

## OBTENCIÓN DE METANO MEDIANTE EL TRATAMIENTO DE VINAZAS DE ETANOL HIDRATADO UTILIZANDO UN RANMAL MODIFICADO

E. I. España Gamboa<sup>1</sup>, J.O. Mijangos Cortés<sup>1</sup>, G. Hernández Zárate<sup>2</sup>, J. A. Domínguez Maldonado<sup>1</sup>, L. M. Alzate Gaviria\*<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Centro de Investigación Científica de Yucatán, Calle 43 No. 130, Colonia Chuburná de Hidalgo, C.P. 97200, Mérida, Yucatán, México.

<sup>2</sup>Instituto Tecnológico de Boca del Río, Km. 12 Carretera Veracruz-Córdoba. C. P. 94290. Boca del Río, Veracruz. México.

Tel. (999) 9428330 ext. 291, Fax 52 (999) 9813900, e-mail [lag@cicy.mx](mailto:lag@cicy.mx)

### RESUMEN

Un Reactor Anaerobio de Manto de Lodos (RANMAL) modificado a escala laboratorio fue utilizado para la obtención de metano mediante el tratamiento de vinazas obtenidas de la producción de etanol hidratado. El reactor fue inoculado con un lodo granular y operado de manera semi-continua a condiciones mesofílicas. Durante la carga orgánica óptima (17.05 Kg DQO/m<sup>3</sup>-día), un rendimiento de metano de 0.40 m<sup>3</sup>/Kg DQO<sub>rem</sub>, una concentración de 84% de metano en el biogás y una eficiencia de remoción de DQO de 66% fueron alcanzados. En esta etapa, se observó una disminución en las características químicas del efluente obtenido en comparación con las vinazas, a excepción del sulfuro y nitrógeno amoniacal. De igual forma, iniciadores utilizados para la amplificación del gen ADN<sub>r</sub> 16S de los Dominios *Archaea* y *Bacteria*, mostró la presencia de las subclases  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -, y  $\delta$ - de las Proteobacterias, bacterias gram positivas con bajo contenido en GC, bacterias sulfato reductoras (BSR), *Bacillus* y *Clostridium*. Bacterias gram positivas con alto contenido en GC estuvieron ausentes. Además, se identificó que las arqueas metanogénicas que favorecieron la producción de metano pertenecieron a los órdenes *Methanobacteriales* y *Methanosarcinales*. La eficiencia de metano reportado en este estudio fue mayor que en otras investigaciones; por lo tanto, este RANMAL modificado es apropiado para el tratamiento de este tipo de agua residual.

Los autores prefieren una presentación oral.

## 1. Introducción

La producción de etanol para combustible, uso farmacéutico, industrial y bebidas alcohólicas se ha incrementado en los últimos años a nivel mundial. En el 2009, la producción mundial alcanzó los 74 billones de litros y aproximadamente el 95% fue elaborado por fermentación-destilación [1]. Durante esta producción un intervalo de 9-14 litros de aguas residuales (conocidas como vinazas) son generadas. Éstas son ácidas (pH: 3.5-5), poseen un color café oscuro y una Demanda Química de Oxígeno (DQO) entre 50-150 g/L [2, 3, 4]. Se ha reportado que son utilizadas como fertirriego por su contenido de nutrientes y a su alta proporción de materia orgánica. Sin embargo, debido al contenido de compuestos fitotóxicos, antibacteriales y recalcitrantes como son los fenoles, polifenoles y metales pesados, se han observado efectos negativos sobre los microorganismos y las plantas de las zonas de descarga, por lo tanto, un tratamiento de acondicionamiento de estos residuos es necesario antes de su disposición [5, 6, 7].

El alto contenido orgánico de las vinazas hace al tratamiento anaerobio la mejor opción con respecto a otros [4, 8], debido a que presenta ventajas como baja producción de lodo y una porción significativa de la DQO (>50%) puede ser convertida en biogás, el cual es considerado como una fuente de energía renovable [8, 9]. Durante la digestión anaerobia la materia orgánica es degradada por una gran diversidad microbiana (Dominios *Archaea* y *Bacteria*) donde de manera general, el dominio *Bacteria* incluye las divisiones de *Proteobacteria*, *Firmicutes*, *Chloroflexi*, *Spirochaetes*, *Bacteroides*, bacterias gram positivas con bajo contenido en GC (por debajo del 50% de guanina y citosina) y alto contenido en GC (por encima del 50% de guanina y citosina). Por otro lado, el dominio *Archaea* incluye principalmente los órdenes *Methanomicrobia*, *Methanobacteria*, *Methanosarcinales* y *Thermoplasmatales* [10]. Sin embargo, esta diversidad microbiana puede variar en función de las características operacionales del reactor y el sustrato utilizado. Actualmente, existen diversos estudios sobre el tratamiento anaerobio de distintos tipos de vinazas [11, 12, 13, 14, 15, 16, 17]; donde el mayor rendimiento de producción de metano reportado fue de  $0.344 \text{ m}^3/\text{Kg DQO}_{\text{removido}}$ .

Por lo tanto, este estudio tiene los objetivos de encontrar la carga orgánica óptima por medio del rendimiento de producción de metano por kilogramo de DQO removida ( $\text{m}^3/\text{Kg DQO}_{\text{removido}}$ ) mediante la utilización un Reactor Anaerobio de Manto de Lodos (RANMAL)

modificado para el tratamiento de vinazas generadas en la producción de alcohol hidratado e identificar grupos de arqueas y bacterias presentes en la carga orgánica óptima por amplificación en PCR del gen ADNr 16S.

## 2. Parte Experimental

### Diseño del reactor y operación

El RANMAL con un volumen de operación de 3L fue construido en acrílico. Un separador sólido-gas fue colocado en la parte superior (Figura 1), el cual tuvo la función de retener la mayor cantidad de sólidos suspendidos presentes y posteriormente ser recirculados por medio de una bomba al manto de lodos.

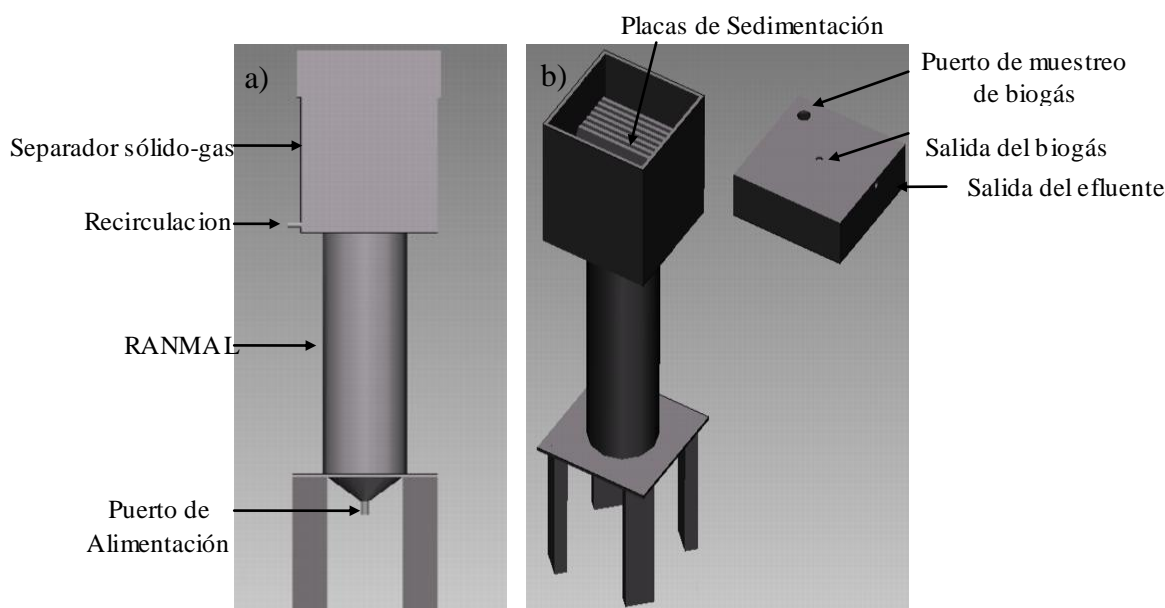


Figura 1. Prototipo de RANMAL modificado. a) Vista frontal, b) Vista desde arriba.

El reactor fue inoculado con 2.5 L de lodos granulados provenientes de un RANMAL operado para el tratamiento de vinazas obtenidas de la producción de etanol a partir de residuos de plátano. Posteriormente, fue operado a condiciones mesofílicas y alimentado de forma semi-continua con vinazas concentradas de la producción de etanol hidratado a partir de melazas de caña de azúcar. La carga orgánica fue gradualmente incrementada para reducir el Tiempo de Retención Hidráulico (TRH), considerando como óptima la mayor carga orgánica con un rendimiento de metano elevado y un alto porcentaje del mismo en el

biogás. El volumen de Biogás producido fue medido por medio de un gasómetro de salmuera acidificada de acuerdo al procedimiento reportado por Poggie *et al* (1997) [18].

### **Análisis químicos**

Las vinazas y el efluente fueron analizados químicamente para DQO, nitrógeno total ( $N_T$ ), nitrógeno amoniacal ( $N-NH_3$ ), fosfato ( $PO_4^{3-}$ ), sulfato ( $SO_4^{2-}$ ) y sulfuro ( $S^{2-}$ ) por medio de métodos colorimétricos (Hach Company DR-890) de acuerdo a las instrucciones del kit. El pH y potasio ( $K^+$ ) fueron determinados de acuerdo a métodos estandarizados [19]. Los Ácidos Grasos Volátiles (AGVs) y etanol fueron determinados por cromatografía de gases en un cromatógrafo Clarus 500-Perkin Elmer equipado con un detector de ionización de flama (FID) empleando la columna EC<sup>TM</sup> – 1000 (30 m de longitud y 0.32 mm de diámetro), se utilizó nitrógeno como gas acarreador y las temperaturas de operación fueron 240, 160 y 250 °C para el inyector, horno y detector respectivamente.

El porcentaje de metano en el biogás se cuantificó por cromatografía de gases (Clarus 500-Perkin Elmer) con un Detector de Conductividad Térmica (TCD), empleando la columna Molesieve (30 m de longitud y 0.53 mm de diámetro), utilizando nitrógeno como gas acarreador y las temperaturas de operación fueron 75, 30 y 200 °C para el inyector, horno y detector respectivamente.

### **Identificación de grupos bacterianos y arqueas metanogénicas**

Al alcanzar la carga óptima del reactor, muestras de lodo fueron colectadas y los microorganismos fueron identificados. El ADN fue directamente extraído de 250 mg de lodo húmedo, utilizando el método comercial PowerSoil<sup>TM</sup> DNA Isolation Kit (Mo-Bio Laboratories, CA) siguiendo las instrucciones del proveedor. Los fragmentos del gen ADN<sub>r</sub> 16S de los microorganismos presentes en el lodo fueron amplificados por PCR utilizando un iniciador universal 16Sf y uno de los 9 iniciadores específicos para cada grupo o género evaluado (subclases  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\delta$ -, and  $\gamma$ - de las Proteobacterias, Bacteria gram positivas con alto y bajo contenido de GC, Bacterias Reductoras de Sulfato (SRB), *Bacillus* y *Clostridium*) [20, 21]. Además, iniciadores específicos para la amplificación del gen ADN<sub>r</sub> 16S de las arqueas fueron utilizados para identificar la presencia de los órdenes *Methanobacteriales* y *Methanosarcinales* [22].

### 3. Resultados y discusión

#### Caracterización de las vinazas

El promedio de los valores de los parámetros evaluados en las vinazas empleadas en este estudio se encuentran en la Tabla 1. Se puede observar que las vinazas de este estudio son ácidas y tienen un alto contenido de DQO ( $121,000 \pm 13,000$  mg/L) y sulfato ( $5,336 \pm 806$  mg/L), los cuales son congruentes con los reportados por Kumar *et al.* [16]. Altas concentraciones de sulfuro ( $30 - 250$  mg/L) y nitrógeno amoniacal ( $1.7 - 14$  g/L) son consideradas como inhibitorios para la digestión anaerobia, por otro lado, el nitrógeno amoniacal en valores cercanos a  $200$  mg/L son benéficos [23, 24]. En este estudio la concentración de sulfuro se encontró dentro del intervalo inhibitorio y el nitrógeno amoniacal en el benéfico. Con estas características se puede observar que este tipo de agua residual es químicamente compleja y puede variar dependiendo del sustrato y el proceso utilizado para la producción de etanol.

*Tabla 1. Características de la vinaza*

Parámetros	Valor <sup>a</sup>
pH	4±0.3
DQO	121,000±13,000
SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	5,336±806
S <sup>-</sup>	168±35
N <sub>T</sub>	1,341±144
N-NH <sub>3</sub>	160±63
PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup>	141±38
K <sup>+</sup>	7,262±926
Etanol	21,007±6,380
Ácido acético	2,237±965
Ácido propiónico	4,991± 1930

<sup>a</sup> Todos los valores a excepción del pH están en mg/L

#### Operación del reactor

Los parámetros evaluados en el reactor se encuentran en la Tabla 2. Como se puede observar las cargas orgánicas  $7.27$ ,  $11.67$  y  $17.05$  Kg DQO/m<sup>3</sup>-día presentaron los mayores rendimientos de metano con  $0.43$ ,  $0.42$  y  $0.40$  m<sup>3</sup>/Kg DQO<sub>rem</sub> respectivamente. Al ser  $17.05$  Kg DQO/m<sup>3</sup>-día el valor de carga orgánica más elevado con un alto rendimiento de metano, lo que representa un menor TRH para el tratamiento de las vinazas, además de alcanzar la

mayor concentración de metano en el biogás con un 84% y una mayor remoción de DQO (66%) con respecto a las otras dos cargas orgánicas anteriormente mencionadas, se consideró a ésta (17.05 Kg DQO/m<sup>3</sup>-día) como la carga orgánica óptima.

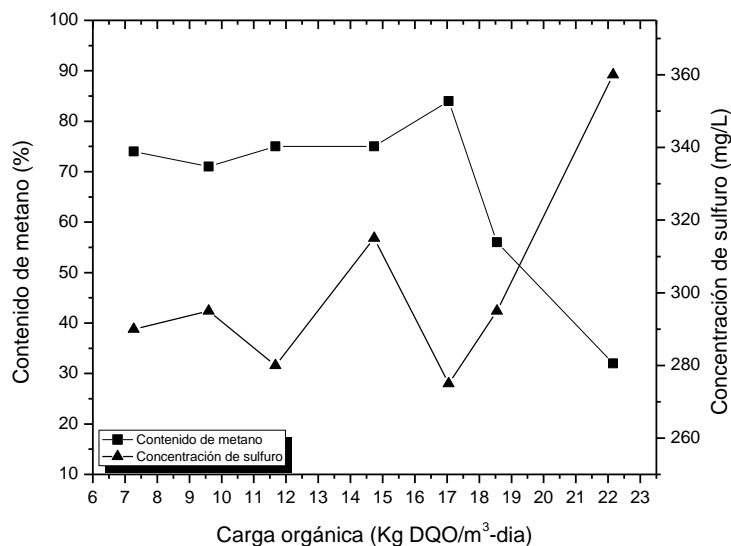
*Tabla 2. Parámetros evaluados a diferentes cargas orgánicas*

Parámetro <sup>a</sup>	Cargas Orgánicas Evaluadas (Kg DQO/m <sup>3</sup> -día)						
	7.27	9.60	11.67	14.74	17.05	18.55	22.16
TRH (días)	15	12	10	9	7.5	7	6
DQO <sub>inf</sub> (g/L)	109.1	115.2	116.7	126.3	127.9	123.7	132.9
DQO <sub>efl</sub> (g/L)	45.7	47.7	46.6	48.4	43.4	36.8	54.8
% DQO <sub>rem</sub>	58	58	58	62	66	69	59
V.B. (L)	7.36	9.14	11.60	13.86	16.00	20.74	18.46
% CH <sub>4</sub>	74	71	75	75	84	56	32
R.M (m <sup>3</sup> /KgDQO <sub>rem</sub> )	0.43	0.39	0.42	0.38	0.40	0.30	0.15
pH del reactor	7.87	7.80	7.57	7.47	6.96	6.83	6.57
A <sub>parcial</sub> (mg/L)	5,750	4,300	3,920	3,080	3,020	1,880	2,100
A <sub>intermedia</sub> (mg/L)	2,940	2,235	1,860	1,920	1,890	2,530	2,080
A <sub>total</sub> (mg/L)	5,815	4,385	3,820	3,460	3,400	3,470	3,130
AGVs (mg/L)	4,791	3,780	3,000	3,144	3,072	3,942	3,000
Coficiente alfa	0.51	0.52	0.47	0.62	0.63	1.35	0.99

<sup>a</sup> V.B.: Volumen de Biogás producido; R.M.:Rendimiento de Metano; A<sub>parcial</sub>: Alcalinidad parcial; A<sub>intermedia</sub>: Alcalinidad intermedia; A<sub>total</sub>: Alcalinidad total. Todas las alcalinidades están expresadas en mg/L de NaHCO<sub>3</sub> y los AGVs en mg/L de H<sub>3</sub>COOH.

El decrecimiento del comportamiento del reactor, a cargas orgánicas mayores de la óptima, puede ser atribuido a la reducción del sulfato, presente en las vinazas, a sulfuro. Éste último tiene la capacidad de inhibir el metabolismo de las arqueas metanogénicas y como consecuencia disminuye la concentración de metano en el biogás [23, 24]. Como se puede observar en la Figura 2, el sulfuro está relacionado inversamente con el rendimiento de metano, ya que al disminuir la concentración de sulfuro el porcentaje de metano en el biogás aumenta. La menor concentración de sulfuro (275 mg/L) se presentó a la carga orgánica óptima, con la cual se obtuvo el mayor contenido de metano en el biogás, y fue hasta 360 mg/L a la última carga orgánica cuando presentó un importante efecto negativo sobre la producción de metano. Estos valores de concentración de sulfuro son superiores al intervalo de inhibición de 30-250 mg/L reportado en la literatura. Por lo que podemos afirmar que los microorganismos presentes en este estudio son altamente tolerantes al ion

sulfuro, presentando buenos rendimientos de metano incluso a una alta concentración del mismo.



*Figura 2. Relación entre la variación de la concentración del sulfuro en el efluente y el contenido de metano en el biogás para cada carga orgánica evaluada.*

Los resultados obtenidos respecto a la carga óptima en nuestro experimento se comparan favorablemente con respecto a otros estudios. Harada *et al.* [12] alcanzó un rendimiento de metano de  $0.29 \text{ m}^3/\text{Kg DQO}_{\text{rem}}$  en el tratamiento de una vinaza recalcitrante en un RANMAL operado a condiciones termofílicas; sin embargo, la remoción de DQO fue solamente 40%. Por otro lado, Kumar *et al.* [16] en un estudio sobre la biodegradación de vinazas en un reactor anaerobio híbrido (Filtro Anaerobio + RANMAL) alcanzó un rendimiento de metano de  $0.34 \text{ m}^3/\text{Kg DQO}_{\text{rem}}$  con una concentración de 66% en el biogás. Se puede observar que los rendimientos de los autores anteriormente mencionados se encuentran por debajo de  $0.40 \text{ m}^3/\text{Kg DQO}_{\text{rem}}$ , el cual fue alcanzado en este estudio, este alto rendimiento se atribuye a la retención de los sólidos presentes por medio del separador sólido-gas ubicado en la parte superior del RANMAL, lo que evita un lavado del reactor manteniendo de esta forma los microorganismos involucrados en la digestión anaerobia. El TRH empleado se encuentra en los valores superiores de los reportados por estudios previos [12, 14, 16]. Esto se debe a que las vinazas fueron alimentadas al RANMAL sin previa dilución, lo que hace que la carga orgánica sea elevada a bajos gastos introducidos

(L/día). Sin embargo, la introducción concentrada de las vinazas nos permite ahorrar en recursos hídricos, los cuales presentan un problema de escases en los últimos años.

### Caracterización del efluente obtenido a la carga óptima

La caracterización físico-química de las vinazas empleadas y el efluente obtenido después del tratamiento anaerobio a la carga óptima se encuentra en la Tabla 3, donde se puede observar que la mayoría de los parámetros evaluados presentaron un porcentaje de remoción. La concentración de nitrógeno amoniacal y sulfuro fueron los parámetros que presentaron un incremento, debido a que éstos provienen de la degradación del nitrógeno orgánico y sulfatos respectivamente, por lo que un incremento de éstos en el efluente era esperado.

*Tabla 3. Caracterización de vinaza y efluente a la carga orgánica óptima*

Parámetro	Vinaza <sup>a</sup>	Efluente <sup>a</sup>	Porcentaje de remoción <sup>b</sup>
pH	4.51	7.22	-
DQO	125,600	43,450	66
SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	5,433	0	100
S <sup>-</sup>	175	275	-
N <sub>T</sub>	1,377	1,160	16
N-NH <sub>3</sub>	113	230	-
N <sub>org</sub>	1,263	930	26
PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup>	147	117	21
K <sup>+</sup>	6,706	6,838	-
Etanol	19,901	232	99
Ácido acético	2,697	331	88
Ácido propiónico	3,009	2283	24
Ácido butírico	0	0	-

<sup>a</sup> Todos los valores en mg/L a excepción del pH

<sup>b</sup> El símbolo (-) corresponde a los parámetros que no presentan un porcentaje de remoción o no puede ser calculado

Una completa remoción de sulfatos se obtuvo en nuestro reactor. Kumar *et al.* [16], reportaron que al alcanzar una remoción de 80% del sulfato presente en vinazas de etanol hidratado, la concentración de sulfuro se elevó a 400 mg/L, lo cual, produjo inhibición de los microorganismos y como resultado una disminución en el rendimiento de metano. Sin embargo, en este estudio aunque la remoción de sulfatos fue del 100%, la cantidad de



sulfuro en el efluente fue 275 mg/L, sin tener un efecto negativo sobre los microorganismos y el rendimiento de metano. Por lo que, podemos concluir que el prototipo propuesto en este estudio para el tratamiento de vinazas de etanol hidratado, además de obtener un mayor rendimiento de metano presenta un efluente con características más amigables para el medio ambiente, el cuál puede ser evaluado para fertirriego de cultivos.

### Identificación Microbiana

Arqueas metanogénicas y bacterias presentes en el RANMAL fueron identificadas por la amplificación del gen ADN<sub>r</sub> 16S de las muestras colectadas cuando el reactor fue operado a la carga orgánica óptima. Dos órdenes de arqueas metanogénicas fueron encontrados: *Methanobacteriales* y *Methanosarcinales* (Figura 3.). Los grupos de bacterias detectados en este estudio fueron: Bacteria reductora de sulfato (SRB), subclases  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\delta$ -, and  $\gamma$ - de las Proteobacterias, bacteria gram positiva con bajo contenido en GC, *Bacillus* y *Clostridium*. Las bacterias gram positivas con alto contenido en GC estuvieron ausentes.

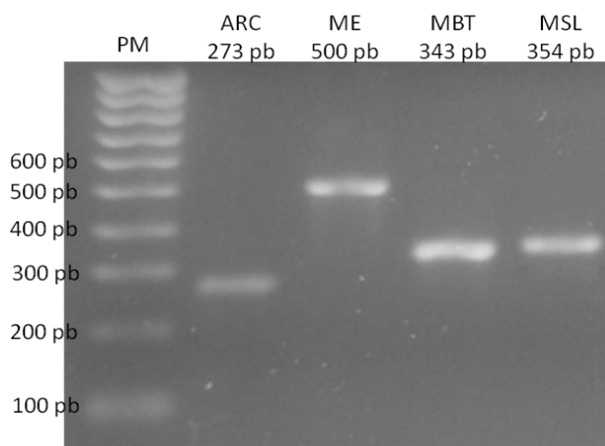


Figura 3. Detección del gen ADN<sub>r</sub> 16S de arqueas a la carga óptima del RANMAL. La longitud aproximada de los productos de PCR esperados se muestra en la parte superior del gel (en pares de bases). Carriles: PM, marcador de peso molecular (Bioline, 100–1000 pb); ARC, Dominio Archaea; ME, metanógenos; MBT, *Methanobacteriales*; MSL, *Methanosarcinales*

Los microorganismos encontrados en digestores anaerobios son muy diversos y pueden cambiar dependiendo del sustrato empleado y las condiciones de operación de los mismos. En el tratamiento anaerobio de aguas residuales ricas en sulfatos a condiciones mesofílicas,

se encontró que los géneros *Methanosaeta* y *Methanobacterium* son los microorganismos que favorecen la producción de metano [25, 26]. En este estudio como se mencionó anteriormente, se observó la amplificación de los genes ADNr 16S de los órdenes *Methanosarcinales* y *Methanobacteriales*, a los cuales corresponden las especies *Methanosaeta* y *Methanobacterium* respectivamente, por lo que sugiere la presencia de estas especies en el RANMAL, ya que las vinazas de este estudio eran ricas en sulfato con un valor promedio de  $5,336 \pm 806$  mg/L.

#### **4. Conclusiones**

El RANMAL modificado propuesto en este estudio proporcionó un tratamiento exitoso a vinazas obtenidas de la producción de etanol hidratado. La carga orgánica óptima fue 17.05 Kg DQO/m<sup>3</sup>día correspondiente a un TRH de 7.5 días y el rendimiento de metano fue 0.40 m<sup>3</sup>/Kg DQO<sub>rem</sub>, el cual fue mayor a los reportados en estudios previos. En la carga orgánica óptima arqueas metonogénicas pertenecientes a los órdenes *Methanobacteriales* y *Methanosarcinales* favorecieron la producción de metano.

#### **5. Agradecimientos**

Los autores agradecen el apoyo del CONACYT por la beca No. 224322 otorgada para la realización de éste proyecto.

#### **6. Referencias**

- [1] M. Krzywonos, E. Cibis, T. Miśkiewicz, C. Kent, *Bioresource Technology*, 99, 7816, (2008).
- [2] J. Beltran, J. Dominguez, E. Partido, *Water Science and Technology*, 51, 159, (2005).
- [3] A. Jiménez, R. Borja, A. Martín, F. Raposob, *Journal of Environmental Management*, 80, 303, (2006).
- [4] D. Pant, A. Adholeya, *Bioresource Technology*, 98, 2321, (2007).
- [5] M. Bustamante, C. Paredes, R. Moral, J. Moreno, A. Pérez, M. Pérez, *Water Science and Technology*, 51, 145, (2005).
- [6] F. Espinoza, C. Pelayo, J. Corona, Y. González, A. Bories, H. Gutiérrez, *Biomass and Bioenergy*, 33, 14, (2008).

- [7] V. Parnaudeau, N. Condom, R. Oliver, P. Cazeville, S. Recous, *Bioresource Technology*, 99, 1553, (2008).
- [8] R. Sowmeyan, G. Swaminathan, *Journal of Hazardous Materials*, 152, 453, (2008).
- [9] A. Wilkie, K. Riedesel, J. Owens, *Biomass and Bioenergy*, 19, 63, (2000).
- [10] G. Talbot, E. Topp, M.F. Palin, D.I. Massé, *Water Research*, 42, 513, (2008).
- [11] A. Bories, J. Raynal, *Biological Wastes*, 67, 251, (1988).
- [12] H. Harada, S. Uemura, A. Chen, J. Jayadevan, *Bioresource Technology*, 55, 215, (1996).
- [13] C. Cronin, K.V. Lo, *Bioresource Technology*, 64, 33, (1998).
- [14] J. Goodwin, J. Finlayson, E. Low, *Bioresource Technology*, 78, 155, (2001).
- [15] N. Uzal, C. Gokacay, G. Demirer, *Process Biochemistry*, 39, 279, (2003).
- [16] G. Kumar, S. Gupta, G. Singh, *Water Research*, 41, 721, (2007).
- [17] K. Bhavik, S. Mohana, D. Madamwar, *Bioresource Technology*, 99, 4621, (2008).
- [18] H.M. Poggi, R. Rodríguez, G. Fernández, F. Esparza, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 47, 284, (1997).
- [19] American Public Health Association/American Water Works Association/Water Environment Federation, *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*, 21, Washington DC, USA (2005).
- [20] N. Bauer, *Microbial Diversity Course. Marine Biological Laboratory*, Woods Hole, MA. (1996).
- [21] G. Hernández, J. Olmos, *Journal of Applied Microbiology*, 100, 664, (2006).
- [22] Y. Yu, C. Lee, J. Kim, S. Hwang, *Biotechnology and Bioengineering*, 89, 670, (2005).
- [23] Y. Chen, J.J. Cheng, K.S. Creamer, *Bioresource Technology*, 99, 4044, (2008).
- [24] D. Cirne, F. van der Zew, M. Fernández, F. Fernández, *Review in Environmental Science and Biotechnology*, 7, 93, (2008).
- [25] A. Sarti, E. Pozzi, F.A. Chinalia, A. Ono, E. Foresti, *Process Biochemistry*, 45, 164, (2010).
- [26] S. Oude, W. Vorstman, A. Sopjes, A. Stams, *FEMS Microbiology Ecology*, 27, 185, (1998).