Revista Internacional de Investigación e Innovación Tecnológica

Página principal: www.riiit.com.mx

Comparación de rutas de reacción para seleccionar la más segura con el método ELECTRE

Enrique Arce Medina e Irma P. Flores Allier.
Escuela Superior de Ingeniería Química e Industrias Extractivas del IPN. Edif. 7, Unid Prof. ALM, Col. Lindavista, Mex. D.F., C.P. 07738.

Resumen

Los problemas de toma de decisiones involucran varias alternativas de las cuales hay que decidir a favor de una. Durante el diseño básico de los procesos químicos la etapa más importante es la elección de la ruta de reacciones, ya que de ello depende el uso que se tendrá de los recursos materiales y energéticos, así como del rendimiento económico y el posible impacto ambiental. En este artículo se presenta el método ELECTRE que usa el concepto de sobre-calificación y límites de comparación como ayuda en la selección de alternativas caracterizadas por múltiples criterios. El método permite evaluar las ventajas y desventajas relativas entre las alternativas en cada criterio y jerarquizarlas en un orden de preferencias, de la mejor a la peor. Se presenta una modificación al método original que lo simplifica y un ejemplo que ilustra los pasos del método.

Palabras clave: Diseño, Electre, Ruta de reacciones

Abstract

Decision-making problems involves several alternatives which a decision must be made in favor of one. During basic desing of chemical processes, the most important stage is choosing the path of reactions, since of this depends the use of the material and energy resources, economic performance and the potential environemental impact. In this paper, is presented the ELECTRE method that uses the concept of over-qualification and limits compared to aid in the selection of

characterized alternatives by multiple criteria. The method allows to evaluate the relative advantages and disadvantages of the alternatives in each criterion and rank the alternatives in order of preference, from best to worst. It is presented a modification to the original method that makes it simpler and an example illustrating the method steps.

©2013 RIIIT, Todos los Derechos Reservados

Introducción

Puesto que hay diferentes formas de obtener el mismo producto se deben evaluar las diferentes rutas de reacción. Se prefieren reacciones que usen las materias primas más baratas y generen el menor número de subproductos no deseados, pero otros factores también deben considerarse; por ejemplo que sean más seguras, es decir, que ocurran bajo condiciones de temperatura y presión poco severas, que no impacten adversamente al medio ambiente, si es que llegan a ocurrir accidentes [1]. La selección de rutas de reacciones que sean inherentemente seguras es un procedimiento complejo de toma de decisiones, este artículo presenta la comparación de rutas de reacción para seleccionar la más segura con el método ELECTRE.

Los ejecutivos de las grandes empresas así como los dueños de las pequeñas saben que no hacer el uso adecuado de la información puede causar una mala decisión y en consecuencia una reducción de ganancias en el mejor de los casos, y en el peor pérdidas económicas. Los problemas de toma de decisiones involucran varias alternativas y de las cuales hay que decidir a favor de una. Para comparar las alternativas se ha de contar con medios de valorarlas, es decir, calificarlas, para ello se requiere primero definir los atributos comunes a las alternativas y sobre los cuales se califican, estos también se llaman criterios. Existen varios métodos de jerarquización y selección de alternativas bajo multicriterio, desde el más simple que es la suma de calificaciones ponderadas hasta nos más complicados como los métodos ELECTRE [2, 3, 4], PROMETHE [5, 6], y otros [7]. Estos métodos son conocidos como métodos de ayuda en la toma de decisiones con múltiples criterios o MCDA por sus siglas en inglés, (Multi-Criteria Decision Aid).

Los métodos de análisis multicriterio tienen muchas aplicaciones, por ejemplo en:

a) Elección de la mejor ruta de reacciones
b) Discriminación de candidatos
c) Selección de proyectos de inversión
d) Selección de propuestas de acción, etc.

La gama de aplicación del método ELECTRE es muy amplia [8, 9, 10, 11] y constantemente se encuentran nuevas aplicaciones como la que se presenta en este artículo. En general se usan como una ayuda en la toma de decisiones. De acuerdo con Baker [1] el proceso de toma de decisiones inicia con el planteamiento del problema que se puede dividir en cinco etapas: a) la definición del problema, b) la determinación de requerimientos, c) el establecimiento de metas, d) la identificación de las alternativas y d) la definición de los criterios. Las tres primeras etapas dependen del escenario en que se aplica el análisis, así como del número de participantes en la toma de decisión y del objetivo que se busque. La cuarta etapa es crucial ya que deben identificarse las *n* alternativas (acciones, candidatos, objetos, proyectos, etc.), entre las cuales se debe escoger una, presumiblemente la mejor. En la quinta etapa se definen los *m* criterios que son atributos de las alternativas que de alguna manera miden su desempeño. En muchas situaciones estos criterios son objetivos a maximizar o minimizar, además, algunos serán vitales y otros triviales por lo que es imperativo ordenarlas por su importancia. Para ello a cada criterio se les asigna una ponderación o peso de importancia *w*, que represente su relativa importancia de acuerdo a las preferencias de quienes califican las alternativas. El paso siguiente en el proceso de toma de decisiones es calificar las alternativas en los criterios.

Una vez que se tiene esta información ya es posible pasar al análisis y manipular la información para seleccionar la mejor alternativa usando un método MCDA. Una notación estándar para las alternativas es A_1, A_2, … A_n, para los criterios es C_1, C_2,…C_m, para los

pesos es w_1, w_2, … w_m y para las calificaciones se usa $a_{1,1}$, $a_{1,2}$,…$a_{n,m}$.

El método más simple es el de sumas ponderadas. Para ilustrar este método se propone el Ejemplo 1.

Ejemplo 1.

Se desea elegir a un candidato, entre varios, para un empleo. Considérese como atributos importantes para evaluar a los candidatos los criterios de la Tabla 1.

Tabla 1. Criterios del ejemplo 1.

Criterio 1	**La experiencia**
Criterio 2	**La escolaridad**
Criterio 3	**Dominio del inglés**
Criterio 4	**Conocimientos de informática**

Para calificar a los candidatos en estos criterios hay que definir una escala de valoración, por ejemplo, para el criterio de experiencia se pueden tener las siguientes posibles calificaciones: *ninguna, poca, regular y bastante.* Mientras que para el criterio de escolaridad se pueden tener las posibles calificaciones siguientes: *mínima, menor a la media, sobrepasa a la media y elevada*. Si ha de calificarse a los candidatos en estos criterios, primero hay que normalizar las calificaciones. Para ello se define una escala de calificaciones, por ejemplo de 0 a 10, siendo 10 la mejor calificación y 0 la peor, se presupone que hay que maximizar los criterios. Se propone la conversión de las calificaciones de los criterios a valores numéricos de acuerdo a unos intervalos convenientemente seleccionados, ver Tabla 2.

Tabla 2. Intervalos de correspondencia de calificaciones.

lingüística	***numérica***
Ninguna	0 – 2.5
Poca	2.5 – 5.0
Regular	5.0 – 7.5
Bastante	7.5 – 10.0

Cuando las calificaciones son numéricas y dentro de escalas muy diversas, es recomendable transformar las calificaciones a una escala única para su comparación. La transformación lineal es la más simple, de acuerdo a la ecuación 1.

$$a_{i,j} = \frac{a_{a,j} - a^{\min}}{a^{\max} - a^{\min}} \qquad (1)$$

En donde $a^{\min}$ y $a^{\max}$ son la peor y mejor calificación respectivamente. Con esta normalización la escala va de 0 a 1 y es adecuada para criterios que representen una ventaja o beneficios, para criterios que representen una desventaja o costos el numerador debe cambiar a $a^{\max} - a_{i,j}$.

Habiendo definido el ámbito de expresión para plantear el problema de toma de decisión, lo que sigue es la valoración de los candidatos. Se requieren evaluadores que han de ser expertos en la calificación de los criterios, también llamados jueces o actores en la toma de decisión.

Del proceso de valoración los resultados se resumen en una tabla de calificaciones como la Tabla 3.

Tabla 3. Matriz de calificaciones.

Candidatos	*C1*	*C2*	*C3*	*C4*
A1	3	8*	7	6
A2	5	5	9*	5
A3	7*	5	7	9*
A4	3	6	4	5
Pesos, w	0.2	0.1	0.3	0.4

En esta tabla los candidatos se identifican como *A1, A2*, etc. Mientras que los criterios se distinguen en las columnas como *C1, C2,* etc. La última fila contiene los valores de los pesos. A cada criterio se le asigna un valor numérico o peso, w_i, que va de mayor a menor en el sentido en que disminuye su importancia relativa con los otros criterios. Cuando $w_h > w_k$ implica que el criterio *h* es más importante que el criterio *k* y la expresión $w_h = w_k$ indica que ambos criterios son igualmente importantes. Cuando en un criterio se tiene la misma o casi la misma calificación para todas las alternativas se puede eliminar ese criterio, pues no brinda información relevante para la toma de decisiones.

En el ejemplo 1se observa, por los valores de los pesos, que los evaluadores dan mayor relevancia a los conocimientos de informática e idiomas que a la experiencia y la escolaridad. En este ejemplo se eligen valores de los pesos normalizados para que se cumpla que $\sum w_j = 1$.

Se marca con un asterisco las calificaciones mayores en los diferentes criterios y se puede ver que no hay ninguna alternativa que obtenga altas calificaciones en todos los criterios, es decir, que a simple vista no se distingue a un candidato que sea mejor que los demás.

Con el método de sumas ponderadas se calculan las sumas de productos de las calificaciones de las alternativas en los diferentes criterios multiplicadas por los pesos de ponderación de los criterios. Cálculo que se resume en la siguiente ecuación:

$$M_i = \sum_{j=1}^{m} a_{i,j} * w_j \qquad (2)$$

Donde M_i = Calificación ponderada de la alternativa *i*.

$a_{i,j}$ = calificación de la alternativa *i* en el criterio *j*.

w_j = Peso de ponderación del criterio *j*.

Se ordenan las calificaciones ponderadas de mayor a menor y se selecciona la primera como la de mayor preferencia, la que le sigue tendrá la segunda preferencia, etc. Con este método se supone que hay que maximizar todos los criterios.

Se aplica la fórmula de la ecuación 2 a los datos de la Tabla 3 y se obtiene:

Candidato	**Calificación**
A3	7.6
A2	6.2

A1	5.9
A4	4.4

De acuerdo a las calificaciones se obtiene que el orden de preferencia de los candidatos es: *A3 > A2 > A1 > A4*, lo que indica que se elige al candidato *A3* en primer lugar y *A4* en último.

Habrá casos en que alguna alternativa aunque califique mayormente con respecto a las otras, en la mayoría de los criterios, al tomar una decisión con el método de sumas ponderadas se puede correr el riesgo de una mala decisión. Para aliviar este problema se han creado otros métodos como el ELECTRE que reduce el riesgo de tomar una mala decisión.

Método ELECTRE

Este método fue creado por B. Roy en 1969 [2] y desde entonces se ha modificado varias veces [3], la palabra ELECTRE se forma como acrónimo de la frase en francés, *ELimination Et Choix TRaduisant la realitE*. El método se aplica a través de tablas o matrices que se construyen a partir de la tabla de calificaciones. Dos conceptos importantes del método son la preferencia por sobre-calificación y ciertos umbrales de indiferencia y preferencia [6, 7].

En la tabla de calificaciones se observa que el candidato *A3* en los criterios *C1* y *C4* obtiene mayor calificación que los otros candidatos. Se dice que el candidato que obtiene una calificación mayor o igual que los otros, sobre-califica en las evaluaciones. Simbólicamente esta "relación de superación" se expresa como:

$$A_h \; S_j \; A_k \qquad (3)$$

La sobre-calificación indica que la alternativa A_h es preferible a la $A_{k.}$ en el criterio considerado si la calificación de A_h es mayor o igual que la de A_k. En otras palabras se considera que A_h es tan buena o mejor que A_k

El método ELECTRE establece dos condiciones para probar que A_h es preferible o sobre-califica a la $A_{k.}$ usando la relación de superación y dos tablas o matrices (matrices de concordancia y discordancia) que aplican de manera normalizada los valores de las calificaciones y los pesos.

El método procede en dos etapas [5], primero la construcción de relaciones de superación en las matrices de concordancia y discordancia y segundo la explotación de la información en las matrices construidas. El procedimiento se resume en los siguientes pasos:

Etapa de construcción de las relaciones de superación.

1. Formar la matriz o tabla de concordancias. Indicar tanto en las hileras como en las columnas las alternativas y en cada celda el índice de concordancia $C_{h,k}$ calculado con la fórmula:

$$C_{h,k} = \frac{\sum_{j:A_h S_j A_k} w_j}{\sum_j w_j} \qquad (4)$$

El índice de concordancia expresa una relación de preferencia al cuantificar la proporción de los pesos para los cuales la alternativa A_h es tan buena o mejor a la A_k. El término en el numerador de (4) indica que sólo se suman los pesos de los criterios en los que la alternativa A_h sobre-califica a la alternativa A_k, es decir, cuando $a_{h,j} \geq a_{k,j}$.

Esto implica que una alternativa aventaja y puede preferirse a otra si las calificaciones en la mayoría de los criterios son iguales o superan a la otra. El índice de concordancia varía entre cero (ausencia total de preferencia sea cual sea el criterio de valoración elegido) y uno (preferencia total de la alternativa sobre las demás).

La matriz de concordancias será:

$$C = \begin{bmatrix} - & C_{1,2} & \cdots\cdots & C_{1,n} \\ C_{2,1} & - & \cdots C_{2,(n-1)} & C_{2,n} \\ \vdots & \vdots & - & \vdots \\ C_{n,1} & C_{n,2} \cdots & C_{n,(n-1)} & - \end{bmatrix}$$

Los elementos de la diagonal de la matriz se dejan en blanco ya que no se puede comparar a una alternativa con ella misma. La prueba de sobre-calificación se aplica a las alternativas de dos en dos.

2. Formar la matriz de discordancias de manera similar a la matriz de concordancias, calculando el valor en las celdas con la diferencia máxima positiva de las calificaciones, es decir:

$$D_{h,k} = \frac{máxima\ positivo(a_k - a_h)\big|_{en\ los\ j\ criterios}}{calificaci\acute{o}n\ mayor - calificaci\acute{o}n\ menor} \qquad (5)$$

El índice de discordancia $D_{h,k}$ expresa la diferencia mayor positiva de las calificaciones para las que la alternativa A_h es peor que la A_k, por lo que sólo se toman en cuenta los pares en los que A_h no sobre-califica a la alternativa A_k. Si la calificación de A_h es mayor que la de A_k el índice de discordancia es cero. El denominador representa la amplitud de las calificaciones considerada en cada criterio.

El índice de discordancia captura la opción de inaceptabilidad de una alternativa como preferente, si presenta un bajo desempeño en las comparaciones de las calificaciones, aunque sea en al menos uno de los criterios y sobresalga en los demás, representa la existencia de una oposición significativa contra el índice de concordancia. En el cálculo del índice de discordancia no interviene la prueba de sobre-calificación ni los pesos.

Una simplificación al método que no altera los resultados, es no usar los términos en los denominadores de las ecuaciones 4 y 5, siempre que las calificaciones y los pesos se normalicen en la misma escala de valores. Las tablas o matrices de concordancia y discordancia son cuadradas, ya que contienen el mismo número de filas que de columnas.

3. Para identificar los patrones de dominancias se definen dos límites o umbrales de comparación, *p* y *q*. Estos valores pueden especificarse por los analistas en la toma de decisión, pero una forma práctica de obtener estos valores es con los índices de concordancia y discordancia.

Calcular el umbral de preferencia *p* con la matriz de concordancias como el valor próximo mayor o igual al promedio y que exista en los números de la matriz de concordancias ($\bar{c} = \sum_i \sum_j C_{i,j} / n \cdot (n-1)$) que indica la diferencia con la que una calificación aventaja a otra. De la misma manera el umbral de indiferencia *q* se determina con el valor próximo menor o igual al promedio y que exista en los números de la matriz de discordancias.

Etapa de explotación.

4. Se construyen dos tablas con las dominancias, primero una con las comparaciones por hilera de las alternativas, de dos en dos, en las matrices de concordancia y discordancia si se cumplen las condiciones siguientes:

La alternativa A_h domina a la alternativa A_k si $C_{h,k} \geq p$ y sólo si $D_{h,k} \leq q$ (6)

A esta expresión se le conoce como la prueba de dominancia. Numéricamente distingue a la alternativa A_h como mejor a la A_k cuando su índice de concordancia está por arriba del umbral de sobre calificación y la discordancia esta por abajo del umbral de no sobre-calificación.

En la segunda tabla de dominancias se hacen las comparaciones por columna y deben cumplir la prueba de dominancia.

5. Al unir las dos tablas de dominancias se determina la lista de preferencias o jerarquía de las alternativas, ordenándolas según el mayor número de dominancias por hilera y el menor número de dominancias por columna. Así queda en primer lugar la que domina a las demás y ninguna la domina, ver Tabla 4.

Tabla 4. Comparación de dominancias entre las alternativas.

	Dominancia por filas (F)	Dominancias por columnas (C)	Diferencia de dominancias F - C	Jerarquía
Alternativa A1				
Alternativa A2				
…				
Alternativa An				

En el método original [2,3] se forman dos matrices con los resultados de las pruebas de dominancias, primero la matriz de dominancia concordante, matriz F con respecto a las concordancias con los valores en las celdas calculados como:

$$f_{i,j} = \begin{cases} 1 & sí \quad C_{i,j} \geq p \\ 0 & sí \quad C_{i,j} < p \end{cases}$$

Y segundo se forma la matriz de dominancia discordante G con respecto a las discordancias con los valores en las celdas calculados como:

$$g_{i,j} = \begin{cases} 1 & sí \quad D_{i,j} < q \\ 0 & sí \quad D_{i,j} \geq q \end{cases}$$

Después se calcula la matriz de dominancias agregadas con el producto E = F*G, cuyos elementos corresponden al producto booleano $e_{i,j} = f_{i,j} \bullet g_{i,j}$. En esta matriz se tienen valores de 0 y/o 1. Significa que la alternativa de la fila considerada domina a las alternativas de las columnas en donde aparece un 1. Si aparece un cero, entonces la alternativa de la fila no domina a las de las columnas. Al determinar un orden de acuerdo al mayor número de dominancias para las alternativas se determina el orden de preferencia o jerarquía de las alternativas de la mejor a la peor. El procedimiento descrito simplifica los cálculos al evitar el producto booleano de las matrices F y G, del método original.

El método ELECTRE III y ELECTRE TRI introducen modificaciones para determinar los valores de índices de concordancia y discordancia, por lo demás se aplican igual [2].

Caso de estudio

El impacto negativo de las rutas de reacciones sobre el medio ambiente debe minimizarse, especialmente evitando o reduciendo el uso de substancias que sean corrosivas, explosivas o

tóxicas. Se han propuesto varios métodos para evaluar y comparar rutas de reacciones en términos de la seguridad inherente en los procesos químicos [12, 13, 14].

Se presenta como caso de estudio la selección de la ruta de reacciones inherentemente seguras para producir ácido acético. Se comparan seis rutas de reacción de las cuales se cuenta con información relacionada con las condiciones de reacción e impacto ambiental [13], definen los criterios siguientes, C1: temperatura, C2: Presión, C3: rendimiento, C4: índice de reacciones y C5: índice químico. Los datos se muestran en la Tabla 5.

Tabla 5. Datos para las rutas de reacción en la producción de ácido acético.

Alternativas de reacción	Temperatura T(ºC)	Presión P(atm)	Rendimiento Y(%)	Índice de reacciones IR	Índice Químico IQ
A1:Oxidación de etileno	150	4.5	80	7	8
A2:Oxidación de butano	150 - 200	150 - 200	75	12	8
A3:Oxidación de acetaldehído	60 - 80	3 - 10	95	6	12
A4:Oxidación de etano	150 - 450	15 - 30	25	15	8
A5:Oxidación de etanol	60 - 115	1 - 4	90	6	8
A6:Oxidación de buteno	180 - 240	2 - 30	46	13	8

Estas variables son factores asociados a la peligrosidad de las rutas de reacción, a menor valor de T, P, IR o IQ se tendrá mayor seguridad. El IR caracteriza las condiciones de operación de las reacciones y la exotermicidad, mientras que el IQ caracteriza la corrosividad, explosividad y la toxicidad, información que se obtiene con los valore del diamante de riesgos de la NFPA. Se han asignado un rango de 0 a 10 para los factores T, P y rendimiento, Y en [12, 13] por ejemplo, se recomiendan índices con valores de 0 para Y=0% y 10 para Y=100%.

Discusión de Resultados

Con las seis rutas de reacción consideradas como alternativas (A1, A2, etc.) y los factores de las reacciones considerados como criterios de selección C1=T, C2=P, C3=Y, etc.), se forma la matriz de decisión normalizada que resume las calificaciones. Para la temperatura por ejemplo, primero se toman valores promedio en las temperaturas en las que se reporta un intervalo de valores, por ejemplo para la alternativa A4, la temperatura del intervalo de 150 a 450 ºC se toma un valor promedio de 300ºC. Luego se dividen todas entre el valor mayor, se restan de 1 y se multiplican por 10, quedando normalizadas en la escala de 0 a 10. La tabla de calificaciones queda:

C1	C2	C3	C4	C5
5	9.2	8	3.63	2
4.17	0	7.5	1.82	4
7.67	8.84	9.5	5.47	0
0	5.98	2.5	0.19	4
7.08	9.55	9	2.41	4
3.0	7.14	4.6	5.60	4

Los elementos de esta matriz son las calificaciones $a_{i,j}$ para la alternativa A_i en el criterio *j*. El vector de pesos de ponderación de los criterios es *W= (3, 5, 2, 2, 4)*, el criterio presión se considera como el más importante mientras que los criterios Y e IR son igualmente importantes. El vector normalizado de pesos resulta

$$\overline{W} = (0.1875, 0.3125, 0.125, 0.125, 0.250).$$

Las matrices de concordancia y discordancia que se obtienen son:

$$\begin{pmatrix} - & 0.75 & 0.5625 & 0.750 & 0.125 & 0.625 \\ 0.250 & - & 0.250 & 0.6875 & 0.250 & 0.5625 \\ 0.4375 & 0.750 & - & 0.750 & 0.4375 & 0.625 \\ 0.250 & 0.5625 & 0.250 & - & 0.250 & 0.250 \\ 0.875 & 1.000 & 0.5625 & 1.000 & - & 0.875 \\ 0.375 & 0.6875 & 0.375 & 1.000 & 0.375 & - \end{pmatrix} \quad \begin{pmatrix} - & 2 & 2.67 & 2 & 2.08 & 2 \\ 9.2 & - & 8.84 & 5.98 & 9.55 & 7.14 \\ 2 & 4 & - & 4 & 4 & 4 \\ 5.5 & 5 & 7.67 & - & 7.08 & 5.41 \\ 1.22 & 0 & 3.06 & 0 & - & 3.19 \\ 3.4 & 2.9 & 4.9 & 0 & 4.4 & - \end{pmatrix}$$

Con valores de umbrales de p=0.6 y q=4, se obtiene la siguiente tabla de dominancias.

	Dominancia por filas (F)	Dominancias por columnas (C)	Diferencia de dominancias F - C	Jerarquía
Alternativa A1	A2, A4, A6	A5	2	3er. lugar
Alternativa A2	0	A1, A3, A5, A6	-4	5to. lugar
Alternativa A3	A2, A4, A6	0	3	4to. lugar
Alternativa A4	0	A1, A3, A5, A6	-4	5to. lugar
Alternativa A5	A1, A2, A4, A6	0	4	1er. lugar
Alternativa A6	A2, A4	A1, A3, A5	-1	2do. lugar

Aquí se interpreta que para la alternativa A1 domina a las alternativas A2, A4, A6 (dominancias por filas) y es dominada por la alternativa A5 (dominancias por columnas). De acuerdo a la columna de jerarquía el orden de preferencia es A5> A6> A1> A3> (A2, A4), teniéndose un empate en la quinta posición entre las alternativas A2 y A4. Por lo que se obtiene que la oxidación de etanol es la ruta de reacción más inherentemente segura para producir el ácido acético. Este resultado es igual al que se obtiene en la literatura [13] usando un programa de computadora con un sistema experto.

Conclusión

El caso de estudio de la comparación de rutas de reacción para obtener ácido acético ilustra la aplicabilidad del método ELECTRE para seleccionar entre varias la ruta inherentemente más segura. La idea de seleccionar la ruta de reacciones más seguras es diseñar el proceso químico que reduzca los riesgos asociados a las condiciones de operación, temperatura, presión, toxicidad y otros factores para preservar la seguridad del personal de las plantas químicas, las instalaciones y el medio ambiente. Los resultados son iguales a los reportados en la literatura con un método más sencillo que un sistema experto. La simplificación al método ELECTRE que se presenta en este artículo es una innovación al procedimiento de cálculo que lo hace más eficiente y simple.

Referencias

1. Edwards, D.W., Lawrence, D. Assessing The Inherent Safety of Chemical Process Routes: Is There a Relation Between Plant Costs and Inherent Safety?, Trans IChemE, 71 Part B 252-258. 1993.

2. Roy, B. – Classement et choix en présence de points de vue multiples (la méthode ELECTRE), *Revue Internationale de Recherche Opérationnelle*, no. 8, marzo-abril, 1968.

3. Roy B., Mousseau V., "A theoretical framework for analyzing the notion of relative importance of criteria", *Journal of Multi-criteria Decision Analysis*, vol. 5, 145–159, 1996.

4. Jaimes, L. J. L, F. J., Sandoval, y R. R. Torres, Aplicación del método Electra para la selección de un catalizador de hidrodesalquilación de tolueno. Acta Mexicana de Ciencia y Tecnología. Vol. X, Núm. 37. pp. 35-43. Enero-marzo, 1992.

5. Brans, J.P., Vincke, Ph. and Marechal, B. "How to select and how to rank projects: The PROMETHEE-method", *European Journal of Operational Research*, vol. 24, 228- 238, 1986.

6. Blondeau, P., M. Spérandio, F. Allard. Multicriteria analysis of ventilation in summer period, *Building and Environment*, Vol. 37, pp 165–176. 2002.

7. Figueira, J., S. Greco y M. Ehrgott. *Multiple Criteria Decision Analysis: State of the Art Surveys.* Springer's International Series. 2005.

8. Leyva-López, J.C. y E. Fernández-González . A new method for group decision support based on ELECTRE III methodology. *European Journal of Operational Research*. Vol. 148, pp. 14–27, 2003

9. Balasubramaniam A, A. R. Boyle y N. Voulvoulis. *Chemosphere*. Vol. 66. pp 791–798. 2007.

10. Beccali, M., Cellura, M., Mistretta, M., Decision-making in energy planning. Application of the ELECTRE method at regional level for the diffusion of renewable energy technology. *Renew. Energy.* Vol. 28, pp. 2063 – 2087. 2003.

11. Chatterjee P., V. M. Athawale y S. Chakraborty. Selection of materials using compromise ranking and outranking methods. *Materials and Design. Vol.*30. pp 4043–4053. 2009.

12. Heikkilä, A.-M. (1999), *Inherent Safety in Process Plant Design*, D.Tech. Thesis, VTT Publicat. 384, Technical Research Centre of Finland; http://www.inf.vtt.fi/pdf/publications/1999/P384.pdf

13. Palaniappan, C., Srinivasan, R., Tan, R. Selection of Inherently Safer Processes routes: a case study. *Chem. Eng. and Processing.* Vol. 43, pp. 647-653. 2004.

14. Gentile M. Development of a hierarchical Fuzzy Model for the evaluation of Inherent Safety. Tesis doctoral, Texas A. & M. University, Agosto 2004.

Revista Internacional de Investigación e Innovación Tecnológica

Página principal: www.riiit.com.mx

Biohydrogen Production By Microbial Mixed Culture Fixed On Opuntia Imbricata Native And Modificated

Cepeda-Rodríguez, Ya., Ríos-González, L.Ja., Martínez-Luévanos, Ab., Garza-García, Ya., Rodríguez-de la Garza, J.Aa.[a]

[a]Biotechnology Department; Chemistry Faculty; Universidad Autonoma de Coahuila; Z.C. 25280; Saltillo, Coahuila.

[b]Departament of Investigation in Materials; Chemistry Faculty; Universidad Autonoma de Coahuila; Z.C. 25280; Saltillo, Coahuila.

Resumen

Opuntia imbricata como soporte natural fue utilizado para inmovilizar un cultivo mixto microbiano para la producción de hidrógeno bajo condiciones anaerobias. Piezas secas de *Opuntia imbricata* fueron expuestas a diferentes tratamientos. El objetivo de este trabajo fue estudiar el efecto de diferentes tratamientos del soporte sobre el proceso de producción de H2, a través de las variables de respuesta: consumo de la demanda química de oxígeno (DQO) y producción de H2. Las piezas fueron expuestas a tratamientos con KIO3 y O3 de acuerdo a un diseño factorial 23 y posteriormente transferidas a reactores tipo batch. Los ensayos en batch fueron llevados a cabo a pH 5.5, 25 °C, 20 g de glucosa L-1 y una velocidad de agitación de 150 rpm. El análisis termogravimétrico y el análisis espectroscópico por transformadas de Fourier (FTIR) fueron usados para el estudio del efecto de los tratamientos sobre el soporte. Los reactores con las piezas tratadas alcanzaron una mayor producción de H2 que los reactores con piezas sin tratar, dando como resultado que el tratamiento soporte desempeña un papel crucial en la adhesión celular y la producción de H2.El aumento en los niveles de producción de H2 fue atribuido a la transformación de los grupos alcohólicos de la celulosa a aldehídos, los cuales están unidos a enlaces –CH=N producidos por microorganismos. Los soportes tratados con KIO3

(0.02M), a 90°C, así como pH 2 fue encontrado como el tratamiento más efectivo con una máxima producción de H2 de 13.42 mmol y 1.86 mmol H2 L-1 h-1.

Palabras clave: células inmovilizadas, lodo anaerobio, Opuntia imbricata, piezas secas pretratadas producción de H2

Abstract

A natural substratum (*Opuntia imbricata*) was used to immobilize a microbial mixed culture for H2 production under anaerobic conditions. *Opuntia imbricata* dried stems were subjected to different treatments. The objective of this work was to study the effect of the support treatments on H2 production process through the following response variables: soluble chemical oxygen demand (CODs) and H2 production. The steams were subject to treatments with KIO3 and O3 according to a 23 factorial design, afterward they were transferred to batch reactors. Batch tests were conducted at pH 5.5, 25°C, 20 g glucose L-1 and an agitation rate of 150 rpm. Thermogravimetric analysis and Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) were used to study the effect of the treatments on the support. Reactors with treated stems achieved a higher H2 production than reactors with non-pretreated stems, resulting that the substratum treatment plays a crucial role in cell adhesion and H2 production. The enhancement of the H2 production was attributed to the transformation of cellulose alcohol groups to aldehydes, which are bonded to links –CH=N produced by microorganisms. The 0.02M KIO3 treated support at 90°C and pH 2 was found to be the most effective treatment with a maximum H2 production of 13.42 mmol and 1.86 mmol H2 L-1 h-1.

©2013 RIIIT, Todos los Derechos Reservados

Keywords: Anaerobic sludge, H2 production, Immobilized cell, Opuntia imbricata, pretreated dried stems.

Introduction

H2 has been recognized as the ideal energy carrier of the future, because it is clean, recyclable, and efficient. Direct and highly efficient conversion of H2 into electricity by fuel cells makes the application of H2 energy even more attractive (Das & Veziroglu, 2001; Levin, Pitt & Love, 2004). Fermentative H2 production can be achieved by dark fermentation or by photo fermentation. Dark fermentation normally achieves a much higher H2 production rate and is considered more applicable for simultaneous waste reduction and H2 generation (Chang, Lee & Lin, 2002; Hawkes, Dinsdale, Hawkes & Hussy, 2002). Suspended-cell culture has been the most frequently used system for H2 production via dark fermentation. However, continuous operation of suspended-cell systems often encounters problems with washout of biomass at high dilution rates and would require the recycling of biomass from the effluent to maintain sufficient cell density for high H2 production activity. Effective retention of biomass can also be achieved by utilizing immobilized cells or membrane reactors (Kumar & Das, 2001; Kim, Kim, Ryu, Song, Kim & Yeom, 2005). The immobilized-cell system is also gifted with a feature of creating a local anaerobic environment, which is well suited to fermentative H2 production (Wu, Lin, Chang & Chang, 2005; Wu, Lin, Chang, Lee & Lin, 2002; Wu, Lin & Chang, 2003). However, the technology has not been widely adopted to H2 production through dark fermentation, whereas there have been some examples describing the use of immobilized cells for phototrophic H2 production (Najafpour, Younesi & Mohamed, 2004).

In the present study a natural substratum *Opuntia imbricata* (coyonostle) was used to immobilize a microbial mixed culture for H2 production under anaerobic conditions. *Opuntia imbricata* is an abundant cactus in the northern region of Mexico which is composed of 28.68+/–6.27% hemicellulose, 34.02+/–5.04% cellulose and 37.64+/–6.31% lignin (Ilyina, Huerta, Martinez, Rodriguez & Gorokhovsky, 2008; Prieto, Filardo, Pérez, Beltrán, Román & Méndez, 2006).

The present work describes the effect on two response variables, soluble chemical oxygen demand (CODs) and H2 production of various support treatments; performed either in KIO3 solution at different pH and temperature or in O3 solution at different pH and exposure time. Heat treatment is a wood modification method which increases its dimensional stability, permeability and performance (Korkut, 2008). There are a number of ways to modify solid support *Opuntia imbricata* for covalent cell immobilization. This article focuses on preactivation of support by a strong oxidant to produce aldehyde groups. The mechanism of periodate activation suggests the transformation of cellulose alcohol groups to aldehydes, which are bonded to links –CH=N produced by microorganisms. (Becerra, Martínez, Rodríguez & Ilyiná, 2006). The periodate substratum activation increases the oxidation level and the immobilization percentages (Bilbao, Valdés & Blanco, 2000).

Materials and methods

H2-producing inoculum

Anaerobic microbial mixed culture obtained from a beer plant in Zacatecas was used as inoculum. It was heat-treated at 90◦C for 30 min to inactivate H2 consumers and to harvest spore forming anaerobic bacteria before being subjected to cell

immobilization (Wu & Chang, 2007; Wang & Wan, 2008a)

Medium composition

The medium used for H2 fermentation was as followed (g L-1) NH4HCO3 5.24; NaHCO3 6.72; K2HPO4 0.125; MgCl2•6H2O 0.1; MnSO4•6H2O 0.015; FeSO4•7H2O 0.025; CuSO4•5H2O 0.005; and CoCl2•5H2O 1.25 x 10-4 (Ogino, Miura, Ishimi, Seki & Yoshida, 2005). Glucose concentration in the medium was set at 20 g L-1.

Substratum (Opuntia imbricata) and pretreatment

Small stem pieces of Opuntia imbricata measuring 1.8 (R) X 7 (L) cm were cut, cleaned, numbered and weighed at 25°C.

Stem pieces were treated with either KIO3 or O3 aqueous solutions as oxidant agent. Experimental design (23) was applied for pretreatment analysis (Montgomery, 2005; Wang & Wan, 2008b). Three independent factors were selected: concentration, pH and temperature for KIO3 solutions and concentration, pH and time for O3 solutions. Factors were considered at a high and a low level of a multifactor design (see Table 1). Pretreated stems were dried at 25°C for 96 hours.

Table 1. Parameters of the 2^3 factorial design for the substratum pretreatments.

Oxidant Agent	**Concentration**		**pH**		**Temperature**		**Time**	
	High Level	Low Level	High Level	Low Level	High Level	Low Level	High Level	Low Level
KIO_3	0.02 M	0.01 M	4	2	90°C	25°C		
O_3	80 gr/m^3	30 gr/m^3	4	2			5 min	1 min

Multifactor variance analysis (ANOVA) and linear regression models were analyzed using a statistical software program in Excel.

The optimum pretreatment condition was estimated considering the effect of pretreatments on each response variable.

The ozone treatments were performed using an ozone generator (Pacific Ozone Technology L22 model), the pressure and temperature were kept at 0.859 bar and 27°C respectively. The KIO3 treatments were performed using 500 ml of periodate solution that was kept under agitation at 250 rpm for 1 hr (Bilbao, Valdés & Blanco, 2000). All experiments were conducted by triplicate.

H2 production in Batch

20 ml of acclimated H2-producing microbial mixed culture was placed in a 250-ml serum vial containing 180 ml of medium and the pretreated substratum for biofilm formation. Silicone rubber stoppers were used to avoid gas leakage from the bottles. All experiments were carried out at constant temperature of 25°C, a pH of 5.5 and an agitation rate of 150 rpm (Wang & Wan, 2008c; Van Ginkel, Sung & Lay, 2001; Mu, Zheng, Yu & Zhu, 2006; Fang & Liu, 2002; Lay, Fan, Chang & Ku, 2003; Okamoto, Miyahara, Mizuno & Noike, 2000; Gomez, Moran, Cuetos & Sanchez, 2006). pH was adjusted by 0.1 N NaOH and 0.1 N HCl.

Analytical Methods

During fermentation process, pH, soluble COD and H2 production were monitored. H2 was sampled from the head space of the

bottles by using gas-tight glass syringes. The H2 production in batch reactors was determined by gas chromatography of headspace taking into account the volume of the chromatographic syringe and the volume of reactor headspace. H2 was calculated by comparing the sample biogas with a standard of pure H2 using a gas chromatograph (VARIAN 3400) equipped with a thermal conductivity detector (TCD). The temperatures of injector, detector and column were kept at 200°C, 200°C and 50°C. Helium was used as a carrier gas. COD and pH were monitored and measured every 12 hours. (Greenberg, Clesceri & Eaton, 2005).

Thermogravimetric analysis

A Thermogravimetric analyzer Shimadzu TGA-50 was used to determine the thermal effect on dried stems. 5.705 mg of dried stems was used for the analysis. Samples were heated from 25°C to 500°C at a heating rate of 10°C/min.

Fourier transform infrared spectroscopy (FT-IR)

Perkin-Elmer Spectrum GX FT-IR instrument with a Universal ATR Diamond/ZnSe crystal with one reflection was used for this study. FT-IR spectra for native and each treated sample that was obteined. The FT-IR spectra for each treatment were transformed into absorbance spectra and normalization to 1.5 absorbance units for the highest peak.

Results and discussion

The H2 production for the different pretreatments is summarized in Table 2. Results in table show that 0.02 M, pH 2, 90°C periodate treatment had the highest H2 production. The maximum H2 production was 1.86 mmol H2 L-1 mineral medium h-1 and in all cases the H2 production of pretreated dried stems was higher than that observed in non-pretreated dried stems.

H2 production related to COD removal is also shown in Table 2. The optimal relation was 3.35 mmol H2 g COD removed-1. In almost all cases treated specimens showed higher levels than that observed in untreated specimens. Results show that modification to dried stems due to pretreatments remarkably improved H2 production and COD removal compared with results of previous studies (Mohan, Bhaskar & Sarma, 2007; Yang, Zhangb, McGarveyc & Benemann, 2007; Kim, Han & Shin, 2004; Lin & Chang, 1999; Chen, Lin & Chang, 2001; Mizuno, Dinsdale, Hawkes, Hawkes & Noike, 2000; Wu & Chang, 2007).

The preactivation of support by oxidation suggested the transformation of cellulose alcohol groups to aldehydes. The aldehyde groups of the activated support are able to react with amino groups of microorganism to form covalent bonds and result in the immobilization of the microbial mixed culture. The decrease in the oxidant concentration after support activation was demonstrated by means of common analytical technique and it could be considered as an indirect evidence for aldehyde group formation (Becerra, Martínez, Rodríguez & Ilyiná, 2006; Bilbao, Valdés & Blanco, 2000).

Table 2. Hydrogen production yield in reactors with a microbial mixed culture fixed on *Opuntia imbricata* native and modificated.

Treatment	mmol H_2 L^{-1} h^{-1}	mmol H_2 g COD removed^{-1}
30 g/m^3, pH 2, 1 min	0.58921418	1.834526318
30 g/m^3, pH 2, 5 min	1.06056168	1.339656864
30 g/m^3, pH 4, 1 min	0.63183104	1.229509059
30 g/m^3 pH 4 5 min	0.52124263	1.825757952
80 g/m^3 pH 2 1 min	0.60955017	0.997445732
80 g/m^3 pH 2 5 min	0.67713966	1.250103984
80 g/m^3 pH 4 1 min	0.46616971	1.307696845
80 g/m^3 pH 4 5 min	1.15819094	1.969836568
0.01 M pH 2 25°C	0.72219932	1.316413945
0.01 M pH 2 90°C	0.50872605	1.762858195
0.01 M pH 4 25°C	0.84166687	3.030000721
0.01 M pH 4 90°C	0.80043133	2.376538393
0.02 M pH 2 25°C	0.83009354	1.757845152
0.02 M pH 2 90°C	1.8641256	3.355426084
0.02 M pH 4 25°C	0.54877908	1.922209979
0.02 M pH 4 90°C	0.46948273	1.94675562
No treated support	0.37799703	1.122300462

Thermal analyses

Figure 1 shows the effect of temperature in the sample weight loss. As can be seen from Figure 1 the specimens weight decreases with the increase of temperature. Based on these results it can be supposed that the thermal treatments could modify the support properties. The aim of thermal analyses was only to validate the use of thermal treatments for the support modification therefore the analyses was only carried out on non-pretreated dried stems.

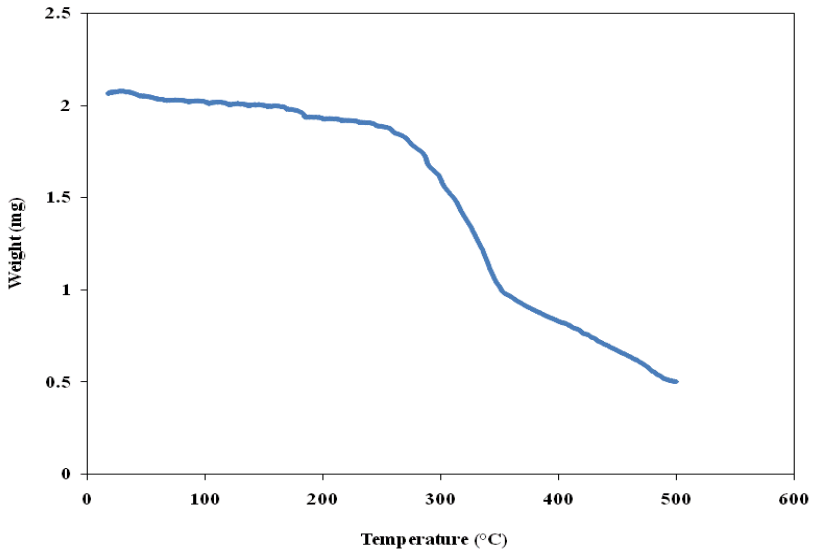


Figure 1. Native *Opuntia imbricata* TGA analysis.

FT-IR spectra

Figures 2 and 3 shows the FT-IR for the pretreated specimens associated to the highest H2 production levels. The 1660-1760 cm-1 band is characteristic for the ester, acid and aldehyde groups, however the preactivation of support by oxidation suggested the transformation of cellulose alcohol groups to aldehydes. Within that range aldehyde C=O stretch tend to absorb in the wavelength 1660-1740 cm-1, normal aliphatic aldehyde tend to absorb in the wavelength 1740-1725 cm-1, conjugation with double bond tend to absorb in the wavelength 1700-1680 cm-1 and conjugation with phenyl group tend to absorb in the wavelength 1700-1660 cm-1 (Socrates, 2004). Figures 2 and 3 show the absorption band characteristic for aldehyde groups and it can be observe a significant change for the treatments associated to the highest H2 production levels. The results implied that the support activation transforms the cellulose alcohol groups to aldehyde and this change could facilitate cell adhesion to substratum. The FTIR spectra curves for the support after the treatments were similar although the intensities of characteristic absorption peaks changed. This indicated that the functional groups of the support changed due to treatments. As shown in figure 2, the peak 1 values are ranked in the order of T1>T3>T4>ST>T2 and peak 2 are ranked in the order T3>T4>T2>ST>T1. As describe above these changes in dried stems due to pretreatments could facilitate cell adhesion and therefore improve H2 production.

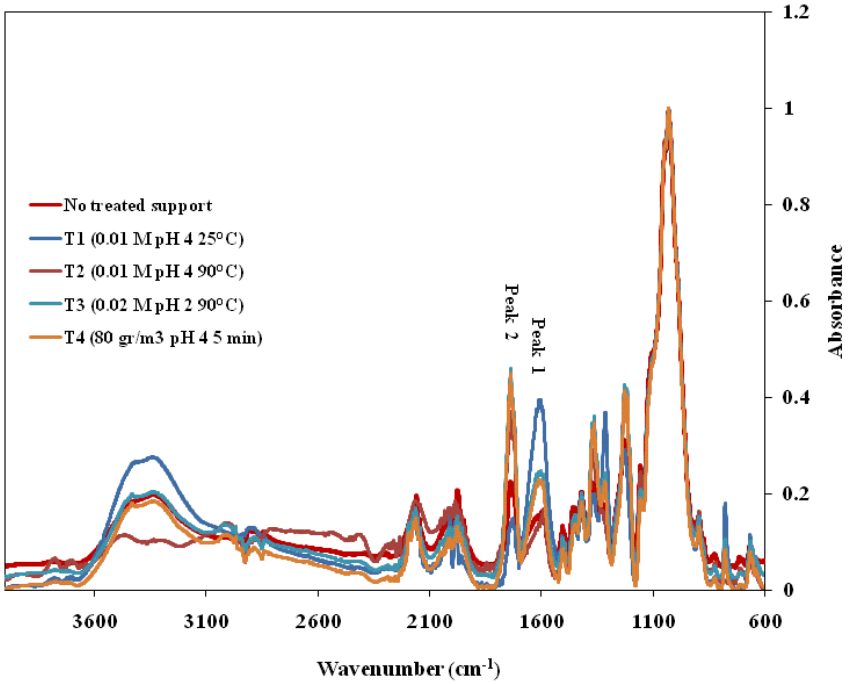


Figure 2. FT-IR spectra of treated samples associated to the highest H_2 yields.

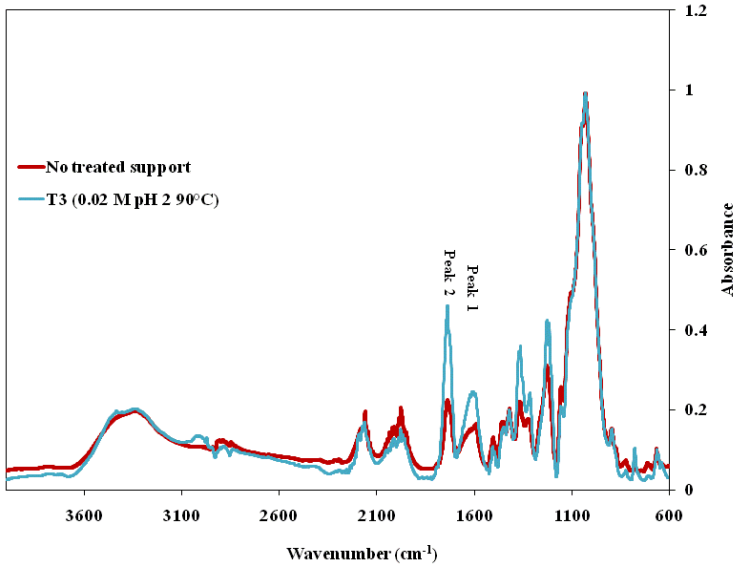


Figure 3. FT-IR spectra of treated sample associated to the maximum hydrogen production yield.

Conclusion

The pretreated substratum has proved to enhance H2 production by microbial mixed culture and this can be attributed to changes produced by pretreatments on dried stems structure making suitable for cell adhesion than not treated dried stems. The maximum H2 production of 1.86 mmol H2 L-1 mineral medium * h-1 and the optimal relation between H2 produced and COD removal of 3.35 mmol H2 g COD removed-1 were observed with 0.02 M periodate treated support at pH 2 and 90°C. The FT-IR indicated that the functional groups of the support have changed due to treatments, resulting in the improve of the H2 yields.

References

[1] Das, D. & Veziroglu, T. N. (2001). Hydrogen production by biological processes: survey of literature. Int J Hydrogen Energy, 26, 13-28.

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

[3] Chang, J. S., Lee, K. S. & Lin, P. J. (2002). Biohydrogen production with fixed-bed bioreactors. Int J Hydrogen Energy, 27, 1167-1174.

[4] Hawkes, F. R., Dinsdale, R., Hawkes, D. L. & Hussy, I. (2002). Sustainable fermentative hydrogen production: challenges for process optimization. Int J Hydrogen Energy, 27, 1339-1347.

[5] Kumar, N. & Das, D. (2001). Continuous hydrogen production by immobilized Enterobacter cloacae IIT-BT 08 using lignocellulosic materials as solid matrices. Enzyme Microb Technol, 29, 280-287.

[6] Kim, J. O., Kim, Y. H., Ryu, J. Y., Song, B. K., Kim, I. H. & Yeom, S. H. (2005). Immobilization methods for continuous hydrogen gas production biofilm formation versus granulation. Process Biochemistry, 40, 1331-1337.

[7] Wu, S. Y., Lin, C. N., Chang, J. S. & Chang, J. (2005). Biohydrogen production with anaerobic sludge immobilized by ethylene-vinyl acetate copolymer. Int J Hydrogen Energy, 30, 1375-1381

[8] Wu, S. Y., Lin, C. N., Chang, J. S., Lee, K. S. & Lin, P. J. (2002). Microbial hydrogen production with immobilized sewage sludge. Biotechnol Prog, 18, 921-926.

[9] Wu, S. Y., Lin, C. N. & Chang, J. S. (2003). Hydrogen production with immobilized sewage sludge in three-phase fluidized-bed bioreactors. Biotechnol Prog, 19, 828-832.

[10] Najafpour, G., Younesi, H. & Mohamed, A. R. (2004). Effect of organic substrate on hydrogen production from synthesis gas using Rhodospirillum rubrum in batch culture. Biochem Eng J, 21, 123-130.

[11] Ilyina, A., Huerta, P. J., Martinez, J. L., Rodriguez, J. & Gorokhovsky, A. (2008). Stability and activity of bovine prostaglandin H synthase immobilized on Opuntia imbricata (coyonoxtle). Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 51, 1-9.

[12] Prieto, F., Filardo, S., Pérez, E., Beltrán, R. I., Román, A. D. & Méndez, M. A. (2006). Caracterización física y química de semillas de opuntias (Opuntia spp.) cultivadas en el Estado de Hidalgo, México. Bioagro, 18, 163-169.

[13] Korkut, S. (2008). The effects of heat treatment on some technological properties in Uludag fir (Abies bornmuellerinana Mattf.) wood. Building and Environment, 43, 422-428.

[14] Becerra, J. M. E., Martínez, J. L., Rodríguez, J. & Ilyiná, A. (2006). Immobilization of penicillin acylase of filamentous Fungi on the pellets opuntia imbricata (coyonoxtle). Becth Mock YH-TA, 47, 109-114.

[15] Bilbao, Y., Valdés, L. & Blanco, Y. T. (2000). Inmovilización covalente de glucosa oxidasa y peroxidasa. Rev Cubana Farm, 34, 108-112.

[16] Wu, K. J. & Chang, J. S. (2007). Batch and continuous fermentative production of hydrogen with anaerobic sludge entrapped in a composite polymeric matrix. Process Biochem, 42, 279-284.

[17] Wang, J. L. & Wan, W. (2008a). Comparison of different pretreatment methods for enriching hydrogen-producing cultures from digested sludge. Int J Hydrogen Energy, 33, 2934-2941.

[18] Ogino, H., Miura, T., Ishimi, K., Seki, M. & Yoshida, H. (2005). Hydrogen production from glucose by anaerobes. Biotechnol Prog, 21, 1786-1788.

[19] Montgomery, D. C. (2005). Design and analysis of experiments. (5a. Ed.). N.Y.: John Wiley & Sons Ed.

[20] Wang, J. & Wan, W. (2008b). Experimental design methods for fermentative hydrogen production: A review. Int J Hydrogen Energy, 30, 1-10.

[21] Wang, J. L. & Wan W. (2008c). The effect of substrate concentration on biohydrogen production by using kinetic models. Sci China Ser B-Chem, 51, 1110-1117.

[22] Van Ginkel, S., Sung, S. & Lay, J. J. (2001). Biohydrogen production as a function of pH and substrate concentration. Environ Sci Technol, 35, 4726-4730.

[23] Mu, Y., Zheng, X. J., Yu, H. Q. & Zhu, R. F. (2006). Biological hydrogen production by anaerobic sludge at various temperatures. Int J Hydrogen Energy, 31, 780-785

[24] Fang, H. H. P. & Liu, H. (2002). Effect of pH on hydrogen production from glucose by a mixed culture. Bioresour Technol, 82, 87-93.

[25] Lay, J., Fan, K., Chang, J. & Ku, C. (2003). Influence of chemical nature of organic wastes on their conversion to hydrogen by heat-shock digested sludge. Int J Hydrogen Energy, 28, 1361-1367.

[26] Okamoto, M., Miyahara, T., Mizuno, O. & Noike, T. (2000). Biological hydrogen potential of materials characteristic of the organic fraction of municipal solid wastes. Water Sci Tech, 41, 25-32.

[27] Gomez, X., Moran, A., Cuetos, M. & Sanchez, M. (2006). The production of hydrogen by dark fermentation of municipal solid wastes and slaughterhouse waste: A two phase process. Journal of Power Sources, 157, 727-732.

[28] Greenberg, A. E., Clesceri, L. S. & Eaton, A. D. (2005). Standard methods for the

examination of water and wastewater. (21st. Ed.). Washington, DC: American Public Health Association (APHA).

[29] Mohan, S. V., Bhaskar, Y. V. & Sarma, P. N. (2007). Biohydrogen production from chemical wastewater treatment in biofilm configured reactor operated in batch mode by selectively enriched anaerobic mixed consortia. Water Res, 41, 2652-2664.

[30] Yang, P., Zhangb, R., McGarveyc, J. A. & Benemann, J. R. (2007). Biohydrogen production from cheese processing wastewater by anaerobic fermentation using mixed microbial communities. Int J Hydrogen Energy, 32, 4761-4771.

[31] Kim, S., Han, S. K. & Shin, H. S. (2004). Feasibility of biohydrogen production by anaerobic co-digestion of food waste and sewage sludge. Int J Hydrogen Energy, 29, 1607-1616.

[32] Lin, C. Y. & Chang, R. C. (1999). Hydrogen production during the anaerobic acidogenic conversion of glucose. J Chem Technol Biotechnol, 74, 498-500.

[33] Chen, C. C., Lin, C. Y. & Chang, J. S. (2001). Kinetics of hydrogen production with continuous anaerobic cultures utilizing sucrose as the limiting substrate. Appl Microbiol Biotechnol, 57, 56-64.

[34] Mizuno, O., Dinsdale, R., Hawkes, F. R., Hawkes, D. L. & Noike, T. (2000). Enhancement of hydrogen production from glucose by nitrogen gas sparging. Bioresource Technol, 73, 59-65.

[35] Socrates G. (2004). Infrared and Raman Characteristic Group Frequencies: Tables and Charts. (3a. Ed.). N.Y.: John Wiley & Sons Ed. ISBN 978-0-470-09307-8.