

Análisis cinético de la producción de biohidrógeno usando vermicompost como inóculo y diferentes concentraciones de sustrato

María J. Pascualone

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

Resumen

Ante los desafíos actuales de descarbonización del sector energético, el hidrógeno ha demostrado ser un portador de energía prometedor. Su producción biológica resulta ser sostenible y respetuosa con el ambiente. Este trabajo tuvo como objetivo determinar los parámetros cinéticos a fin de establecer la relación inicial de concentración sustrato/inóculo (S/X) óptima para la producción de biohidrógeno, utilizando glucosa como fuente de carbono y un consorcio proveniente de vermicompost como inóculo. Los experimentos se llevaron a cabo mediante fermentaciones *batch*, en botellas serológicas de 120 mL, con diferentes concentraciones iniciales de sustrato (entre 5 y 50 g/L) a 35 °C y pH inicial de 5.5. El contenido de hidrógeno en el biogás (480 mL/L; 37%) y la velocidad de producción específica de hidrógeno (113.9 mL/g_{SV}/d) alcanzaron los valores más altos, cuando el sistema de reacción se alimentó con 15 g/L de glucosa, correspondiente a una relación S/X de 6 g_{glucosa}/g_{SV}. Asimismo, bajo dicha condición de cultivo, el tiempo de la fase lag (45 h) fue el más corto, y se obtuvo una alta eficiencia de degradación del sustrato (87%).

Palabras claves: Biohidrógeno, Fermentación, Parámetros cinéticos, Glucosa, Vermicompost.

Abstract

Given the current challenges of decarbonizing the energy sector, hydrogen has proven to be a promising energy carrier. Its biological production is sustainable and environmentally friendly. This study aimed to determine the kinetic parameters to establish the optimal initial substrate-to-inoculum concentration ratio (S/X) for biohydrogen production, using glucose as a carbon source and a consortium derived from vermicompost as inoculum. The experiments were conducted through batch fermentations in 120 mL serum bottles, with different initial substrate concentrations (ranging from 5 to 50 g/L) at 35°C and an initial pH of 5.5. The hydrogen content in the biogas (480 mL/L; 37%) and the specific hydrogen production rate (113.9 mL/g_{VS}/d) reached their highest values when the reaction system was fed with 15 g/L of glucose, corresponding to an S/X ratio of 6 g_{glucose}/g_{VS}. Additionally, under this culture condition, the lag phase time (45 h) was the shortest, and a high substrate degradation efficiency (87%) was achieved.

Key words: Biohydrogen, Fermentation, Kinetic parameters, Glucose, Vermicompost.

Introducción

La crisis energética mundial y el cambio climático son algunas de las principales preocupaciones del siglo XXI, derivadas de la creciente demanda de energía y las emisiones de gases de efecto invernadero en una economía basada en combustibles fósiles (Tahir et al., 2021; Lim & Nandong, 2022; Machhirake et al., 2024). Por esto, la descarbonización del sector energético es un aspecto primordial que motiva el desarrollo de fuentes de energía más limpias y sostenibles (Emodi et al., 2019; Arriaga et al., 2023). Entre las diversas estrategias de energía alternativa, el hidrógeno ha demostrado ser un portador de energía prometedor para los desafíos actuales, debido a su alta densidad energética (122 KJ/g) y características no contaminantes (su combustión produce únicamente agua) (Tahir et al., 2021; Arriaga et al., 2023). Sin embargo, en la actualidad, la tecnología más utilizada para la producción de hidrógeno es el reformado con vapor de gas natural (que aporta el 48% de la demanda mundial de hidrógeno), seguido del reformado de nafta (30%) y la gasificación del carbón (18%). Desafortunadamente, estas tecnologías tradicionales de procesamiento de combustibles fósiles requieren un alto consumo de energía y liberan gases perjudiciales al ambiente. Por su parte, la electrólisis del agua y la gasificación de la biomasa son dos alternativas bien conocidas que utilizan recursos renovables. No obstante, el principal inconveniente de estos enfoques renovables son sus altos requerimientos energéticos (Ghimire et al., 2015; Aly et al., 2017; Lim & Nandong, 2022).

El hidrógeno producido a partir de microorganismos se conoce como biohidrógeno y el proceso se considera libre de carbono, económico y sostenible. Aunque existen varias vías (biofotólisis, fotofermentación, fermentación oscura) para producir biohidrógeno, la ruta de producción fermentativa parece tener mayor potencial ya que no depende de la energía de la luz y presenta mayores tasas y rendimientos (Tahir et al., 2021; Pal et al., 2024). La performance de dicho bioproceso se ve afectada por condiciones ambientales y parámetros operativos como el pH, la temperatura, la concentración de sustrato, los micro y macronutrientes, el tipo de microorganismos, la configuración del biorreactor, entre otros

(Arriaga et al., 2023). Por lo expuesto, y sumado a la baja madurez de la tecnología, el análisis de los parámetros del modelado cinético puede proporcionar información útil sobre el comportamiento de la fermentación que puede guiar el diseño y la operación del proceso, contribuyendo así a la optimización de la producción de biohidrógeno (Lim & Nandong, 2022).

En cuanto a los microorganismos productores de hidrógeno, es necesario destacar que, se pueden encontrar en hábitats naturales como lodos, compost, suelos, sedimentos, lixiviados y desechos orgánicos. El uso de cultivos mixtos es preferible debido a su bajo costo, facilidad de control y alta versatilidad (Braguglia et al., 2018). Si bien los lodos anaeróbicos son la fuente inoculante más utilizada (Arriaga et al., 2023), en respuesta a la búsqueda actual de nuevos recursos naturales como fuente genuina de microorganismos productores de hidrógeno (Wang & Yin, 2017), solo dos trabajos en la literatura científica han propuesto el uso del vermicompost (Oceguera-Contreras et al., 2019; Pascualone et al., 2019). Este es un producto económico pero valioso como fuente natural de bacterias productoras de biohidrógeno. Es un biofertilizante resultante de un proceso biooxidativo de materia orgánica facilitado por lombrices de tierra, y que contiene una población microbiana con abundancia de bacterias pertenecientes al género *Clostridium* (Gómez-Brandón & Domínguez, 2014; Blomström et al., 2016; Pascualone et al., 2019).

Asimismo, una adecuada relación del contenido de sustrato por cantidad de inóculo (S/X) es esencial para un proceso eficaz. Una concentración de sustrato por debajo o por encima del nivel óptimo podría resultar en efectos adversos sobre los productores de hidrógeno, causando la limitación del sustrato o la inhibición por sustrato, respectivamente (Sittijunda & Reungsang, 2012; Elbeshbishy et al., 2017). Por lo tanto, el objetivo de este trabajo fue determinar los parámetros cinéticos del bioproceso a fin de evaluar los efectos de la concentración inicial de sustrato en la producción de biohidrógeno mediante ensayos *batch*. Se utilizó un medio definido rico en glucosa como sustrato y vermicompost tratado térmicamente como inóculo.

Materiales y Métodos

Inóculo

Se utilizó un cultivo mixto proveniente de vermicompost comercial (humus de lombriz) enriquecido mediante *shock* térmico. El inóculo, llevado por dilución con agua destilada a la concentración de sólidos volátiles (SV para expresar concentración de biomasa) de 2.5 g_{SV}/L, fue pretratado 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 como fuente de carbono y sales inorgánicas (mg/L): NH₄Cl, 3545.5; K₂HPO₄, 125; MgCl₂·6H₂O, 100; MnSO₄·H₂O, 9.8; FeSO₄·7H₂O, 25; CuSO₄·5H₂O, 5; CoCl₂·6H₂O, 135 y NaHCO₃, 6720. El pH inicial fue ajustado con una solución de H₂SO₄ 1 M.

Sistema de cultivo

Los experimentos de producción de hidrógeno se llevaron a cabo mediante cultivos *batch*, empleándose 80 mL de caldo de fermentación en botellas serológicas de 120 mL. Las botellas fueron selladas herméticamente con tapones de caucho y grapas metálicas. Inicialmente se gasearon con nitrógeno durante 60 s para lograr condiciones

anaeróbicas. Se realizaron diferentes ensayos variando la concentración inicial de glucosa de 5 a 50 g/L en el medio de cultivo definido. En cada botella se inoculó 8 mL de material de siembra a 72 mL de medio de cultivo rico en glucosa a pH inicial 5.5 y se incubó a 35 °C.

Métodos analíticos

El volumen de 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. 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 volátiles (APHA et al., 2023).

Modelado cinético

El modelo modificado de Gompertz (Ec. 1) ha sido ampliamente utilizado para describir el progreso de la producción acumulada de hidrógeno obtenida en un experimento *batch* (Bo et al., 2012; Wang & Yin, 2017; Velázquez-Martí et al., 2018):

$$H = H_{m\acute{a}x} \cdot e \left\{ -e \left[\frac{R_{m\acute{a}x} \cdot e}{H_{m\acute{a}x}} \cdot (\lambda - t) + 1 \right] \right\} \quad (\text{Ec. 1})$$

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. Los valores de H_{máx}, R_{máx} y λ para cada *batch* se determinaron ajustando los datos de producción de hidrógeno mediante la Ec. 1 con una regresión de mínimos cuadrados no lineal y minimizando con el método de Levenberg-Marquardt.

La producción de hidrógeno (mL/L) y la velocidad de producción volumétrica de

hidrógeno (mL/L/d) fueron calculadas considerando el volumen de trabajo (80 mL) en base a H_{máx} y R_{máx}, respectivamente. La velocidad de producción específica de hidrógeno se determinó dividiendo R_{máx} por el peso de biomasa añadida (SV) y se expresó en mL/g_{SV}/d (Hao et al., 2006). El rendimiento de hidrógeno se calculó a partir de H_{máx} y se definió como la cantidad de hidrógeno producido por la cantidad de glucosa consumida. La eficiencia de degradación del sustrato se estimó dividiendo la cantidad de sustrato consumido por la cantidad de sustrato inicial.

Asimismo, el modelo de Michaelis-Menten (Ec. 2) fue utilizado para describir los efectos de las distintas concentraciones de sustrato en las tasas de producción de hidrógeno (Chen et al., 2006).

$$R_{\text{máx}} = R_s \cdot \frac{S}{K_s + S} \quad (\text{Ec. 3.2})$$

donde $R_{\text{máx}}$ (mL/h) es la velocidad máxima de producción de hidrógeno durante el bioensayo, R_s (mL/h) es la velocidad de saturación, S (g/L) es la concentración de sustrato y K_s (g/L) es la constante media de saturación correspondiente a la concentración de sustrato que produce $\frac{1}{2} R_s$ (Scragg, 1996; Wang & Yin, 2017).

Los valores de las constantes K_s y R_s se obtuvieron a partir de la ecuación de Lineweaver-Burk, la cual es una de las formas linealizadas más frecuentemente empleada de la ecuación de Michaelis-Menten (Scragg, 1996).

Resultados y discusión

El contenido de glucosa en la carga de los biorreactores *batch* fue variado con el objeto de evaluar sus efectos sobre el proceso de fermentación a 35 °C y pH inicial 5.5. Para ello, se trabajó con concentraciones iniciales de glucosa en el medio de cultivo definido

entre 5 y 50 g/L, mientras que el contenido de inoculación fue de 2.5 g SV/L. Este valor fue seleccionado para el proceso fermentativo, dado que en experimentos previos la mayor producción de hidrógeno se logró con 2.5 gsv/L (Pascualone, 2019).

En todos los experimentos realizados, el biogás producido estuvo constituido solo por hidrógeno (24-37%) y dióxido de carbono (63-76%), no detectándose gas metano. Esto revela que el pre-tratamiento de *shock* térmico al inóculo fue eficaz en la inhibición de microorganismos metanogénicos. La Figura 1 muestra el efecto del tiempo de fermentación sobre la producción acumulada de hidrógeno, en función de la concentración inicial de glucosa. El nivel más alto de la bioproducción de hidrógeno se alcanzó empleando una concentración de sustrato de 15 g/L luego de 90 h de incubación. La generación de este gas fue despreciable cuando se emplearon concentraciones de glucosa < 5 g/L.

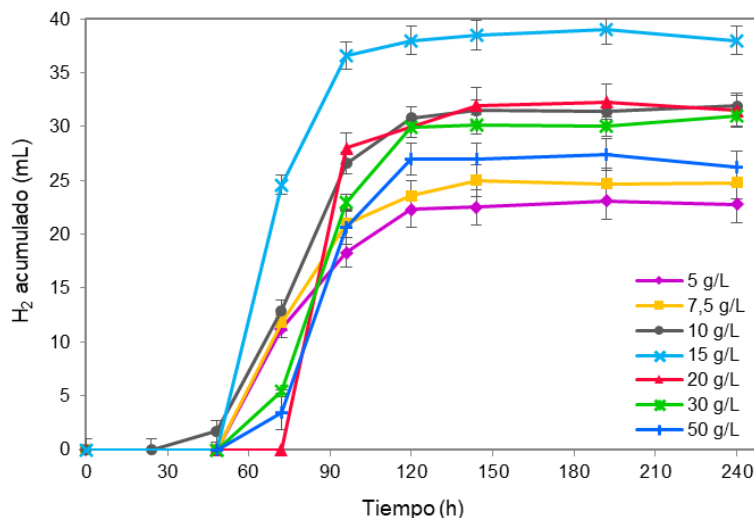


Figura 1. Variación de la acumulación de gas hidrógeno a 35 °C con el tiempo, a diferentes concentraciones iniciales de sustrato.

Asimismo, los datos experimentales de la Figura 1 fueron ajustados con la ecuación modificada de Gompertz, obteniéndose

coeficientes de correlación mayores a 0.97 para todos los sistemas *batch*. Los parámetros cinéticos obtenidos para

diferentes concentraciones de sustrato inicial se resumen en la Tabla 1. Como puede observarse, el valor de $H_{m\acute{a}x}$ aumentó 1.7 veces cuando el contenido inicial de glucosa se incrementó de 5 a 15 g/L; sin embargo, disminuyó con incrementos adicionales en las concentraciones iniciales de sustrato. La máxima producción de hidrógeno alcanzada fue de 38.4 mL (480 mL/L) con 37% v/v del mismo en el biogás cuando se cargó el biorreactor con 15 g/L, correspondiente a una

relación S/X de 6 $g_{glucosa}/g_{SV}$. Con respecto al valor de $R_{m\acute{a}x}$, se aprecia nuevamente un marcado aumento de 0.5 a 1.0 mL/h con el incremento de la concentración inicial de glucosa de 5 a 15 g/L, manteniéndose sin variaciones significativas cuando el contenido de sustrato varió de 20 a 50 g/L. Esto último se correlaciona con una fase de adaptación más prolongada, lo cual podría responder a una condición de inhibición por exceso de sustrato.

Tabla 1. Efecto de la concentración inicial de glucosa sobre el bioproceso de generación de hidrógeno.

| Glucosa (g/L) | Relación S/X | H ₂ (%) | Parámetros cinéticos | | | H ₂ (mL/L) |
|---------------|--------------|--------------------|-----------------------|-------------------------|-------|-----------------------|
| | | | H _{máx} (mL) | R _{máx} (mL/h) | λ (h) | |
| 5 | 2 | 24 ± 2 | 22.9 | 0.5 | 50 | 286 |
| 7.5 | 3 | 29 ± 2 | 24.7 | 0.6 | 53 | 309 |
| 10 | 4 | 34 ± 2 | 31.5 | 0.8 | 55 | 394 |
| 15 | 6 | 37 ± 1 | 38.4 | 1.0 | 45 | 480 |
| 20 | 8 | 32 ± 1 | 31.8 | 0.9 | 58 | 398 |
| 30 | 12 | 31 ± 2 | 31.0 | 0.9 | 66 | 387 |
| 50 | 20 | 29 ± 3 | 27.0 | 0.9 | 69 | 337 |

S/X: relación sustrato/inóculo ($g_{glucosa}/g_{SV}$).

H_{máx}: cantidad máxima de hidrógeno producido.

R_{máx}: velocidad máxima de producción de hidrógeno.

λ: tiempo de la fase lag.

Adicionalmente, se utilizó el modelo de Michaelis-Menten para describir el efecto de la concentración de sustrato sobre la velocidad máxima de biogeneración de hidrógeno. En la Figura 2 se puede observar la gráfica de los datos experimentales y los predichos por el modelo (en línea continua), la cual presenta su forma hiperbólica característica. La velocidad máxima de producción de hidrógeno fue dependiente de la concentración inicial del sustrato hasta 15 g/L. A concentraciones superiores, la velocidad del proceso fermentativo dejó de ser proporcional al contenido inicial de sustrato tendiendo a alcanzar un valor de saturación asintótico

(R_s). En acuerdo con lo reportado por Chen et al. (2006) para procesos que involucran la fermentación de carbohidratos puros, se puede señalar que ya a relaciones S/X relativamente bajas, las velocidades máximas de producción de hidrógeno tendieron a la saturación.

Por su parte, la linealización de la ecuación de Michaelis-Menten mediante el método de Lineweaver-Burk permitió estimar los valores de la velocidad de saturación del bioproceso (R_s) y la constante media de saturación (K_s) que representa la afinidad de los microorganismos por el sustrato, siendo 1.1 mL/h y 6.0 g/L, respectivamente.

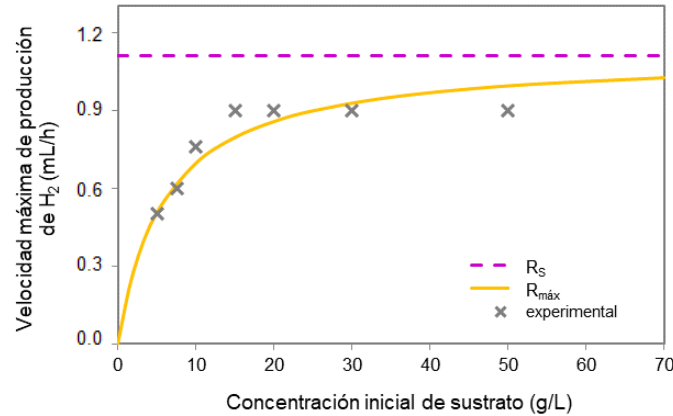


Figura 2. Efecto de la concentración de sustrato sobre la velocidad máxima de producción de hidrógeno.

En la Figura 3 se ilustra la variación del rendimiento y la velocidad de producción específica de hidrógeno con la concentración inicial de sustrato. Se puede apreciar que el rendimiento de hidrógeno en los ensayos *batch* osciló marcadamente entre 66.5 y 42.5 mL/g cuando se trabajó con los contenidos iniciales de sustrato más bajos (5-15 g/L); mientras que, a concentraciones más altas se mantuvo en un valor promedio de 54 mL/g. Con respecto a la velocidad de producción específica de hidrógeno, ésta duplicó aproximadamente su valor (de 58.6 a 113.9 mL/g_{SV}/d) cuando el contenido inicial de glucosa se incrementó de 5 a 15 g/L, para luego mantenerse sin grandes variaciones (alrededor de 105 mL/g_{SV}/d) a concentraciones crecientes de sustrato inicial por encima de 15 g/L.

En un rango apropiado, el incremento del contenido inicial de glucosa como fuente de carbono (acompañado con el aumento de la relación S/X) puede mejorar la capacidad fermentativa de las bacterias productoras de hidrógeno durante el bioproceso; sin embargo, la misma puede verse afectada a concentraciones iniciales demasiado altas del sustrato. A partir de los resultados obtenidos se considera que la concentración inicial de glucosa óptima para el proceso fermentativo de producción de hidrógeno fue de 15 g/L, correspondiente a una relación S/X de 6 g_{glucosa}/g_{SV}. Bajo esta condición experimental, el tiempo de la fase lag (45 h) fue el más corto, mientras que el contenido de hidrógeno en el biogás (37% v/v), la producción máxima de hidrógeno (480 mL/L) y su velocidad de producción específica (113.9 mL/g_{SV}/d) fueron los de mayor magnitud.

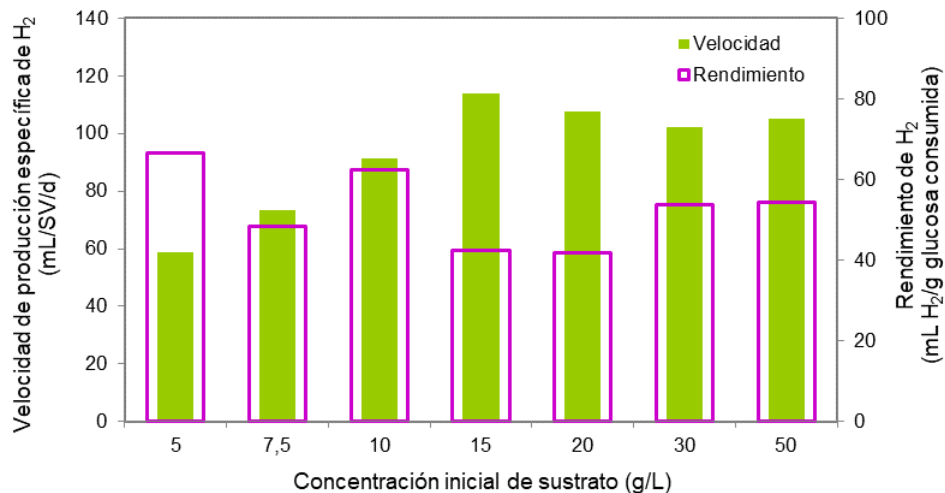


Figura 3. Velocidad de producción específica de hidrógeno y su rendimiento en función de la concentración inicial de sustrato.

En cuanto a la eficiencia de degradación del sustrato, el efecto de las distintas concentraciones de glucosa con que las que operaron los biorreactores *batch* se muestra en la Figura 4. Tal como se ilustra, el contenido de glucosa se agotó rápidamente a bajas concentraciones iniciales de sustrato, entre 5 y 15 g/L, las cuales se corresponden con relaciones S/X iguales o menores a 6 $\text{g}_{\text{glucosa}}/\text{g}_{\text{SV}}$. En este rango, el valor promedio de la remoción fue del 87%.

Por el contrario, concentraciones del sustrato por encima de 15 g/L ($S/X > 6 \text{ g}_{\text{glucosa}}/\text{g}_{\text{SV}}$) afectaron desfavorablemente a la eficiencia de degradación del mismo, siendo tan solo del 14% a 50 g/L. La marcada tendencia a disminuir que se observa en la Figura 4 pone de manifiesto un bioproceso inhibido por altas concentraciones de sustrato (Sittijunda & Reungsang, 2012).

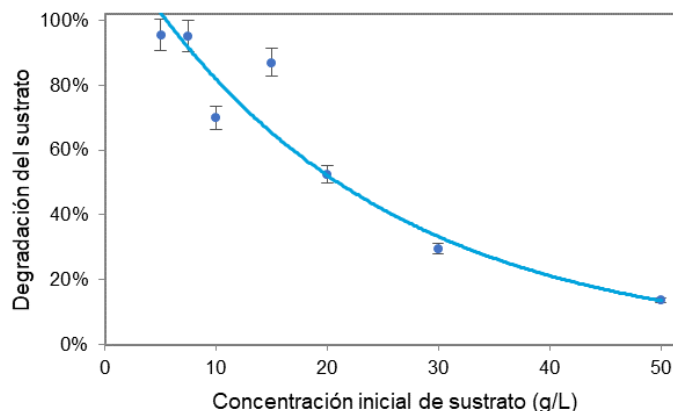


Figura 4. Eficiencia de degradación del sustrato a diferentes concentraciones iniciales de glucosa.

Conclusiones

Los experimentos de producción de biohidrógeno empleando un medio de cultivo definido rico en glucosa y vermicompost pretratado mediante *shock* térmico como biomasa inoculante, permitieron determinar los parámetros cinéticos del bioproceso y, por consiguiente, seleccionar las condiciones de operación que posibilitan la mayor velocidad de producción de hidrógeno en los biorreactores de fermentación *batch*. Se demostró que la relación de contenido entre glucosa y vermicompost afecta significativamente la cantidad de biohidrógeno producida. La concentración de glucosa más adecuada para el proceso de generación de hidrógeno fue 15 g/L, correspondiente a una relación sustrato/inóculo (S/X) de 6 $\text{g}_{\text{glucosa}}/\text{g}_{\text{SV}}$. Bajo estas condiciones operativas, el tiempo de la fase lag (45 h) fue el más corto, en tanto que, el contenido de hidrógeno en el biogás (37% v/v), la formación máxima de hidrógeno (480 mL/L) y su velocidad de producción específica (113.9 mL/g_{SV}/d) alcanzaron los valores más altos. Estos resultados son valiosos a la hora de diseñar bioprocesos con sustratos más complejos para la producción

de hidrógeno utilizando un novedoso consorcio a partir de vermicompost.

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 oportunamente.

Referencias

Aly SS, Imai T, Hassouna MS, Nguyen D, Higuchi T, Kanno A, Yamamoto K, Akada R & Sekine M (2017). Identification of factors that accelerate hydrogen production by *Clostridium butyricum* RAK25832 using casamino acids as a nitrogen source. *Int. J. Hydrogen Energ.* 43:5300-5313.

APHA, AWWA, WEF (2023) Standard methods for the examination of water and wastewater. 24th Ed. Washington, USA: American Public Health Association.

Arriaga S, Carboni MF & Lens P (2023) Effect of static magnetic field exposure on biohydrogen production via dark fermentation of glucose. *Process Saf. Environ. Prot.* 176:375-388.

- Blomström AL, Lalander C, Komakech AJ, Vinnerås B & Boqvist S (2016) A metagenomic analysis displays the diverse microbial community of a vermicomposting system in Uganda. *Infect. Ecol. Epidemiology* 6:32453.
- Bo W, Yongye L, Yahua Q, Yang Y, Qiang S, Wei W & Jianlong W (2012) Technology research on bio-hydrogen production. *Procedia Eng.* 43:53-58.
- Braguglia C., Gallipoli A., Gianico A., Pagliaccia P. (2018). Anaerobic bioconversion of food waste into energy: A critical review. *Bioresour. Technol.* 248:37-56.
- Chen WH, Chen SY, Khanal SK & Sung S (2006) Kinetic study of biological hydrogen production by anaerobic fermentation. *Int. J. Hydrogen Energ.* 31:2170-2178.
- Elbeshbishy E, Dhar BR, Nakhla G & Lee H-S (2017) A critical review on inhibition of dark biohydrogen fermentation. *Renew. Sust. Energ. Rev.* 79:656-668.
- Emodi NV, Chaiechi T & Rabiul Alam Beg ABM (2019) A techno-economic and environmental assessment of long-term energy policies and climate variability impact on the energy system. *Energy Policy* 128:329-346.
- Ghimire A, Frunzo L, Pirozzi F, Trably E, Escudie R, Lens PNL & Esposito G (2015) A review on dark fermentative biohydrogen production from organic biomass: Process parameters and use of by-products. *Appl. Energy* 144:73-95.
- Gómez-Brandón M & Domínguez J (2014) Recycling of solid organic wastes through vermicomposting: Microbial community changes throughout the process and use of vermicompost as a soil amendment. *Crit. Rev. Environ. Sci. Technol.* 44:1289-1312.
- Hao X, Zhou M, Yu H, Shen Q & Lei L (2006) Effect of sodium ion concentration on hydrogen production from sucrose by anaerobic hydrogen-producing granular sludge. *Chin. J. Chem. Eng.* 14:511-517.
- Lim SW & Nandong J (2022) Modeling of biohydrogen production using generalized multi-scale kinetic model: Impacts of fermentation conditions. *Int. J. Hydrogen Energ.* 47:17926-17945.
- Machhirake NP, Vanapalli KR, Kumar S & Mohanty B (2024) Biohydrogen from waste feedstocks: An energy opportunity for decarbonization in developing countries. *Environ. Res.* 252:119028.
- Miller GL (1959) Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.* 31:426-428.
- Oceguera-Contreras E, Aguilar-Juárez O, Oseguera-Galindo D, Macías-Barragán J, Bolaños-Rosales R, Mena-Enríquez M, Arias-García A, Montoya-Buelna M, Graciano-Machuca O & De León-Rodríguez A (2019) Biohydrogen production by vermicompost-associated microorganisms using agro industrial wastes as substrate. *Int. J. Hydrogen Energ.* 44:9856-9865.
- Owen WF, Stuckey DC, Healy Jr. JB, Young LY & McCarty PL (1979) Bioassay for monitoring biochemical methane potential and anaerobic toxicity. *Water Res.* 13:485-492.
- Pal D, Banerjee S, Chandra S, Das D, Pandit S, Roy A, Hasan M, Khandaker MU & Alreshidi MA (2024). The generation of biohydrogen from pretreated algal biomass in batch fermentation mode. *Int. J. Hydrogen Energ.* Available online. In Press.
- Pascualone MJ, Gómez Costa MB & Dalmaso PR (2019) Fermentative biohydrogen production from a novel combination of vermicompost as inoculum and mild heatpretreated fruit and vegetable waste. *Biofuel Res. J.* 6:1046-1053.
- Pascualone MJ (2019) Producción de biohidrógeno por fermentación: efecto de la concentración de inóculo. *Revista Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales*, 6:15-19.
- Scragg A (1996) Biotecnología para ingenieros. Sistemas biológicos en procesos tecnológicos. 1ra. Edición. México: Editorial Limusa.
- Sittijunda S & Reungsang A (2012) Biohydrogen production from waste glycerol and sludge by anaerobic mixed cultures. *Int. J. Hydrogen Energ.* 37:13789-13796.

Artículos

Tahir N, Nadeem F & Zhang Q (2021) Optimisation of photo-fermentative biohydrogen production from corn stover through the synergetic effect of ultrafine grinding and SnO₂ nanomaterials. *J. Clean. Prod.* 328:129631.

Velázquez-Martí B, Meneses-Quelal OW, Gaibor-Chavez J & Niño-Ruiz Z (2018) Review of Mathematical Models for the Anaerobic

Digestion Process. En: Anaerobic Digestion, J. Rajesh Banu, IntechOpen.

Wang J & Yin Y (2017) Biohydrogen production from organic wastes. *Green Energy and Technology*. Singapore: Springer Nature.