogen production: A review. *Journal of Environmental Management*, 157, 20-48. Recuperado de <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2015.04.006>
- Castelló, E., Nunes-Ferraz-Junior, A. D., Andreani, C., Anzola-Rojas, M. del P., Borzacconi, L., Buitrón, G., Carrillo-Reyes, J., Gomes, S. D., Maintinguer, S. I., Moreno-Andrade, I., Palomo-Briones, R., Razo-Flores, E., Schiappacasse-Dasati, M., Tapia-Venegas, E., Valdez-Vázquez, I., Vesga-Baron, A., Zaiat, M., & Etchebehere, C. (2020). Stability problems in the hydrogen production by dark fermentation: Possible causes and solutions. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 119(May). Recuperado de <https://doi.org/10.1016/j.rser.2019.109602>

- Chaparro, T. R. (2010). Tratamiento anaeróbico seguido de proceso oxidativo avanzado. In: *Tratamiento de efluentes de branqueamiento de pulpa celulósica en reactor anaeróbico seguido de proceso oxidativo avanzado*. Sao Paulo, Brasil: Universidad de Sao Paulo.
- Chernicharo, C. (2007). *Anaerobic reactors*. New Delhi, India: IWA Publishing.
- Ghimire, A., Frunzo, L., Pirozzi, F., Trably, E., Escudie, R., Lens, P. N. L., & 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. Recuperado de <https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2015.01.045>
- Gugulethu-Erogan, I. (2014). Treatment of soft drink industry wastewater using an integrated anaerobic / aerobic membrane bioreactor. *Cape Peninsula University of Technology*, October, 154. Recuperado de http://digitalknowledge.cput.ac.za/jspui/bitstream/11189/2441/1/200679315_erdogan_ig_mtech_chem_eng_2014.pdf
- Hawkes, F. R., Hussy, I., Kyazze, G., Dinsdale, R., & Hawkes, D. L. (2007). Continuous dark fermentative hydrogen production by mesophilic microflora: Principles and progress. *International Journal of Hydrogen Energy*, 32(2), 172-184. Recuperado de <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2006.08.014>
- Lay, C. H., Vo, T. P., Lin, P. Y., Abdul, P. M., Liu, C. M., & Lin, C. Y. (2019). Anaerobic hydrogen and methane production from low-strength beverage wastewater. *International Journal of Hydrogen Energy*,

- 44(28), 14351–14361. Recuperado de <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2019.03.165>
- Lee, W. S., Chua, A. S. M., Yeoh, H. K., & Ngoh, G. C. (2014). A review of the production and applications of waste-derived volatile fatty acids. *Chemical Engineering Journal*, 235, 83-99. Recuperado de <https://doi.org/10.1016/j.cej.2013.09.002>
- Mamimin, C., Singkhala, A., Kongjan, P., Suraraksa, B., Prasertsan, P., Imai, T., & O-Thong, S. (2015). Two-stage thermophilic fermentation and mesophilic methanogen process for biohythane production from palm oil mill effluent. *International Journal of Hydrogen Energy*, 40(19), 6319-6328. Recuperado de <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2015.03.068>
- Montiel-Corona, V., & Razo-Flores, E. (2018). Continuous hydrogen and methane production from *Agave tequilana* bagasse hydrolysate by sequential process to maximize energy recovery efficiency. *Bioresource Technology*, 249(August 2017), 334-341. Recuperado de <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.10.032>
- Moureira, D., Lima, F., Kmiecik, W., & Zaiat, M. (2013). Comparison of the use of sucrose and glucose as a substrate for hydrogen production in an up flow anaerobic fixed-bed reactor. *International Journal of Hydrogen Energy*, 38(35), 15074-15083. Recuperado de <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2013.09.003>
- Pachiega, R., Rodrigues, M. F., Rodrigues, C. V., Sakamoto, I. K., Varesche, M. B. A., De-Oliveira, J. E., & Maintinguer, S. I. (2019). Hydrogen bioproduction with anaerobic bacteria consortium from

- brewery wastewater. *International Journal of Hydrogen Energy*, 155-163. Recuperado de <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2018.02.107>
- Palomo-Briones, R., Celis, L. B., Méndez-Acosta, H. O., Bernet, N., Trably, E., & Razo-Flores, E. (2019). Enhancement of mass transfer conditions to increase the productivity and efficiency of dark fermentation in continuous reactors. *Fuel*, 254(June), 115648. Recuperado de <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2019.115648>
- Penteado, E. D., Lazaro, C. Z., Sakamoto, I. K., & Zaiat, M. (2013). Influence of seed sludge and pretreatment method on hydrogen production in packed-bed anaerobic reactors. *International Journal of Hydrogen Energy*, 38(14), 6137-6145. Recuperado de <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2013.01.067>
- Preethi, T. M., Banu, J. R., Gunasekaran, M., & Kumar, G. (2019). Biohydrogen production from industrial wastewater: Advancement towards commercialisation. *Bioresource Technology Reports*, 7, 1002, <https://doi.org/10.1016/j.biteb.2019.100287>.
- Ripley, L. E., & Boyle, W. C. (1986). Improved alkalimetric monitoring for anaerobic digestion of high-strength wastes. *Journal of Water Pollution Control Federation*, 58(5), 406-411.
- Si, B., Li, J., Li, B., Zhu, Z., Shen, R., Zhang, Y., & Liu, Z. (2015). The role of hydraulic retention time on controlling methanogenesis and homacetogenesis in biohydrogen production using up flow anaerobic sludge blanket (UASB) reactor and packed bed reactor (PBR). *International Journal of Hydrogen Energy*, 40(35), 11414-

11421. Recuperado de
<https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2015.04.035>
- Sikora, A., Błaszczak, M., Jurkowski, M., & Zielenkiewicz, U. (2013). Chapter 21. In: *Lactic Acid Bacteria in Hydrogen-Producing Consortia: On Purpose or by Coincidence?* Recuperado de <https://doi.org/10.5772/50364>
- Sinbuathong, N., Somjit, C., & Leungprasert, S. (2015). Feasibility study for biohydrogen production from raw brewery wastewater. *International Journal of Energy Research*, 39(13), 1769-1777. Recuperado de <https://doi.org/10.1002/er.3321>
- Sivagurunathan, P., Anburajan, P., Kumar, G., & Kim, S. H. (2016). Effect of hydraulic retention time (HRT) on biohydrogen production from galactose in an up-flow anaerobic sludge blanket reactor. *International Journal of Hydrogen Energy*, 41(46), 21670-21677. Recuperado de <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2016.06.047>
- Sivagurunathan, P., Sen, B., & Lin, C. Y. (2015). High-rate fermentative hydrogen production from beverage wastewater. *Applied Energy*, 147, 1-9. Recuperado de <https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2015.01.136>
- Tapia-Venegas, E., Ramirez-Morales, J. E., Silva-Illanes, F., Toledo-Alarcón, J., Paillet, F., Escudie, R., Lay, C. H., Chu, C. Y., Leu, H. J., Marone, A., Lin, C. Y., Kim, D. H., Trably, E., & Ruiz-Filippi, G. (2015). Biohydrogen production by dark fermentation: Scaling-up and technologies integration for a sustainable system. *Reviews in*

- Environmental Science and Biotechnology*, 14(4), 761-785.
Recuperado de <https://doi.org/10.1007/s11157-015-9383-5>
- Yu, H., Zhu, Z., Hu, W., & Zhang, H. (2002). Hydrogen production from rice winery wastewater in an upflow anaerobic reactor by using mixed anaerobic cultures. *International Journal of Hydrogen Energy*, 27(11-12), 1359-1365. Recuperado de [https://doi.org/10.1016/S0360-3199\(02\)00073-3](https://doi.org/10.1016/S0360-3199(02)00073-3)
- Wang, H., Fang, M., Fang, Z., & Bu, H. (2010). Bioresource technology effects of sludge pretreatments and organic acids on hydrogen production by anaerobic fermentation. *Bioresource Technology*, 101(22), 8731-8735. Recuperado de <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.06.131>
- Wei, J., Liu, Z. T., & Zhang, X. (2010). Biohydrogen production from starch wastewater and application in fuel cell. *International Journal of Hydrogen Energy*, 35(7), 2949-2952. Recuperado de <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2009.05.035>
- Zhong, J., Stevens, D. K., & Hansen, C. L. (2015). Optimization of anaerobic hydrogen and methane production from dairy processing waste using a two-stage digestion in induced bed reactors (IBR). *International Journal of Hydrogen Energy*, 40(45), 15470-15476. Recuperado de <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2015.09.085>