

Producción biológica de hidrógeno por vía fermentativa: Fundamentos y perspectivas

Gustavo Dávila-Vázquez* y Elías Razo-Flores

División de Ciencias Ambientales. Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica (IPICYT). San Luis Potosí, SLP, México. E-mail: gdv@ipicyt.edu.mx

Palabras clave: digestión anaerobia, fermentación, biohidrógeno

RESUMEN

El hidrógeno es un gas considerado como el energético del futuro debido a que su combustión o su utilización en celdas de combustible genera sólo agua como residuo. Las fermentaciones heterotróficas para la producción biológica de H₂ (Bio-H₂) son llevadas a cabo por una diversidad de microorganismos tales como anaerobios estrictos y facultativos, además de aerobios cultivados en condiciones anóxicas. Para ello se han utilizado sustratos simples como azúcares, almidón, celulosa e incluso residuos orgánicos de diversas fuentes. Esta breve revisión explora los trabajos recientes en la producción de hidrógeno por vía fermentativa, además de las limitaciones y retos dentro de esta área del conocimiento.

Key words: anaerobic digestion, dark fermentation, biohydrogen

ABSTRACT

Hydrogen is a valuable gas that is seen as a future energy carrier since its utilization via combustion or fuel cells produce pure water. Heterotrophic fermentations for biohydrogen (Bio-H₂) production are driven by a wide variety of microorganisms such as strict anaerobes, facultative anaerobes and aerobes kept under anoxic conditions. Substrates such as simple sugars, starch, cellulose, as well as diverse organic waste materials can be used for biohydrogen production. This mini-review explores the recent

research work carried out in fermentative hydrogen production. Their limitations and challenges yet to be solved are also mentioned.

INTRODUCCIÓN

Los requerimientos energéticos de la sociedad actual son casi totalmente satisfechos por las fuentes de combustibles fósiles, tales como el petróleo, carbón y gas natural. Sin embargo, existe una creciente evidencia científica de que el uso intensivo de estos recursos ha sido causa del cambio climático global y sus desastrosos efectos (Fig. 1, IPCC, 2007).



Fig. 1. Existe la necesidad de usar energías libres de emisiones de efecto invernadero.

Aunque existen algunas opciones energéticas sustentables que pueden emerger, una alternativa que cumple con las características de ser limpia y sustentable, es la utilización de hidrógeno (H₂) como combustible. El H₂ posee un alto rendimiento energético, 2.75 veces mayor que el de los hidrocarburos, y puede ser utilizado directamente para producir electricidad mediante celdas de combustible (Fig. 2). Esta tecnología presenta las ventajas de ser

muy eficiente, factible a cualquier escala y que solo produce agua y calor como desechos (Claassen *et al.*, 1999). Con ello, en la generación de energía, se reducen a cero las emisiones contaminantes que acompañan la combustión de hidrocarburos (Reith *et al.*, 2003).

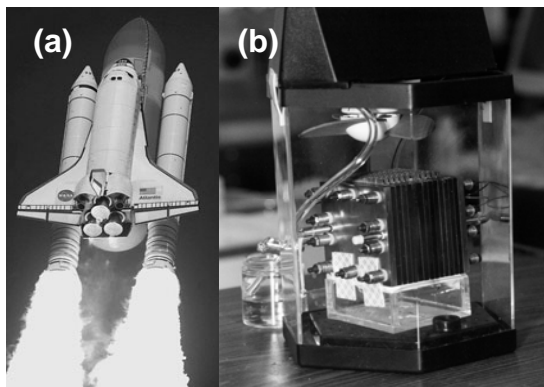


Fig. 2. (a) El H_2 posee casi 3 veces más energía (en peso) que cualquier otro combustible. (b) Además puede utilizarse para producir electricidad en celdas de combustible, con cero emisiones contaminantes.

Actualmente, alrededor de la mitad del H_2 que se produce en el mundo se obtiene de procesos termocatalíticos y de gasificación, los cuales utilizan gas natural como materia prima. Otras fuentes importantes de H_2 requieren aceites pesados y naftas, a estas les siguen la utilización de carbón natural y solo el 4% de H_2 es generado a partir de la electrolisis del agua (Logan, 2004). Sin embargo, algunos de estos procesos requieren de un alto gasto energético y dependen de recursos no renovables. Además, las reservas mundiales de hidrocarburos se han reducido a velocidad alarmante. Dadas tales perspectivas, la producción biológica de hidrógeno (*biohidrógeno: Bio- H_2*) resulta ser una alternativa como recurso energético sustentable para el futuro (Nath & Das, 2004).

ASPECTOS BIOLÓGICOS DE LA PRODUCCIÓN DE $BIO-H_2$

Los sistemas biológicos producen H_2 de diversas maneras, entre las cuales están la biofotólisis directa, biofotólisis indirecta, foto-fermentaciones y fermentaciones. Cuando compuestos orgánicos son la única fuente de carbono y energía, el proceso se denomina fermentación. En el caso que se requiera de luz como fuente adicional de energía, el proceso se cataloga como fotobiológico (Reith *et al.*, 2003). Estos procesos se llevan a cabo a presión y temperatura ambiente, y por tanto requieren de menor consumo energético que los procesos químicos o electroquímicos. Las fermentaciones para la producción de H_2 pueden ser llevadas a cabo por una variedad de microorganismos, tanto en cultivos puros como mixtos (Tabla 1). Estas fermentaciones permiten la producción de $Bio-H_2$ mediante procesos relativamente sencillos, a partir de un amplio rango de sustratos potencialmente utilizables. Entre ellos destacan los desechos orgánicos de diversas fuentes (Claassen *et al.*, 1999; Kapdan & Kargi, 2006).

Desde hace algunas décadas se ha estudiado la producción de biogas (una mezcla de metano y dióxido de carbono) mediante procesos de digestión anaerobia para el tratamiento de aguas residuales con alta carga orgánica. Actualmente la digestión anaerobia tiene una aplicación práctica, en aumento, incluso a nivel industrial. También en México se han venido usando estos procesos, como una alternativa interesante en el tratamiento de aguas, con las ventajas de que son procesos que generan menos biomasa y presentan una ganancia neta de energía recuperable en forma de biogas (Noyola, 1999). La digestión anaerobia de materia orgánica compleja hasta metano y dióxido de carbono requiere de cuatro pasos principales (Fig. 3) y de la acción de un consorcio microbiano con cinco grupos de

Tabla 1. Velocidades de producción y rendimientos de producción de H₂ a partir de diversos inoculos y sustratos en cultivo en lote. No es una lista exhaustiva.

Inoculo	Sustrato ^a	VVPH (mmol H ₂ / L _{cultivo-h}) ^e	Rendimiento de H ₂	Condiciones de cultivo ^a [pH, temperatura (°C), % H ₂ en biogas (%v/v)]	Referencias
<i>Clostridium butyricum</i> CGS5	Sacarosa (20 g DQO/L)	8.2	2.78 mol H ₂ / mol sacarosa	5.5-6.0 ^c , 37, 64	Chen <i>et al.</i> , 2005
<i>Clostridium Saccharoperbuty- tyla cetonicum</i> ATCC 27021	Suero de leche crudo (ca. 41.4 g lactosa/L)	9.4	2.7 mol H ₂ / mol lactosa	6.0 ^d , 30, NR ^b	Ferchichi <i>et al.</i> , 2005
<i>Escherichia coli</i> W3110, SR11*, SR12*, SR13*	Ácido fórmico (25 mM)	11795	1.0 mol H ₂ / mol formiato	6.5 ^d , 37, NR	Yoshida <i>et al.</i> , 2005
Bacteria mesofílica HN001	Almidón (20 g/L)	59	2.0 mol H ₂ / mol glucosa	6.0 ^c , 37, NR	Yasuda & Tanisho, 2001
Suelo agrícola (tratamiento térmico)	Materia orgánica de aguas residuales.	6.2	100 ml H ₂ / g DQO _{removida}	6.1 ^d , 23, 60	Van Ginkel <i>et al.</i> , 2005
Lodo anaerobio (Tratamiento ácido, aclimatado en CSTR)	Sacarosa (20 g DQO/L)	96	1.74 mol H ₂ / mol sacarosa	6.1 ^d , 40, 45	Wu <i>et al.</i> , 2005
Lodo anaerobio	Glucosa (~21.3 g/L)	4.9-8.6	0.8-1.0 mol H ₂ /mol hexosa	5.7 ^c , 34.5, 59-66	Cheong & Hansen, 2001
Lodo anaerobio	Sacarosa (10 g/L)	8	1.9 mol H ₂ / mol sacarosa	5.5 ^c , 35, NR	Mu <i>et al.</i> , 2006a
Lodo anaerobio	Sacarosa (24.8 g/L)	20	3.4 mol H ₂ / mol sacarosa	5.5 ^c , 34.8, 64	Mu <i>et al.</i> , 2006b
Lodo anaerobio	Glucosa (3.76 g/L)	9	1.0 mol H ₂ / mol glucosa	6.2 ^d , 30, 66	Salerno <i>et al.</i> , 2006

Notas: ^aEn los casos en que se hayan ensayado diversas condiciones, se reportan las óptimas. ^bNR: No reportado. ^cValor controlado. ^dValor inicial, sin control. ^e En algunos casos se realizaron conversiones de unidades, en las condiciones reportadas por los autores. VVPH: Velocidad volumétrica de producción de H₂. DQO: Demanda química de oxígeno. CSTR: Reactor de tanque agitado en continuo (por sus siglas en inglés: Continuous Stirred Tank Reactor). *Cepa modificada genéticamente.

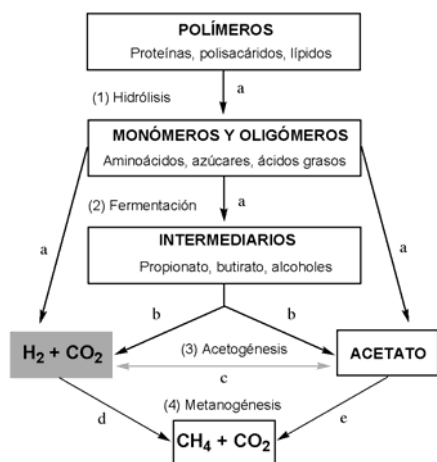


Fig. 3. Diagrama esquemático del proceso de digestión anaerobia. Diferentes grupos tróficos: (a) bacterias fermentativas, (b) bacterias acetogénicas, (c) bacterias homoacetogénicas, (d) arqueas metanogénicas

hidrogenotróficas, (e) arqueas metanogénicas acetoclásticas (Modificado de Angenent *et al.*, 2004).

microorganismos fisiológicamente distintos. En los sistemas anaerobios de tratamiento de aguas y bajo ciertas condiciones hidráulicas, este consorcio se agrega en lo que se conoce como lodos granulares (Fig. 4). Esta agregación en partículas densas ofrece ventajas operativas a estos sistemas de tratamiento. Como se muestra en la Fig. 3, los polímeros orgánicos son hidrolizados (1) hasta monómeros gracias a la acción de bacterias fermentativas. Estas mismas bacterias fermentan (2) los monómeros dando como productos una mezcla de ácidos orgánicos de bajo peso molecular y alcoholes. Estos productos son oxidados hasta ácido acético, por la acción de

bacterias acetogénicas que a la par producen H₂, en un proceso denominado acetogénesis o acidogénesis (3).



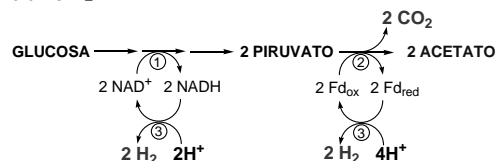
Fig. 4. Agregación del consorcio microbiano en granos que pueden llegar a medir un par de milímetros de diámetro. Con las flechas se muestran puntos de ventilación, por los que escapa el biogas producido (Tomado de: www.uasb.org/discover/granules.htm).

Este paso también incluye la producción de acetato a partir de H₂ y CO₂. Las bacterias acetogénicas productoras de H₂ crecen en asociación sintrófica con los organismos metanogénicos hidrogenotróficos. Éstos últimos mantienen la presión parcial de H₂ (mediante su consumo) lo suficientemente baja, de tal manera que se favorezca termodinámicamente la acetogénesis. Finalmente los metanógenos acetoclásticos transforman el acetato en metano y dióxido de carbono (4). Como se puede notar en la Fig. 3, en este proceso se produce H₂ como intermediario, en un paso crucial de la digestión anaerobia. Sin embargo, cuando es de interés obtener hidrógeno como producto final, es necesario desacoplar su producción (acidogénesis) del consumo (metanogénesis). Para lograrlo, partiendo del mismo consorcio metanogénico, es necesario hacer una selección de la población microbiana para eliminar a los consumidores de H₂. Afortunadamente, algunas especies de *Bacillus* o *Clostridium* productoras de H₂, son resistentes a temperaturas elevadas o a la desecación gracias a la formación de esporas (Setlow, 2000). Por lo tanto, tratando térmicamente (más de 90°C, por un mínimo de 20 min) el consorcio inicial, se obtienen esporas de organismos productores de Bio-H₂ y se eliminan a los metanogénicos que no son

capaces de esporular (Cheong & Hansen, 2006b). Otra estrategia, para obtener predominantemente una población productora de Bio-H₂, a partir de un consorcio metanogénico, consiste en cultivar el consorcio en continuo a temperaturas mesofílicas, usando generalmente sustratos simples (glucosa, sacarosa), a un pH de entre 4 – 7 y tiempos de retención hidráulico (TRH) cortos (5-10 h) (Hawkes *et al.*, 2007).

En la mayoría de sistemas biológicos fermentativos, todo el Bio-H₂ producido puede ser atribuido a los electrones derivados de una reacción: la descarboxilación oxidativa del piruvato mediante la piruvato-ferredoxina oxidoreductasa (Fig. 5). Las hexosas pueden ser metabolizadas hasta piruvato mediante varias rutas, a menudo mediante la glucólisis o la ruta Entner-Doudoroff. Ambas producen dos mol de piruvato y dos mol de NADH, por cada mol de hexosa transformado.

(a) PpH₂ < 60 Pa:



(b) PpH₂ > 60 Pa:

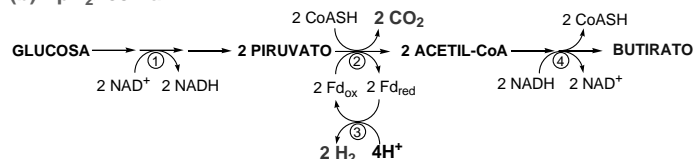


Fig. 5. Efecto de la presión parcial de hidrógeno (PpH₂) sobre la producción biológica de hidrógeno. (a) La oxidación de NADH mediante la producción de H₂ es termodinámicamente favorable solo cuando la PpH₂ es menor a 60 Pa (~10⁻⁴ atm), de lo contrario; (b) se forman otros productos de reacción. Reacciones: (1) metabolismo de la glucosa hacia piruvato; (2) descarboxilación del piruvato; (3) reducción de protones a H₂; (4) fermentación butírica. (Modificado de Angenent *et al.*, 2004)

Por tanto, el metabolismo de las hexosas en bacterias que poseen la piruvato-ferredoxina oxidoreductasa puede resultar en la formación de 2 mol de hidrógeno por mol de hexosa. Si la presión parcial de hidrógeno (PpH₂) es suficientemente baja (< 60Pa), el NADH producido también puede utilizarse

para generar H_2 (en el mejor de los casos, 2 mol de H_2 adicionales por mol de hexosa). Pero probablemente la mayoría del NADH sea oxidado mediante otras rutas, tales como la fermentación butírica (Fig. 5, reacción 4), la fermentación láctica o la producción de etanol, butanol o acetona (Jones & Woods, 1986). La aparición de estos productos es el resultado de la operación de rutas alternas para el metabolismo del piruvato que compiten con la piruvato ferredoxina oxidoreductasa. Esto se asocia a sistemas que producen menos de dos mol de H_2 por mol de hexosa (Angenent *et al.*, 2004).

En el caso de que el acetato sea el producto final de la fermentación, se obtiene un rendimiento teórico máximo de 4 mol de H_2 por mol de glucosa. Cuando se obtiene butirato como producto final, se encuentra un máximo teórico de 2 mol de H_2 por mol de glucosa (Nandi & Sengupta, 1998). Los productos metabólicos más reducidos como el etanol, butanol y lactato, contienen átomos de hidrógeno que no fue liberado como gas. Por lo que, para maximizar el rendimiento de H_2 , el metabolismo microbiano debe de ser alejado de la producción tanto de alcoholes (etanol, butanol) como de ácidos reducidos (lactato), y dirigirse hacia la biosíntesis de ácidos grasos volátiles (AGVs: acetato, propionato) (Hawkes *et al.*, 2002; Levin *et al.*, 2004).

Estos bajos rendimientos son la consecuencia natural de que tales fermentaciones han sido optimizadas por la evolución hacia la producción de biomasa y no de hidrógeno (Hallenbeck & Benemann, 2002). Aunque estos rendimientos aún se encuentren lejos de los estequiométricos (12 mol H_2 /mol hexosa), las fermentaciones productoras de hidrógeno se consideran procesos promisorios a gran escala, todavía en ciernes.

ASPECTOS BIOTECNOLÓGICOS DE LA PRODUCCIÓN DE BIO- H_2

Se ha reportado que la producción de Bio- H_2 en las bacterias fermentativas es altamente dependiente de las condiciones de fermentación tales como la naturaleza química y la concentración de sustrato, tipo

de inóculo y tratamiento del mismo, el pH, TRH, tiempo de retención de sólidos (TRS) y la presión parcial de hidrógeno, lo cual afecta el balance metabólico. Por tanto, la eficiencia en la producción de H_2 y los productos finales de fermentación bacteriana dependen de las condiciones ambientales del cultivo. Como consecuencia de lo anterior, todavía no se sabe hasta que punto puede incrementarse la producción de Bio- H_2 , mediante la manipulación de las condiciones de cultivo y la ingeniería de flujos metabólicos (Hallenbeck & Benemann, 2002; Hallenbeck, 2005). Actualmente en este campo del conocimiento, se estudian el desempeño en diversos ambientes y bajo diversos sistemas de cultivo, de sustratos e inóculos de diversos orígenes (Tablas 1 y 2).

En las Tablas 1 (cultivos en lote) y 2 (cultivos en continuo) se muestran algunos trabajos recientes de producción de Bio- H_2 por vía fermentativa. Como puede observarse, en ningún caso los rendimientos reportados rebasan la barrera biológica de 4 mol de H_2 por mol de monosacárido u 8 mol de H_2 por mol de disacárido (para una fermentación en una sola etapa). Además del rendimiento, es muy importante conocer la velocidad volumétrica de producción de H_2 (VVPH). Siguiendo la propuesta hecha por algunos autores (Levin *et al.*, 2004; Loubette & Junker, 2006) hemos tratado de estandarizar los resultados reportados de VVPH, esto con la finalidad de facilitar la comparación entre los mismos.

Como se ha mencionado, uno de los usos energéticos (el más promisorio) del Bio- H_2 es su utilización en celdas de combustible (CC) para producir electricidad. Por tanto, es necesario saber si los sistemas de fermentación reportados son capaces de suministrar el H_2 requerido para operar continuamente una CC. Este estudio fue hecho por Levin *et al.* (2004) y concluyen que debido a que los valores más altos de VVPH (21-121 mmol H_2 /L-h) están reportados para procesos mesofílicos fermentativos, estos requieren de reactores más pequeños para suministrar H_2 a una CC. Por ejemplo, para alimentar una CC de 25 kW (que produciría alrededor de 22,000 kWh/año) se requerirían

biorreactores de entre 500 - 2,850 litros. Tal producción de electricidad sería suficiente para satisfacer la demanda promedio de una residencia que utilice calefacción eléctrica.

PERSPECTIVAS SOBRE LA PRODUCCIÓN DE Bio-H₂

A la fecha la mayoría de lo publicado en esta área del conocimiento lo constituyen esfuerzos a nivel laboratorio, y todavía existen pocos trabajos a nivel sustratos más apropiados y microorganismos hidrogenogénicos más eficientes, además de mejorar planta piloto (Loubette & Junker, 2006). Dentro de los retos a abordar se encuentran: el aumentar los rendimientos de producción (H₂/sustrato), encontrar los procesos de recuperación de H₂ de los biorreactores. Algunos de estos problemas ya se están abordando, y se han propuesto sistemas de producción en dos etapas (acidogénesis-metanogénesis, o acidogénesis-fotofermentaciones) para aumentar los rendimientos de producción de H₂.

Además de procesos más sofisticados en los cuales se acopla la acidogénesis a reactores bioelectroquímicamente asistidos, logrando con esto rendimientos de hasta 8-9 mol de H₂/mol de glucosa (Liu *et al.*, 2005). También existen reportes recientes en los que se logró purificar el gas producido (típicamente una mezcla 40-60% H₂ y CO₂, respectivamente) mediante tecnología de membranas, logrando remover el CO₂. Este paso es crucial para la aplicación práctica del Bio-H₂ en las celdas de combustible. Aquí vale la pena mencionar que el CO₂ generado en la producción de Bio-H₂ proviene de biomasa (azúcares, o materia orgánica), por lo que pertenece al ciclo natural del carbono en la biosfera.

Finalmente, algo que queda claro es que para resolver todos estos retos es necesario el trabajo multidisciplinario y de equipo entre científicos y técnicos de diversas áreas.

Tabla 2. Velocidades de producción y rendimientos de producción de H₂ a a partir de diversos inoculos y sustratos en cultivo en continuo. No es una lista exhaustiva

Inoculo	Sustrato	VVPH (mmol H ₂ / L _{cultivo} -h) ^c	Rendimiento de H ₂	Condiciones de cultivo [TRH (h), Carga orgánica, pH, Temperatura (°C), H ₂ en biogas (% v/v)]	Referencias
Cultivo mixto	Sacarosa (20 g DQO/L)	17	3.5 mol H ₂ /mol sacarosa	12, NR, 6.8, 35, 45.9	Lin <i>et al.</i> , 2006
Cultivo mixto	Sacarosa (40 g/L)	20	1.15 mol H ₂ /mol hexosa	12, 80 g/L-d, 5.2, 35, 60	Kyazze <i>et al.</i> , 2006
Cultivo mixto inmovilizado en gel de silicona	Sacarosa (30 g DQO/L)	612.5	3.86 mol H ₂ /mol sacarosa	0.5, NR, 6.5, 40, 44	Wu <i>et al.</i> , 2006
Cultivo mixto	Xilosa (20 g DQO/L)	5	1.1 mol H ₂ /mol xilosa	12, NR, 7.1, 35, 32	Lin & Cheng, 2006
Cultivo mixto	Glucosa (15 g DQO/L)	13.23	1.93 mol H ₂ /mol glucosa	4.5, 80 g DQO/L-d, 5.5, 37, 67	Zhang <i>et al.</i> , 2004
Lodo deshidratado	Glucosa (4 g DQO/L)	3.47	1.9 molH ₂ /mol glucosa	10, NR, 5.5, 35, 67	Salerno <i>et al.</i> , 2006
Cultivo mixto	Sacarosa (20 g DQO/L)	15.6	3.6 mol H ₂ /mol sacarosa	12, NR, 5.5, 35, 50	Lin & Chen, 2006
Lodo anaerobio	Sacarosa (20 g DQO/l)	52.6	3.43 molH ₂ /mol sacarosa	12, NR, 6.8, 35, 50.9	Lin & Lay, 2005
Cultivo mixto	Sacarosa y azúcar de remolacha	5.15	1.9 molH ₂ /mol hexosa	15, 16 Kg azúcar/m ³ -d, 5.2, 32, NR	Hussy <i>et al.</i> , 2005
<i>C. thermolacticum</i> DSM 2910	Lactosa (10 g/L)	2.58	2.1-3 mol H ₂ /mol lactosa	17.2, NR, 7.0, 58, 55	Collet <i>et al.</i> , 2004

Notas: ^aEn los casos en que se hayan ensayado diversas condiciones, se reportan las óptimas. ^bNR: No reportado. ^cEn algunos casos se realizaron conversiones de unidades, en las condiciones reportadas por los autores. DQO: Demanda química de oxígeno. VVPH: Velocidad volumétrica de producción de H₂. CSTR: Reactor de tanque agitado en continuo.

INVESTIGACIÓN EN MÉXICO SOBRE LA PRODUCCIÓN DE BIO-H₂

Actualmente en el país, existen algunos grupos dedicados al estudio de la producción biológica de H₂ por vía fermentativa. Destaca el caso del grupo del Dr. Héctor M. Poggi-Varaldo del CINVESTAV con algunos trabajos publicados (Valdez-Vazquez *et al.*, 2005a; Valdez-Vazquez *et al.*, 2005b; Valdez-Vazquez *et al.*, 2006a; Valdez-Vazquez *et al.*, 2006b), y otros que inician en esta línea y/o que están en vías de consolidación. Tal es el caso de nuestro grupo en el IPICYT, el grupo de investigación del Dr. Germán Buitrón Méndez del II-UNAM, y en el CICY el grupo coordinado por la Dra. Mascha Smit.

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Sonia Arriaga, por su valiosa participación en la elaboración de este trabajo.

REFERENCIAS

Angenent LT, Karim K, Al-Dahhan MH, Wrenn BA & Domiguez-Espinosa R (2004) Production of bioenergy and biochemicals from industrial and agricultural wastewater. *Trends Biotechnol.* 22:477-485.

Chen WM, Tseng ZJ, Lee KS & Chang JS (2005) Fermentative hydrogen production with *Clostridium butyricum* CGS5 isolated from anaerobic sewage sludge. *Int. J. Hydrogen Energy.* 30:1063-1070.

Cheong DY & Hansen CL (2006a) Acidogenesis characteristics of natural, mixed anaerobes converting carbohydrate-rich synthetic wastewater to hydrogen. *Process Biochem.* 41:1736-1745.

Cheong DY & Hansen CL (2006b) Bacterial stress enrichment enhances anaerobic hydrogen production in cattle manure sludge. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 72:635-643.

Claassen PAM, van Lier JB, Lopez Contreras AM, van Niel EWJ, Sijtsma L, Stams AJM, de Vries SS & Weusthuis RA (1999) Utilisation of biomass for the supply of energy carriers. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 52:741-755.

Collet C, Adler N, Schwitzguebel JP & Peringer P (2004) Hydrogen production by *Clostridium thermolacticum* during continuous fermentation of lactose. *Int. J. Hydrogen Energy.* 29:1479-1485.

Ferchichi M, Crabbe E, Gil GH, Hintz W & Almadidy A (2005) Influence of initial pH on hydrogen production from cheese whey. *J. Biotechnol.* 120:402-409.

Hallenbeck PC (2005) Fundamentals of the fermentative production of hydrogen. *Water Sci. Technol.* 52:21-29.

Hallenbeck PC & Benemann JR (2002) Biological hydrogen production; fundamentals and limiting processes. *Int. J. Hydrogen Energy.* 27:1185-1193.

Hawkes FR, Dinsdale R, Hawkes DL & Hussy I (2002) Sustainable fermentative hydrogen production: challenges for process optimisation. *Int. J. Hydrogen Energy.* 27:1339-1347.

Hawkes FR, Hussy I, Kyazze G, Dinsdale R & Hawkes DL (2007) Continuous dark fermentative hydrogen production by mesophilic microflora: Principles and progress. *Int. J. Hydrogen Energy.* 32:172-184.

Hussy I, Hawkes FR, Dinsdale R & Hawkes DL (2005) Continuous fermentative hydrogen production from sucrose and sugarbeet. *Int. J. Hydrogen Energy.* 30:471-483.

IPCC (2007) Climate Change 2007: The Physical Science Basis. Intergovernmental Panel on Climate Change. <http://www.ipcc.ch/>

Jones DT & Woods DR (1986) Acetone-butanol fermentation revisited. *Microbiol. Rev.* 50:484-524.

Kapdan IK & Kargi F (2006) Bio-hydrogen production from waste materials. *Enzyme Microbiol. Technol.* 38:569-582.

Kyazze G, Martinez-Perez N, Dinsdale R, Premier GC, Hawkes FR, Guwy AJ & Hawkes DL (2006) Influence of substrate concentration on the stability and yield of continuous biohydrogen production. *Biotechnol. Bioeng.* 93:971-979.

Levin DB, Pitt L & Love M (2004) Biohydrogen production: prospects and limitations to practical application. *Int. J. Hydrogen Energy.* 29:173-185.

- Lin CY & Chen HP (2006) Sulfate effect on fermentative hydrogen production using anaerobic mixed microflora. *Int. J. Hydrogen Energy*. 31:953-960.
- Lin CY & Cheng CH (2006) Fermentative hydrogen production from xylose using anaerobic mixed microflora. *Int. J. Hydrogen Energy*. 31:832-840.
- Lin CY & Lay CH (2005) A nutrient formulation for fermentative hydrogen production using anaerobic sewage sludge microflora. *Int. J. Hydrogen Energy*. 30:285-292.
- Lin CY, Lee CY, Tseng IC & Shiao IZ (2006) Biohydrogen production from sucrose using base-enriched anaerobic mixed microflora. *Process Biochem*. 41:915-919.
- Liu H, Grot S & Logan BE (2005) Electrochemically assisted microbial production of hydrogen from acetate. *Environ. Sci. Technol*. 39:4317-4320.
- Logan BE (2004) Extracting hydrogen and electricity from renewable resources. *Environ. Sci. Technol*. 38:160A-167A.
- Loubette N & Junker M (2006). State of the art of biological hydrogen production processes. *16th World Hydrogen Energy Conference*, Lyon, Francia, p. 220.
- Mu Y, Wang G & Yu HQ (2006a) Kinetic modeling of batch hydrogen production process by mixed anaerobic cultures. *Bioresour. Technol*. 97:1302-1307.
- Mu Y, Wang G & Yu HQ (2006b) Response surface methodological analysis on biohydrogen production by enriched anaerobic cultures. *Enzyme Microbial Technol*. 38:905-913.
- Nandi R & Sengupta S (1998) Microbial production of hydrogen: an overview. *Crit. Rev. Microbiol*. 24:61-84.
- Nath K & Das D (2004) Improvement of fermentative hydrogen production: various approaches. *Appl. Microbiol. Biotechnol*. 65:520-529.
- Noyola A (1999) Desarrollo de tecnologías mexicanas en tratamiento de aguas residuales: una experiencia. *Interciencia*. 24:169-172.
- Reith JH, Wijffels RH & Barten H (2003) Bio-methane & Bio-hydrogen: Status and perspectives of biological methane and hydrogen production. Dutch Biological Hydrogen Foundation, La Haya, Holanda.
- Salerno MB, Park W, Zuo Y & Logan BE (2006) Inhibition of biohydrogen production by ammonia. *Water Res*. 40:1167-1172.
- Setlow P (2000) Resistance of bacterial spores. *In: Bacterial stress responses*. Storz G & Hengge-Aronis R (eds). ASM Press, pp 217-230.
- Valdez-Vazquez I, Rios-Leal E, Carmona-Martinez A, Munoz-Paez KM & Poggi-Varaldo HM (2006a) Improvement of biohydrogen production from solid wastes by intermittent venting and gas flushing of batch reactors headspace. *Environ. Sci. Technol*. 40:3409-3415.
- Valdez-Vazquez I, Rios-Leal E, Esparza-Garcia F, Cecchi F & Poggi-Varaldo HA (2005a) Semi-continuous solid substrate anaerobic reactors for H₂ production from organic waste: Mesophilic versus thermophilic regime. *Int. J. Hydrogen Energy*. 30:1383-1391.
- Valdez-Vazquez I, Rios-Leal E, Munoz-Paez KM, Carmona-Martinez A & Poggi-Varaldo HM (2006b) Effect of inhibition treatment, type of inocula, and incubation temperature on batch H₂ production from organic solid waste. *Biotechnol. Bioeng*. 95:342-349.
- Valdez-Vazquez I, Sparling R, Risbey D, Rinderknecht-Seijas N & Poggi-Varaldo HM (2005b) Hydrogen generation via anaerobic fermentation of paper mill wastes. *Bioresour. Technol*. 96:1907-1913.
- Van Ginkel SW, Oh SE & Logan BE (2005) Biohydrogen gas production from food processing and domestic wastewaters. *Int. J. Hydrogen Energy*. 30:1535-1542.
- Wu SY, Hung CH, Lin CN, Chen HW, Lee AS & Chang JS (2006) Fermentative hydrogen production and bacterial community structure in high-rate anaerobic bioreactors containing silicone-

immobilized and self-flocculated sludge. *Biotechnol. Bioeng.* 93:934-946.

Wu SY, Lin CN, Chang JS & Chang JS (2005) Biohydrogen production with anaerobic sludge immobilized by ethylene-vinyl acetate copolymer. *Int. J. Hydrogen Energy.* 30:1375-1381.

Yasuda K & Tanisho S (2006). Fermentative hydrogen production from artificial food wastes. *16th World Hydrogen Energy Conference*, Lyon, Francia, p. 210.

Yoshida A, Nishimura T, Kawaguchi H, Inui M & Yukawa H (2005) Enhanced hydrogen production from formic acid by formate hydrogen lyase-overexpressing *Escherichia coli* strains. *Appl. Environ. Microbiol.* 71:6762-6768.

Zhang JJ, Li XY, Oh SE & Logan BE (2004) Physical and hydrodynamic properties of flocs produced during biological hydrogen production. *Biotechnol. Bioeng.* 88:854-860.