



**INSTITUTO LATINOAMERICANO DE  
CIENCIAS DE LA VIDA Y LA NATURALEZA  
(ILACVN)**

**BIOTECNOLOGIA**

**POTENCIAL BIOQUÍMICO METANOGÉNICO DE AVENA Y EVALUACIÓN DE LA  
BIOAUMENTACIÓN UTILIZANDO UN CULTIVO MIXTO CON ENRIQUECIMIENTO DE SUELO  
ANTÁRTICO EN LA DIGESTIÓN ANAERÓBICA**

**PATRICIA YOLANDA ALDERETE ORTIGOZA**

Foz do Iguaçu  
2024



**INSTITUTO LATINOAMERICANO DE CIENCIAS DE  
LA VIDA Y LA NATURALEZA (ILACVN)**

**BIOTECNOLOGIA**

**POTENCIAL BIOQUÍMICO METANOGÉNICO DE AVENA Y EVALUACIÓN DE LA BIOAUMENTACIÓN  
UTILIZANDO UN CULTIVO MIXTO CON ENRIQUECIMIENTO DE SUELO ANTÁRTICO EN LA  
DIGESTIÓN ANAERÓBICA**

**PATRICIA YOLANDA ALDERETE ORTIGOZA**

Trabajo de conclusión de Curso presentado al Instituto Latinoamericano de Ciencias de la vida y de la Naturaleza de la Universidad Federal de Integración Latinoamericana, como requisito parcial para la obtención del título de Bacharel en Biotecnología.

Orientador: Prof. Dr. Michel Rodrigo Passarini

Foz do Iguaçu  
2024

PATRICIA YOLANDA ALDERETE ORTIGOZA

**POTENCIAL BIOQUÍMICO METANOGÉNICO DE AVENA Y EVALUACIÓN DE LA BIOAUMENTACIÓN  
UTILIZANDO UN CULTIVO MIXTO CON ENRIQUECIMIENTO DE SUELO ANTÁRTICO EN LA  
DIGESTIÓN ANAERÓBICA**

Trabajo de conclusión de Curso presentado al Instituto Latinoamericano de Ciencias de la vida y de la Naturaleza de la Universidad Federal de Integración Latinoamericana, como requisito parcial para la obtención del título de Bacharel en Biotecnología.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Orientador: Prof. Dr. Michel Rodrigo Passarini  
UNILA

---

Prof. Dra. Rafaella Costa Bonugli Santos  
UNILA

---

Ing. Me. Franciele Natividade Luiz  
CIBiogás

Foz do Iguaçu, \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_.

Catálogo elaborado pelo Setor de Tratamento da Informação  
Catálogo de Publicação na Fonte. UNILA - BIBLIOTECA LATINO-AMERICANA - PTI

A361p

Alderete Ortigoza, Patricia Yolanda.

Potencial bioquímico metanogénico de avena y evaluación de la bioaumentación utilizando un cultivo mixto con enriquecimiento de suelo antártico en la digestión anaeróbica / Patricia Yolanda Alderete Ortigoza.  
- Foz do Iguaçu, 2024.

64 fls.: il.

Universidade Federal da Integração Latino-Americana, Instituto Latino-Americano de Ciências da Vida e da Natureza (ILACVN), Graduação.

Orientador: Michel Rodrigo Zambrano Passarini.

1. Biocombustíveis. 2. Biogás. 3. Antártica, Península. I. Passarini, Michel Rodrigo Zambrano. II. Título.

CDU 620.95

## AGRADECIMIENTOS

En primer lugar agradezco a la persona más esencial en mi vida, mi madre Yolanda Ortigoza, por darme todo su amor, por alentarme a perseguir mis sueños dándome todo su apoyo incondicional sin importar la distancia en la que estos sueños se encuentren. Gracias madre por nunca soltarme en este camino y ser mi puerto seguro a quién pude y puedo acudir siempre con mis pesares y mis alegrías. También agradezco a mis hermanos Walter Alderete, Diego Alderete, Gustavo Alderete, a mi padre Ramón Alderete y a mi prima Amalia Acosta porque fueron partícipes de esta trayectoria.

Agradezco a todas las personas que fueron parte de esta etapa, en especial, a Santiago Marsiglia por los años de convívio como familia compartiendo hogar y diálogos constructivos, a Ana Caroline de Lima, Vitória Guerra, Julia Beatriz dos Santos y Matheus Araújo, amigos del curso de biotecnología que estuvieron presentes desde el inicio de la carrera, compartiendo conmigo experiencias lindas, constructivas y gratificantes e hicieron que este camino sea más leve y bonita con su amistad. Agradezco también de manera especial, a Eliane Alves, por brindarme su amistad, su atención, compartir conmigo momentos especiales y diálogos positivos que me hacen sentir acogida y valorada como persona. También agradezco a Victoria Marsiglia por los años de convívio compartiendo hogar y los variados diálogos, a Alex Colmenarez, Alejandro Colmenarez, Gabriel Neuman y Ana Julia por las experiencias divertidas y alegres compartidas.

Agradezco al CIBiogás, por permitirme realizar la pasantía de la carrera en el laboratorio de biogás. A Franciele Natividade por apoyarme y permitir la realización de este trabajo en las instalaciones del laboratorio de biogás. Una vez más, agradecer a Ana Caroline de Lima y a Giovanna Ghellere y Rafaela Meyer por la ayuda en la ejecución de este trabajo.

Agradezco a mi orientador, Dr. Michel Passarini, por el apoyo para la realización de este trabajo y la paciencia.

A la Universidad Federal de Integración Latino-Americana, agradezco por ser mi *alma mater* y mi casa durante todos estos años, por la oportunidad de conocer a muchas personas de diferentes culturas que me enseñaron mucho, por la oportunidad de adquirir un diploma en una institución fuera de mi país natal y abrirme un camino de muchas posibilidades.

Por último, extendiendo mi agradecimiento a todos aquellos que con orgullo

puedo decir fueron mis profesores, por todos los conocimientos compartidos con paciencia, por ser una inspiración por su trayectoria y capacidad, y por acompañarme en mi formación académica.

*“En algún lugar, algo increíble está esperando a ser  
descubierto”*

**Carl Sagan**

## RESUMEN

La crisis energética, consecuencia de la actividad humana, ha provocado un gran impacto en el medio ambiente. Esto a su vez, no ha pasado por desapercibido y ha incentivado a los investigadores a desarrollar otras fuentes de energía alternativas para poder contar con una amplia variedad de energías limpias, sostenibles y renovables que puedan reemplazar a los combustibles fósiles y así reducir el impacto al medio ambiente. El biogás es una de las fuentes de energía ecoamigable que puede ser producida a partir de la digestión de residuos, sea este residuo agrícola, residuo de industria láctea o residuos sólidos de desechos municipales y está compuesto principalmente por metano ( $\text{CH}_4$ ) y dióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ). El metano es producido biológicamente por microorganismos metanogénicos. La producción de biogás a partir de residuos agrícolas ricos en lignocelulosa es un proceso que sucede de manera lenta pero constante, donde el metano es originado principalmente a partir de la degradación de hemicelulosa y celulosa. Este trabajo tiene como objetivo el estudio del potencial de producción de biogás y metano de la avena, un material lignocelulósico con buen porcentaje de material orgánico biodegradable. Además, con el intuito de mejorar la degradación anaeróbica de material lignocelulósico y aumentar la producción de biogás y metano, fueron analizadas separadamente un ensayo conteniendo la muestra de avena individual (AI) con inóculo y un segundo ensayo conteniendo avena con inóculo y la adición de un cultivo mixto (CM) a base de extracto de suelo enriquecido (ESE), para la evaluación de los efectos de este ESE sobre la digestión anaeróbica de la avena. El ESE es realizado a partir de suelo Antártico con potencial metanogénico.

El ensayo de Potencial Bioquímico de Metano (PBM) fue realizado en el Laboratorio de Biogás del Centro Internacional de Energías Renovables - Biogás (CIBiogás). Los resultados indican que la avena es un material con un potencial de biodegradabilidad relativamente buena, presentando valores promedio de producción de biogás de  $595 \text{ LN /kg SV}^{-1}$  en el ensayo de AI con inóculo y  $561 \text{ LN /kg SV}^{-1}$  en el ensayo de avena con inóculo más CM a base de ESE. Sin embargo, este último presentó mayor contenido de metano, siendo este 4% más que el resultado obtenido en el ensayo de AI con inóculo.

Los resultados demuestran que la técnica de bioaugmentación puede ser provechosa para el mejoramiento de la digestión anaeróbica de materiales lignocelulósicos, sin embargo, se necesitan todavía muchos estudios para la comprensión del complejo proceso de digestión anaeróbica.

**Palabras clave:** biocombustibles; biogás; avena; bioaugmentación; lignocelulosa; PBM; suelo Antártico.

## ABSTRACT

The energy crisis, a consequence of human activity, has caused a great impact on the environment. This, in turn, has not gone unnoticed and has encouraged researchers to develop other alternative energy sources in order to have a wide variety of clean, sustainable and renewable energies that can replace fossil fuels and thus reduce the impact on the environment. Biogas is one of the sources of eco-friendly energy that can be produced from the digestion of waste, be it agricultural waste, dairy industry waste or solid waste from municipal waste, and is mainly composed of methane (CH<sub>4</sub>) and carbon dioxide (CO<sub>2</sub>). Methane is produced biologically by methanogenic microorganisms. The production of biogas from agricultural waste rich in lignocellulose is a process that happens slowly but constantly, where methane is generated mainly from the degradation of hemicellulose and cellulose. This work aims to study the biogas and methane production potential of oats, a lignocellulosic material with a good percentage of biodegradable organic material. Furthermore, with the aim of improving the anaerobic degradation of lignocellulosic material and increasing the production of biogas and methane, a trial containing the individual oat sample (AI) with inoculum and a second trial containing oats with inoculum and the addition of a mixed culture (CM) based on enriched soil extract (ESE), for the evaluation of the effects of this ESE on the anaerobic digestion of oats. The ESE is carried out from Antarctic soil with methanogenic potential.

The Biochemical Potential of Methane (PBM) test was carried out in the Biogas Laboratory of the International Center for Renewable Energies - Biogas (CIBiogás). The results indicate that oats are a material with relatively good biodegradability potential, presenting average biogas production values of 595 LN /kg SV<sup>-1</sup> in the AI test with inoculum and 561 LN /kg SV<sup>-1</sup> in the of oats with inoculum plus CM based on ESE. However, the latter presented a higher methane content, this being 4% more than the result obtained in the AI test with inoculum.

The results demonstrate that the bioaugmentation technique can be beneficial for improving the anaerobic digestion of lignocellulosic materials, however, many studies are still needed to understand the complex anaerobic digestion process.

**Key words:** biofuels; biogas; oat; bioaugmentation; lignocellulose; BMP; Antarctic soil.

## LISTA DE ILUSTRACIONES

### FIGURAS

<b>Figura 1</b> - Fases de la digestión anaeróbica de materiales orgánicos.....	17
<b>Figura 2</b> - Mapa y ubicación de la Isla Deception.....	34
<b>Figura 3</b> - Cultivo microbiológico m1 y m2 con 3 y 6 días de incubación.....	38
<b>Figura 4</b> - Reactor anaeróbico para cultivo de inóculo.....	40
<b>Figura 5</b> - a) Sistema de digestión anaeróbica instalada; b) Lectura de gases; c) equipamiento lector de gases.....	42

### TABLAS

<b>Tabla 1:</b> Composición media de la mezcla gaseosa del biogás.....	14
<b>Tabla 2:</b> Países con mayor tasa de generación eléctrica por biogás.....	15
<b>Tabla 3:</b> Valores de masas utilizadas en el ensayo de PBM.....	44
<b>Tabla 4:</b> Caracterización de Sólidos Totales, Volátiles y Fijos.....	46
<b>Tabla 5:</b> Resultados de los ensayos de PBM.....	50

### GRÁFICOS

<b>Gráfico 1:</b> Gráfico de abundancia relativa de grupos taxonómicos (orden, familia y género) de arqueas metanogénicas en lagos de la Isla Rey Jorge. El tamaño de los círculos corresponde al porcentaje de abundancia relativa.....	30
<b>Gráfico 2:</b> Promedio de la producción acumulada de biogás del control positivo.....	49
<b>Gráfico 3:</b> Promedio de producción acumulada de biogás en el ensayo de PBM.....	51

### ECUACIONES

<b>Ecuación (1)</b> Reacción general de la metanogénesis resumida.....	16
<b>Ecuación (2)</b> Reacción química de degradación de carbohidratos.....	16
<b>Ecuación (3)</b> Reacción química de degradación de lípidos.....	16
<b>Ecuación (4)</b> Reacción química de degradación de proteínas.....	17
<b>Ecuación (5)</b> Cálculo de valor de ST.....	36
<b>Ecuación (6)</b> Cálculo de valor de SF.....	37
<b>Ecuación (7)</b> Cálculo de valor de SV.....	37

<b>Ecuación (8)</b> Cálculo de relación S/l.....	42
<b>Ecuación (9)</b> Cálculo de masa de sustrato.....	43

## LISTA DE ABREVIACIONES Y SIGLAS

<b>ABNT</b> - Asociación Brasileira de Normas Técnicas
<b>A+ESE</b> - Avena + Extracto de Suelo Enriquecido
<b>AGV</b> - Ácidos Grasos Volátiles
<b>AP</b> - Alcalinidad Parcial
<b>AT</b> - Alcalinidad Total
<b>AI</b> - Avena Individual
<b>APHA</b> - American Public Health Association
<b>BMP</b> - <i>Biochemical Methane Potencial</i>
<b>C</b> - Carbono
<b>CaCO<sub>3</sub></b> - Carbonato de Calcio
<b>CH<sub>4</sub></b> - Metano
<b>CIBiogás</b> - Centro Internacional de Energías Renovables - Biogás
<b>C/N</b> - Carbono/Nitrógeno
<b>CNTP</b> - Condiciones Normales de Temperatura y Presión
<b>CO<sub>2</sub></b> - Dióxido de Carbono
<b>DA</b> - Digestión anaeróbica
<b>DQO</b> - Demanda Química de Oxígeno
<b>ESE</b> - Extracto de Suelo Enriquecido
<b>H<sub>2</sub></b> - Hidrógeno
<b>H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub></b> - Ácido Sulfúrico
<b>ILACVN</b> - Instituto Latino-Americano de Ciencias de la Vida y la Naturaleza
<b>ISO/IEC</b> - <i>International Organization for Standardisation/International Electrotechnical Commission</i>
<b>LN.Kg/ SV<sup>-1</sup></b> - Litros Normalizados por Kilogramo de Sólidos Volátiles
<b>NB</b> - Nutrient Broth
<b>N</b> - Nitrógeno
<b>PBM</b> - Potencial Bioquímico Metanogénico
<b>pH</b> - Potencial Hidrogénico
<b>S/I</b> - Sustrato/Inóculo

**SF** - Sólidos Fijos

**SSV** - Sólidos Suspendidos Volátiles

**ST** - Sólidos Totales

**SV** - Sólidos Volátiles

**UNILA** - Universidad Federal de Integración Latino-Americana

**USDA** - *United States Department of Agriculture*

**VDI** - *Verein Deutscher Ingenieure*

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>12</b>
<b>2. FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA</b> .....	<b>13</b>
2.1 BIOGÁS.....	13
2.2 DIGESTIÓN ANAERÓBICA.....	15
2.2.1 Vías Metabólicas De Digestión Anaeróbica.....	18
2.2.1.1 Hidrólisis.....	18
2.2.1.2 Acidogénesis.....	18
2.2.1.3 Acetogénesis.....	19
2.2.1.4 Metanogénesis.....	19
2.2.2 Factores Que Pueden Afectar La Digestión Anaeróbica.....	21
2.2.2.1 Temperatura.....	21
2.2.2.2 pH.....	22
2.2.2.3 Alcalinidad.....	22
2.2.2.4 Ácidos orgánicos volátiles.....	23
2.2.2.5 Nutrientes y relación C/N.....	24
2.2.2.6 Mezclado.....	24
2.3 ENSAYO DE POTENCIAL BIOQUÍMICO METANOGENICO (PBM).....	25
2.4 Avena.....	27
2.5 BIOAUMENTACIÓN.....	28
2.6 EFECTOS DEL CAMBIO CLIMÁTICO EN AMBIENTES FRÍOS.....	28
2.7 COMUNIDADES DE MICROORGANISMOS METANOGENICOS EN AMBIENTES FRÍOS.....	29
<b>3. OBJETIVOS</b> .....	<b>32</b>
3.1 OBJETIVO GENERAL.....	32
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	32
<b>4. METODOLOGÍA</b> .....	<b>33</b>
4.1 MUESTRA DE SUELO ANTÁRTICO.....	33
4.2 COLECTA DE LA MUESTRA DE LA AVENA.....	34
4.3 CARACTERIZACIÓN DE LA AVENA.....	35
4.3.1 Sólidos Totales (ST).....	35
4.3.2 Sólidos Fijos (SF) y Sólidos Volátiles (SV).....	36

4.4 PREPARO DE CULTIVO MIXTO CON ENRIQUECIMIENTO DE SUELO ANTÁRTICO.....	37
4.5 INÓCULO.....	39
4.6 ENSAYO DE POTENCIAL BIOQUÍMICO METANOGENICO (PBM).....	40
4.6.1 Equipamiento de Fermentación Anaeróbico.....	40
<b>5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>46</b>
5.1 ANÁLISIS FÍSICOQUÍMICAS.....	46
5.2 POTENCIAL BIOQUÍMICO METANOGENICO (PBM).....	48
5.2.1 Control Positivo.....	48
5.2.2 Comparación de Datos y Evaluación de Técnica de Bioaumentación con Cultivo Mixto de Permafrost.....	49
<b>6. CONSIDERACIONES FINALES.....</b>	<b>53</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>55</b>

## 1. INTRODUCCIÓN

La tierra se ha enfrentado a muchos eventos y cambios desde su formación, pero en esta era, la tierra se enfrenta a un desarrollo y un crecimiento humano sin comparación que no discrimina elementos ambientales a la hora de llevar a cabo diferentes actividades humanas (OBAIDEEN et al., 2022). La crisis energética, consecuencia de la actividad humana, ha provocado un gran impacto en el medio ambiente. Esto a su vez, no ha pasado por desapercibido y ha incentivado a los investigadores a desarrollar otras fuentes de energía alternativas para poder contar con una amplia variedad de energías limpias, sostenibles y renovables que puedan reemplazar a los combustibles fósiles y así reducir el impacto al medio ambiente (SEQUEDA BARROS et al., 2023; OBAIDEEN et al., 2022; SAYED et al., 2021; RABAIA et al., 2021). A consecuencia de esto, luego de muchos años de estudios y acciones industriales, una de las opiniones muy comunes acerca de la producción de energías verdes es la de su producción a partir de la conversión de residuos en energía, ya que su viabilidad reside en varios aspectos beneficiosos (OBAIDEEN et al., 2022; LI et al., 2019; SALILIH et al., 2021; HAO et al., 2020; OLABI et al., 2021). La conversión de residuos en energía puede ser vista como una alternativa para sustituir a los combustibles fósiles por tener características que la pueden encajar en la categoría de fuente de energía semirrenovable y poder aprovecharse de diferentes maneras (OBAIDEEN et al., 2022; ELSAID et al., 2020).

El biogás es una de las fuentes de energía que puede ser producida a partir de la digestión de residuos, sea este residuo agrícola, residuo de industria láctea o residuos sólidos de desechos municipales. El proceso de digestión consiste en la degradación de compuestos orgánicos y la conversión a biogás que es compuesto principalmente por metano ( $\text{CH}_4$ ) y dióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ) (OBAIDEEN et al., 2022; AKKARAWATKHOOSITH et al., 2019; MISHRA et al., 2021). La producción de biogás a partir de residuos agrícolas ricos en lignocelulosa es un proceso que sucede de manera lenta pero constante, donde el metano es originado principalmente a partir de la degradación de hemicelulosa y celulosa (KUSCH et al., 2011; BANIK, 2004).

Por lo tanto, la avena es un sustrato lignocelulósico, rica en celulosa, hemicelulosa y lignina. Posee una estructura compleja y de difícil degradación. Existen varios factores que pueden representar una resistencia de la avena a la hidrólisis

enzimática, como la cristalinidad de la celulosa, el área de superficie accesible, la barrera de lignina y la presencia de un revestimiento de hemicelulosa en la celulosa (KUSCH et al., 2011; MOSIER et al., 2005). Considerando estos aspectos limitantes para la digestión anaeróbica de la avena, con la intención de mejorar la producción de biogás y metano específicamente, el presente estudio propone la adición de un extracto de suelo enriquecido (ESE) proveniente de una colina con el suelo en proceso de deshielo de la Isla Deception, Whalers Bay, Antártica.

Un estudio realizado por MACHÍN OLIVERA (2022), indica que los sedimentos de algunos lagos de la Antártica son ricos en diversidad de microorganismos metanogénicos capaces de degradar una gran variedad de sustratos y adaptarse a diferentes variaciones de temperatura. Por lo tanto, este estudio podría aportar en el análisis de viabilidad económica de la bioaumentación con ESE en procesos de digestión anaeróbica, como también contribuir con la literatura referente al estudio de digestión anaeróbica de la avena y la diversidad de microorganismos metanogénicos de ambientes fríos.

## **2. FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA**

### **2.1 BIOGÁS**

El proceso de digestión anaeróbica (DA) de residuos orgánicos produce la bioenergía que llamamos biogás, que está compuesto principalmente de metano ( $\text{CH}_4$ ) y dióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ) (OBAIDEEN et al., 2022; AKKARAWATKHOOSITH et al., 2019; MISHRA *et al.*, 2021). En este proceso de DA los microorganismos presentes en un medio con condiciones anaeróbicas, realizan la descomposición o digestión del material orgánico al que tienen acceso y disponen en moléculas más pequeñas, entre ellos la variedad de gases que componen el biogás (OBAIDEEN et al., 2022). Esta bioenergía puede ser aprovechada como combustible para diferentes finalidades, como calor y energía. Cuando aislado y purificado el metano en un porcentaje mayor que 95% puede utilizarse como combustible para vehículos o para inyectar a una red de gas (OBAIDEEN et al., 2022; SCARLAT et al., 2018; PRUSSI et al., 2019). En su composición, el biogás tiene además de metano y dióxido de carbono cantidades menores de nitrógeno y

oxígeno que representan niveles en torno a 0 y 10 %v, como también pequeñas cantidades en niveles de partes por millón/billón en términos de volumen (ppmv-ppbv) de compuestos de azufre como sulfuro de hidrógeno ( $H_2S$ ), mercaptanos y otros sulfuros, compuestos de silicio, compuestos halogenados, amoníaco y otros compuestos volátiles (CALBRY-MUZYKA et al., 2022). A continuación, en la **Tabla 1** puede ser observada la composición media de la mezcla de gases presente en el biogás.

**Tabla 1:** Composición media de la mezcla gaseosa del biogás.

<b>Gases</b>	<b>Intervalo (%)</b>
Metano ( $CH_4$ )	40 - 75
Dióxido de Carbono ( $CO_2$ )	25 - 40
Oxígeno ( $O_2$ )	0,1 - 1
Nitrógeno ( $N_2$ )	0,5 - 2,5
Hidrógeno ( $H_2$ )	1 - 3
Sulfuro de Hidrógeno ( $H_2S$ )	0,1 - 0,5
Monóxido de Carbono ( $CO$ )	0 - 0,1
Amoníaco ( $NH_3$ )	0,1 - 0,5

Fuente: Adaptado de SANTIAGO; SANTIAGO, 2019.

El biogás puede utilizarse como una fuente de energía para abastecer comunidades remotas donde la red de energía eléctrica convencional no llega, y así también para la descentralización de la red (CUÉLLAR; WEBBER, 2008). Otros puntos que hacen del biogás una fuente viable son, asegurar una reducción de sustancias contaminantes de los recursos hídricos y del agua, la preservación de la vegetación y las fuentes de energía amigables con el medio ambiente (OBAIDEEN et al., 2022). El aumento del número de plantas de biogás viene favoreciendo la seguridad de los depósitos de residuos y la necesidad de materias primas alternativas (LALLEMENT et al., 2023). Según IRENA (2021), el 73,8% de las plantas de producción de energía eléctrica con biogás están distribuidas en 7 países (Alemania, EUA, Reino Unido, Italia, China, Francia y Brasil que corresponde a un 2,1% de la capacidad instalada en el mundo. En la

**Tabla 2** son nombrados los países con mayor tasa de generación eléctrica por biogás y la capacidad por megawatts (MW) de cada uno.

**Tabla 2:** Países con mayor tasa de generación eléctrica por biogás.

<b>País</b>	<b>Capacidad (MW)</b>
Alemania	7.459,00
EUA	2.291,00
Reino Unido	1.858,00
Italia	1.432,00
China	903,30
Turquía	748,00
Tailandia	554,90
Francia	511,00
Brasil	<b>417,20</b>
República Checa	368,00

Fuente: Adaptado de IRENA, 2021

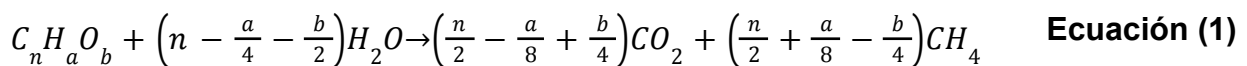
## 2.2 DIGESTIÓN ANAERÓBICA (DA)

La digestión anaeróbica es un proceso de fermentación microbiana que sucede en ausencia de oxígeno y cuyo producto es la mezcla de gases denominada biogás y una suspensión o lodo compuesto de los microorganismos encargados de la degradación de la materia orgánica. La materia prima a ser tratada puede ser cualquier biomasa residual con alto contenido de humedad, como residuos de alimentos, residuos forestales, residuos municipales, residuos agrícolas e industriales. En este proceso más del 90% de la energía por oxidación directa es transformada en metano, siendo usado por las bacterias apenas un 10 % de la energía para su crecimiento además de un 50% gastado en el proceso anaerobio (LORENZO; ABREU, 2005).

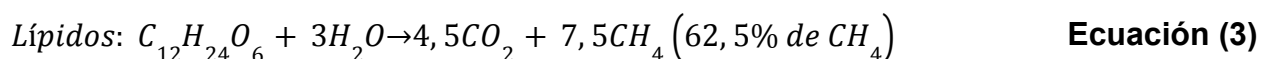
El proceso anaeróbico puede ser clasificado de dos maneras dependiendo del tipo de aceptor de electrones, como fermentación anaeróbica, donde la

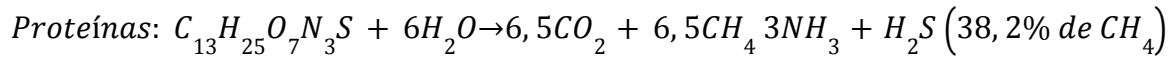
materia orgánica es catabolizada por bacterias anaeróbicas estrictas o facultativas mediante un balance de reacciones de óxido-reducción, bajo condiciones de oscuridad sin la presencia de un aceptor de electrones inorgánicos, y la respiración anaeróbica que a diferencia del anterior mencionado si requiere de aceptores de electrones inorgánicos para la disposición de los electrones que son liberados durante el proceso de degradación de la biomasa orgánica, estos aceptores pueden ser el dióxido de carbono, sulfato o nitrato. Cuando el dióxido de carbono acepta los electrones liberados durante la degradación de la materia orgánica, este se reduce a metano ( $CH_4$ ) y la producción de metano por esta vía es llamada metanogénesis hidrogenotrófica. Es en la fermentación anaeróbica donde se produce la mayor parte de la formación de metano, donde el responsable de actuar como un dador y aceptor de electrones a la vez es el acetato y este proceso de producción de metano por esta vía es denominada metanogénesis acetotrófica o acetoclástica (ANGELIDAKI et al., 2011; KHANAL, 2008; BRES, 2019). La reacción general de la metanogénesis puede ser resumida en una ecuación estequiométrica, esta ecuación puede ser observada en la **Ecuación 1** presentada a continuación.

Reacción general de la metanogénesis resumida en una ecuación estequiométrica (ANGELIDAKI et al., 2011; BRES, 2019):



Los residuos orgánicos son compuestos complejos no solubles y pueden ser clasificados como carbohidratos, lípidos y proteínas (BRES, 2019). A seguir en las **Ecuaciones 2, 3 y 4** pueden ser observadas las reacciones químicas de degradación de carbohidratos, lípidos y proteínas, con sus porcentajes de producción de metano durante el proceso en un reactor anaeróbico (LEI, 2018; BRES, 2019):

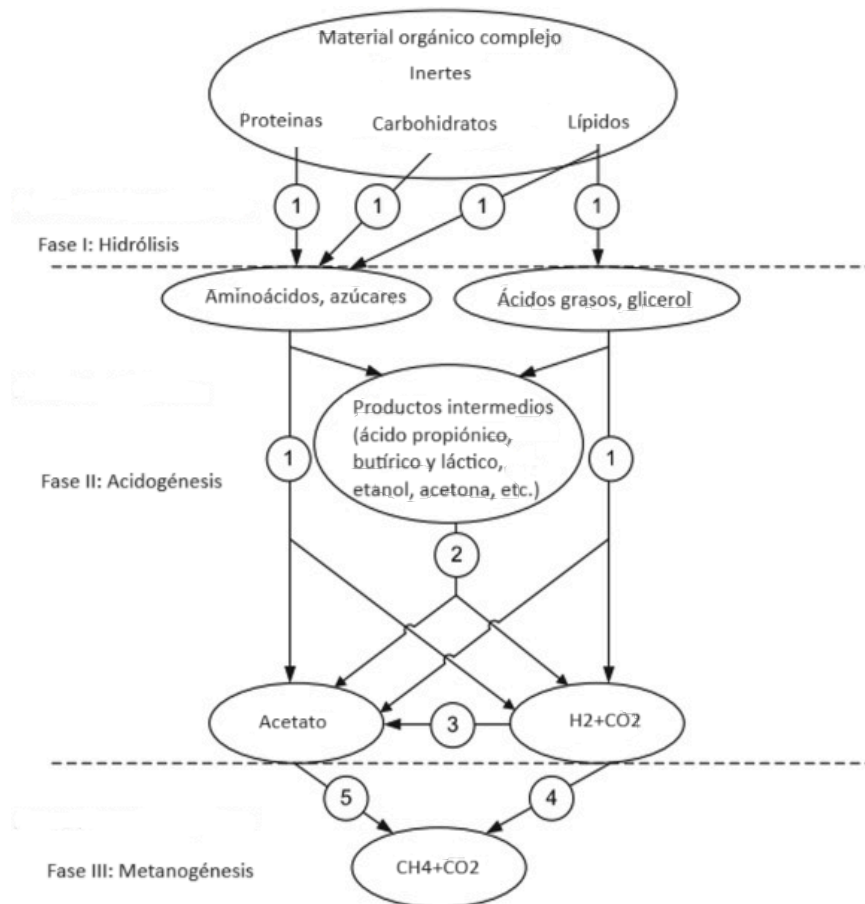




#### Ecuación(4)

Estas reacciones son de naturaleza compleja y ocurren en varias etapas de manera combinada y cooperada gracias a tres comunidades de microorganismos, las bacterias fermentativas primarias responsables por la hidrólisis y la acidogénesis, las bacterias oxidantes anaeróbicas responsables por la acetogénesis y las arqueas metanogénicas. La **Figura 1** representa de manera resumida el proceso de DA, con los sustratos claves en cada fase. El proceso anaeróbico sucede de manera perfectamente equilibrada cuando las velocidades de reacción están balanceadas, debido a que el producto de una de las etapas es el componente clave para el inicio de la siguiente etapa (BRES, 2019).

**Figura 1:** Fases de la digestión anaeróbica de materiales orgánicos.



Fuente: Adaptado de ACHINAS et al., 2018.

## 2.2.1 Vías Metabólicas De Digestión Anaeróbica.

### 2.2.1.1 Hidrólisis

La hidrólisis es un proceso clave el cual se encarga de romper las uniones químicas de los polímeros complejos presentes en los compuestos orgánicos para que los microorganismos puedan acceder a estos. Este proceso es realizado por bacterias hidrolíticas que producen enzimas extracelulares que rompen las estructuras complejas de carbohidratos, lípidos y proteínas y las disponibiliza en unidades pequeñas como monosacáridos, ácidos de cadena larga y aminoácidos respectivamente (MEEGODA et al., 2018; BRES, 2019). Estas unidades pequeñas funcionan como un sustrato para el inicio de la siguiente etapa de la digestión anaerobia, donde los monosacáridos, ácidos de cadena larga y aminoácidos se difunden a través de la membrana celular de las bacterias acidogénicas e inicia el proceso de acidogénesis. Sin embargo, biomasas como la lignina, celulosa y hemicelulosa son compuestos con estructuras rígidas de difícil degradación por lo que muchas veces la etapa de la hidrólisis puede ser el paso limitante de la digestión anaeróbica. En este contexto los estudios con cultivos puros o cultivos mixtos con la intención de encontrar un cultivo con capacidad de producir enzimas hidrolíticas que puedan incrementar la hidrólisis de biomasas lignocelulósicas, resulta necesaria para la optimización de la digestión anaeróbica y posible aumento de la producción de biogás.

### 2.2.1.2 Acidogénesis

Bacterias facultativas y anaeróbicas degradan los productos generados durante la hidrólisis por medio de procesos fermentativos (BRES, 2019). Estos productos degradados atraviesan la membrana celular de bacterias acidogénicas por medio de absorción para que se produzcan moléculas de ácidos grasos volátiles (AGV) (acetato, propionato y butirato) y otros como compuestos sulfurados y nitrogenados (ANGELAKI et al., 2011; MEEGODA et al., 2018; BRES, 2019).

La acidogénesis es considerada la vía más rápida, debido a que las bacterias pueden regenerarse en un periodo de tiempo relativamente corto, lo que puede en algunos casos causar la acidificación del sistema y posterior interrupción del proceso anaeróbico (DEUBLEIN; STEINHAUSER, 2011; MEEGODA et al., 2018; BRES, 2019).

Las bacterias acidogénicas utilizan como sustrato monosacáridos y aminoácidos y dependiendo del sustrato y condiciones ambientales en el digestor, estos determinan el producto final de las bacterias acidogénicas que pueden ser las siguientes moléculas: etanol, butirato, lactato, propionato y el amoníaco. Este último es formado a través de materiales orgánicos ricos en proteínas que son transformados en aminoácidos para ser aprovechados por las bacterias acidogénicas y así producir el amoníaco. El acetato,  $\text{CO}_2$  y  $\text{H}_2$ , que son los principales sustratos para la metanogénesis, son formados nada más en condiciones bajas de presión parcial de hidrógeno, lo que indica una vez más que este proceso depende de una regulación para que las reacciones bioquímicas sean termodinámicamente favorables (KHANAL, 2008; BRES, 2019). Cuando existe una regulación del  $\text{H}_2$ , se forman aproximadamente 51% de acetato, 19% de  $\text{H}_2/\text{CO}_2$  y 30% de productos reducidos, como ácidos grasos volátiles (AGV), alcoholes o lactato (BRES, 2019).

#### 2.2.1.3 Acetogénesis

En esta fase, el acetato es sintetizado por medio de la reducción de  $\text{CO}_2$  y de la degradación de ácidos orgánicos como el butirato y propionato y alcoholes como el etanol, que son producidos en la fase acidogénesis. En la formación del acetato, dos grupos grandes de bacterias (las acetogénicas consumidoras de  $\text{H}_2$  conocidas como homoacetogénicas y las acetogénicas productoras de  $\text{H}_2$ ) son las encargadas de esta fase. Las homoacetogénicas y las metanogénicas compiten por  $\text{H}_2$ , formiato y metanol que utilizan como sustrato. Mientras que las acetogénicas productoras de  $\text{H}_2$ , utilizan iones de hidrógeno y  $\text{CO}_2$  como aceptores de electrones para la oxidación de moléculas de ácidos orgánicos y consecuentemente producir  $\text{H}_2$  y acetato que son utilizados por las metanogénicas como sustrato (ANGELIDAKI et al., 2011; DIVYA et al., 2015; BRES, 2019). La presencia de microorganismos productoras y consumidoras de  $\text{H}_2$  en el medio es indispensable para el completo equilibrio de la digestión anaeróbica, esta relación es llamada de relación sintrófica (MEEGODA et al., 2018; ANGELIDAKI et al., 2011; BRES, 2019).

#### 2.2.1.4 Metanogénesis

La fase final de la digestión anaeróbica es la metanogénesis, que es realizada por los microorganismos metanogénicos, un grupo de arqueas anaeróbicas estrictas que producen metano utilizando los productos intermediarios de tres formas diferentes: a través del consumo de acetato por las bacterias acetoclásticas (metanogénesis acetoclástica), a través del consumo de  $H_2$  y  $CO_2$  por bacterias hidrogenotróficas (metanogénesis hidrogenotróficas) y a través del consumo de compuestos metilados por bacterias metilotróficas (metanogénesis metilotróficas) (ANGELIDAKI et al., 2011; BHARATHIRAJA et al., 2016; BRES, 2019).

Aproximadamente 70% del total de metano producido es mediado por el acetato, lo que lo hace la fuente más importante para la producción de metano (ANGELIDAKI et al., 2011). Sin embargo, uno de los factores más importantes que pueden influir en la composición de la comunidad metanogénica y la vía de formación de metano es la concentración de amoníaco en el digestor. En un estudio se demostró, que un 75% del metano producido por la vía hidrogenotrófica, es debido a la alta concentración de nitrógeno amoniacal en los digestores, mientras que en concentraciones bajas de nitrógeno amoniacal solo entre 9 y 23 % del metano es producto de esta vía (JIANG et al., 2018). Por una parte, el nitrógeno amoniacal es clave y se necesita una cierta concentración de nitrógeno amoniacal total (TAN) para un crecimiento microbiano óptimo, además de contribuir con el aumento de capacidad de tampón del medio y con la estabilidad del pH (MAO et al., 2015 ;BATSTONE et al., 2002; BANKS et al., 2011). Por otra parte estudios han descrito que concentraciones que sobrepasan los 1000-1500 mg de TAN-N.L<sup>-1</sup> en algunas ocasiones han sido la causa principal del colapso del sistema de digestión anaeróbica a consecuencia de la inhibición del nitrógeno amoniacal libre (NH<sub>3</sub>) (RAJAGOPAL et al., 2013; CHEN et al., 2008). Sin embargo, no existen concentraciones límites de inhibición que puedan ser aplicadas de manera universal para la inhibición de nitrógeno amoniacal libre ya que la capacidad de adaptación de una comunidad microbiana a la inhibición puede ser influenciada por varios factores (CAPSON-TOJO et al., 2020).

La fase de metanogénesis puede ser una etapa limitante del proceso debido a que generalmente las metanogénicas crecen de manera lenta, además de ser las más sensibles ante factores como cambios de pH o presencia de compuestos tóxicos o contaminantes. El grupo de microorganismos metanogénicos cumple el papel fundamental para la producción del metano, por lo que la inhibición de estas puede afectar gravemente el proceso completo (SCHNURER; JARVIS, 2010).

## 2.2.2 Factores Que Pueden Afectar La Digestión Anaeróbica

Como visto anteriormente, la digestión anaeróbica es realizada gracias a un consorcio de microorganismos que actúan sincronizadamente en cada fase y vías metabólicas del proceso. Para que cada grupo de microorganismos responsables de la digestión anaeróbica pueda crecer y actuar en las reacciones de degradación, deben existir condiciones ambientales y operativas favorables para estos. Los factores ambientales y operativos que influyen en el proceso anaeróbico son (BRES, 2019):

### 2.2.2.1 Temperatura

Los grupos de microorganismos presentes en la digestión anaeróbica son muy sensibles a los cambios de temperatura, por lo que puede afectar la degradación de los materiales orgánicos y consecuentemente la generación de metano (BRES, 2019). Si la temperatura disminuye en el sistema, puede causar la disminución en la producción de ácidos grasos volátiles, en la concentración de nitrógeno amoniacal, en la tasa de aprovechamiento del sustrato y en la actividad metabólica de los microorganismos, lo que conduce a una disminución del rendimiento de biogás. Mientras que, el aumento de la temperatura conduce a un aumento del pH, de la hidrólisis y del potencial de metano (MAO et al., 2015).

Las tasas de conversión de materia orgánica son mayores a temperaturas entre 35-40 °C para condiciones mesofílicas y a 55 °C para condiciones termofílicas (BRES, 2019). Sin embargo, cuando son tratados materiales orgánicos ricos en compuestos nitrogenados (como estiércoles de ciertos animales, residuos de matadero o residuos de alimentos), la degradación anaeróbica en condiciones termofílicas incrementa la concentración de nitrógeno amoniacal en el medio, lo que puede causar la inhibición microbiana (CHEN et al., 2008; MAO et al., 2015; TABATABAEI; GHANAVATI, 2018). Además el proceso anaeróbico en condiciones termofílicas, es más sensible a los cambios de pH, a los ácidos grasos volátiles y a los sustratos tóxicos, lo que afecta la estabilidad del proceso (ABBASSI-GUENDOZ et al., 2013; TIAN et al., 2019). Aunque existen microorganismos metanogénicos en ambientes fríos, estudios han demostrado que la mayoría de estos microorganismos son considerados psicrotolerantes o mesofílicos

debido a que las mayores tasas de producción de metano fueron en condiciones mesofílicas (MACHÍN OLIVERA, 2022).

La temperatura es uno de los factores más importantes a ser considerado en la digestión anaeróbica, ya que este puede afectar o favorecer la velocidad de reacción y las actividades enzimáticas de la comunidad microbiana del digestor (BRES, 2019).

#### 2.2.2.2 pH

Al igual que la temperatura, el pH también posee una influencia importante en el crecimiento y metabolismo de los microorganismos del proceso anaeróbico. Algunas comunidades microbianas dependen del pH para que puedan realizar actividades metabólicas, lo que significa que el equilibrio del proceso depende de la sincronización de estas. Cada grupo de microorganismos puede presentar diferentes rangos de sensibilidad al pH, sin embargo, el rango adecuado para la digestión anaeróbica es entre 6,5 - 7,2 (APPELS et al., 2008; BRES, 2019). Debido a ese rango de sensibilidad al pH diferentes entre las comunidades microbianas del proceso anaeróbico, este factor es considerado una variable de respuesta lenta, pues su influencia es tan importante que al detectar un cambio significativo en el pH, este puede generar consecuencias irreversibles en el sistema. Por lo tanto, en cuanto a parámetro control, es más recomendable optar por variables de respuesta rápida, como el rendimiento de metano, ácidos grasos volátiles y la relación entre éstos y la alcalinidad (FOSTER CARNEIRO, 2005).

#### 2.2.2.3 Alcalinidad

La alcalinidad se refiere a la medida de la cantidad de sustancias alcalinas presentes en el proceso anaeróbico. Cuanto mayor la alcalinidad, mayor es la capacidad de *buffer* en el proceso, lo que lleva a la estabilidad del pH (SHNURER; JARVIS, 2010). Este factor está representado por las moléculas de bicarbonato ( $\text{HCO}_3^-$ ) presentes en el sistema, que están en equilibrio con el dióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ) y el ácido carbónico ( $\text{H}_2\text{CO}_3$ ). La degradación de materiales ricos en proteínas y aminoácidos pueden contribuir al aumento de la alcalinidad debido a la presencia de amoníaco que también puede reaccionar con el  $\text{CO}_2$  formando bicarbonato de amonio ( $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ ) (BRES, 2019).

El equilibrio químico de las reacciones entre el CO<sub>2</sub> y las moléculas anteriormente mencionadas dependen también del pH. La medida de alcalinidad puede ser determinada como alcalinidad total (AT) y alcalinidad parcial (AP). Si en un sistema el sustrato no posee una alcalinidad suficiente, esta debe ser proporcionada a partir de la agregación de compuestos químicos (SHNURER; JARVIS, 2010; BRES, 2019).

#### 2.2.2.4 Ácidos orgánicos volátiles

Los compuestos intermediarios fundamentales en el proceso son los ácidos grasos volátiles (AGV) que cumplen el rol de monitoreo y control de los reactores anaeróbicos (BRES, 2019). Una acumulación de ácidos orgánicos significa que existe diferencia cinética entre productores y consumidores de ácidos, lo que se refleja en el estrés del sistema. Una sobrecarga de alimentación puede llevar a esta acumulación de ácidos orgánicos (AL SEADI et al., 2008), como también puede ser causada por una caída de temperatura o por una acumulación excesiva de espuma (LORENZO; ABREU, 2005). Si el proceso anaeróbico es inestable, este puede conducir a la acumulación de los AGV y consecuentemente a la caída del pH, pero si la alcalinidad es suficiente, la capacidad *buffer* del sistema puede evitar que el pH tenga una caída (CORNET; EUVERINK, 2017; AL SEADI et al., 2008). No existe un mismo valor de concentración de AGV tóxico para todas las comunidades de la digestión anaeróbica, pues en cada reactor existen diferentes comunidades microbianas dependiendo del tipo de alimentación y condiciones operativas. Por esta razón, no se conoce un valor universal de AGV recomendado, por lo que su monitoreo depende de la alcalinidad del sistema (AL SEADI et al., 2008; LI et al., 2014). Sin embargo, puede ser identificado el estado del proceso a través de la medición de la relación FOS/TAC, un análisis desarrollado por el Centro Federal Alemán de Investigación Agrícola (*Bundesforschungsanstalt für Landwirtschaft/FAL*) con el fin de determinar el coeficiente de la concentración ácida y la capacidad compensadora del sustrato de fermentación. Fos se refiere a los ácidos orgánicos volátiles y TAC se refiere a la capacidad de compensación alcalina. Reglas empíricas proporcionadas por DEULA-Nienburg indican que valores menores que 0,2 son deficientes y necesitan un aumento inmediato de la biomasa, valores entre 0,2-0,3 indican que la entrada de biomasa es insuficiente y se puede aumentar ligeramente la adición de biomasa, valores entre 0,4-0,6 indica que el proceso está sobrecargado y es recomendada la reducción de la adición de biomasa, mientras que valores mayores que

0,6 indican una excesiva carga de biomasa y la adición de biomasa debe ser interrumpida.

La toxicidad de los ácidos grasos para los microorganismos metanogénicos varía dependiendo de la longitud de la cadena de los ácidos grasos, cuánto más larga es la cadena, menos las metanogénicas podrán tolerar la toxicidad. Por eso, el ácido con menor toxicidad es el ácido acético. Por ende, el rango de concentraciones de ácidos grasos que resultan tóxicas, varía dependiendo de su longitud y su grado de saturación (CORNET; EUVERINK, 2017; KHANAL, 2018; BRES, 2019).

Comúnmente son utilizados en los ensayos de PBM, inóculos a base de estiércoles, estos poseen una alcalinidad “extra”, con la cual puede suceder una acumulación de ácidos antes de que la caída de pH sea detectada (AL SEADI et al., 2008).

#### 2.2.2.5 Nutrientes y relación C/N

Para el crecimiento y actividad metabólica de los microorganismos es necesaria una fuente de macro y micronutrientes. Los nutrientes más importantes en el proceso anaeróbico son el carbono, nitrógeno y fósforo. La concentración de estos nutrientes depende de las especies de microorganismos presentes en el digestor, como también de la composición del sustrato a degradar. Estudios indican que la relación óptima de C:N es entre 15-45 y la relación de macronutrientes C:N:P:S óptima es 300:600:15:5:1 (KHANAL, 2008; AL SEADI et al., 2008; MEEGODA et al., 2018; BRES, 2019).

La relación carbono/nitrógeno (C/N) de un sustrato es normalmente utilizada para la caracterización de nutrientes. Según estudios de WANG et al. (2014), existe una interacción entre la temperatura y la relación C/N, donde el consumo de C y N puede ser afectada por la temperatura. Además, que con una relación de C/N=26,76 a 35 °C y C/N=30,67 a 55 °C se logró el máximo potencial de metano y una reducción de la inhibición por amonio.

Micronutrientes como el cobalto, hierro, níquel y sulfuro son esenciales para la conversión de acetato a metano. Elementos como el selenio y el tungsteno son elementos traza necesarios para la actividad enzimática de las metanogénicas (KHANAL, 2008). Además de estos, son necesarios varios otros elementos trazas que su ausencia

podría causar una alteración o inhibición del proceso anaeróbico (AL SEADI et al., 2008; GUEBITZ et al., 2015).

#### 2.2.2.6 Mezclado

El mezclado o homogeneización garantiza la eficiencia de contacto entre el sustrato y la biomasa microbiana. La intensidad de agitación puede afectar el proceso y el rendimiento del biogás (LINDMARK et al., 2014). Sin embargo, la ausencia o muy baja de agitación puede llevar a la formación de costras y una mala distribución de temperatura del digestor (DIVYA et al., 2015). La intensidad de mezclado podría poner en riesgo la supervivencia de los microorganismos anaeróbicos, como por ejemplo, las *Metanosaetas* que son las más sensibles a la velocidad intensa de agitación (KUNDU et al., 2014).

### 2.3 ENSAYO DE POTENCIAL BIOQUÍMICO METANOGÉNICO (PBM)

El ensayo de PBM permite la evaluación del potencial de producción de metano que puede tener una cierta biomasa. Este ensayo es utilizado a nivel mundial y considerado una herramienta clave para definir la factibilidad técnica de una planta de biogás por medio de la cuantificación de la máxima producción de metano para residuos de interés (BRES; BEILY; CRESPO, 2022). El Potencial Bioquímico de Metano (PBM) o *Biochemical Methane Potential* (BMP) permite la determinación de la máxima cantidad de metano producido por gramo de biomasa y la cinética de producción, bajo condiciones laboratoriales controladas (LESTEUR et al., 2010). El PBM se calcula como la máxima cantidad de metano acumulada durante el proceso del ensayo, dividida por la cantidad de masa de sustrato de interés agregada y la producción es expresada frecuentemente como mL de CH<sub>4</sub>/gDQO o gSV (BRES; BEILY; CRESPO, 2022). En el presente estudio, los resultados de producción de metano y biogás en sí se expresan en LN/KgSV.

El ensayo de PBM tiene muchas aplicaciones, estas pueden ser: determinación de biodegradabilidad anaeróbica y de máxima producción de metano de residuos orgánicos, evaluación del efecto de la codigestión de diferentes sustratos y definir la reacción óptima entre el sustrato y el cosustrato, determinación de la cinética de degradación, determinación de variables de diseño y parámetros operativos para la proyección a escala real y evaluar presencia de sustancias inhibitorias del proceso anaeróbico (TABATABAEI; GHANAVATI, 2018).

Este ensayo consiste en la incubación (en reactores pequeños) de una cantidad pequeña de sustrato (residuo de interés) junto con un inóculo donde están presentes los microorganismos que realizarán la digestión bajo condiciones anaeróbicas, para luego medir el volumen de biogás y metano generado en el tiempo. Existen varios protocolos estandarizados de ensayos de degradación anaeróbica para diferentes materiales, sean estos químicos, plásticos u orgánicos complejos, como: normas ISO 15985 (2004), ASTM D 5511 (1994), VDI 4630 (2016), DIN 38414 TL8 (1985), entre otros. Todos estos protocolos difieren entre ellos, siendo en el diseño experimental el punto en el que más difieren (BRES; BEILY; CRESPO, 2022). Este ensayo es realizado siguiendo las normas del protocolo VDI 4630 (2016).

Entre los factores y condiciones que afectan el desarrollo del ensayo de PBM y que deben ser consideradas antes de iniciar el ensayo de digestión anaeróbica están: a) la caracterización del sustrato, que auxilia en la determinación del contenido de materia orgánica y se expresa por parámetros de sólidos volátiles (SV) y demanda química de oxígeno (DQO), b) el pretratamiento del sustrato, para aumentar la superficie de contacto de los microorganismos hidrolíticos, c) concentración del sustrato, para asegurar una adecuada transferencia de masa, d) naturaleza y caracterización del inóculo, para conocer la capacidad de producción y la concentración en términos de biomasa que es determinada mediante análisis de SV o sólidos suspendidos volátiles (SSV), e) preparación y almacenamiento del inóculo, para evitar la alteración de sus propiedades, f) concentración del inóculo, para asegurar la mayor conversión anaeróbica del sustrato y evitar una sobrecarga del reactor (BRES; BEILY; CRESPO, 2022).

La caracterización del sustrato permite la estimación de su potencial teórico, pues la producción de metano está directamente relacionada con la degradación de los SV (MOODY et al., 2009), además de permitir el ajuste de variables operativas del ensayo y prever posibles efectos inhibitorios. El tamaño del material si no es pretratado puede afectar la cinética y la velocidad de producción del biogás. La concentración del sustrato es uno de los más importantes parámetros a ser considerado antes de realizar un ensayo, algunos ensayos de PBM tienen establecido una concentración de sustrato entre 2 y 10 % de sólidos totales (ST) en el reactor (RAPOSO et al., 2012; V.D.I., 2006). Según estudios donde se evaluaron diferentes concentraciones de sustrato (de 5 a 15 g SV/L de maíz), la concentración de 15 gSV/L fue con la cual se obtuvo el máximo potencial de metano (RAPOSO et al., 2006). El valor de SV del inóculo no representa solo el contenido microbiano ya que no diferencia el contenido de biomasa del material orgánico, como

tampoco diferencia la biomasa viva de la muerta (ANGELIDAKI et al., 2009; RAPOSO et al., 2012). El tiempo y la temperatura en el que el inóculo está almacenado también puede tener influencia sobre los resultados del ensayo de PBM. En estudios realizados por Li et al., (2014), los resultados demostraron que un inóculo fresco tuvo mayor rendimiento de metano (498,3 mL/gSV) y biodegradabilidad de 87,7%, comparando con un inóculo almacenado a 2 meses que tuvo un menor rendimiento de metano (425 mL/gSV) y biodegradabilidad de 74,8%.

## 2.4 AVENA

La avena (*Avena sativa* L.), una especie de gramínea perteneciente a la familia Poaceae es un material de biomasa lignocelulósica. Según datos publicados por la *United States Department of Agriculture* (USDA, 2023) Brasil ocupa actualmente el cuarto lugar a nivel mundial en producción de avena con aproximadamente 1,22 millones de toneladas métricas producidas entre 2023 y 2024, con un crecimiento de 3% a cada año, lo que a su vez genera toneladas de residuos al año que pueden ser aprovechados para la producción de biogás por digestión anaeróbica. La cáscara y la harina residual resultante durante el procesamiento de la avena son usualmente destinadas a la dieta de animales, al compostaje o a la producción de energía (COELHO, 2020).

Durante la digestión anaeróbica de la avena como un sustrato, las enzimas deben romper la membrana de barrera de la lignina para poder tener acceso a la holocelulosa, en consecuencia, la velocidad de reacción posee una relación directa con el área de superficie a la que pueden acceder las bacterias hidrolizantes (KUSCH et al., 2011; TONG et al., 1990). Existen varios factores que pueden representar una resistencia de la avena a la hidrólisis enzimática, como la cristalinidad de la celulosa, el área de superficie accesible, la barrera de lignina y la presencia de un revestimiento de hemicelulosa en la celulosa (KUSCH et al., 2011; MOSIER et al., 2005). La avena es uno de los materiales lignocelulósicos con más fibras en su composición. Un estudio realizado por DITTGEN et al., (2015), indica que solo la cáscara de avena posee un porcentaje de lignina entre 26,1 %, celulosa 40,1 % y hemicelulosa 25,1 %. Estas proporciones son mayores comparando con los porcentajes encontrados en muestras de otros cultivos lignocelulósicos de interés industrial, que según PRINSEN, (2010), materiales como: el bagazo de caña de azúcar posee 39,01 % de celulosa, 23,09 % de lignina y

aproximadamente 24 % de hemicelulosas; el rastrojo de maíz posee 37,69 % de celulosa, 18,59 % de lignina y aproximadamente 24 % de hemicelulosas y la paja de trigo tendría 32,64 % de celulosa, 16,85 % de lignina y aproximadamente 22 % de hemicelulosas. La velocidad con la que estas pueden ser degradadas depende mucho del porcentaje como también de cómo están organizadas.

## 2.5 BIOAUMENTACIÓN

La bioaumentación es conocida como una técnica que consiste en la adición de cepas especiales o cultivos mixtos a un sistema biológico con el fin de mejorar el proceso de interés. En ensayos de PBM, la técnica de bioaumentación podría ayudar a contrarrestar problemas comunes que debilitan el proceso y reflejan resultados poco satisfactorios. Por ejemplo, podría ser utilizado con el fin de encontrar cultivos con capacidad de reducir el efecto de toxicidad del amoníaco, como también la degradación rápida de los AGV (LINSOONG et al., 2022). Además, estudios demostraron la existencia de un metanógeno hidrogenotrófico muy eficaz para aumentar la producción de metano en presencia de concentraciones altas de H<sub>2</sub> que pueden causar inhibición de la metanogénesis (XU et al., 2023).

La propuesta de la técnica de bioaumentación parece simple y de respuesta rápida, pero todavía existen cuestiones a ser resueltas sobre ella. Una de las barreras de esta técnica según RAPER et al. (2018) es el costo económico, incluyendo el costo adicional y del mantenimiento. Otro de los puntos que puede representar un obstáculo es la relación entre los microorganismos locales y los agregados como bioaumentación, como también la dosis y frecuencia con la que deben hacerse el tratamiento. Estos factores indican que son necesarias evaluaciones previas de viabilidad económica de la bioaumentación antes de adoptar este tratamiento (JIANG et al., 2020).

## 2.6 EFECTOS DEL CAMBIO CLIMÁTICO EN AMBIENTES FRÍOS

Los gases de efecto invernadero son gases que están presentes en la atmósfera que absorben y emiten radiación infrarroja (EASTERBROOK, 2016). Estos gases tienen un efecto que los hace necesarios para la vida que conocemos, ya que mantienen la temperatura de la superficie de la tierra entre 15 a 33 °C más cálido de lo

que podría ser sin la existencia de estos gases atmosféricos. Sin embargo, si la concentración de estos gases sufre cambios, estos pueden alterar el equilibrio energético del sistema climático, aumentando el calor en la superficie de la tierra como lo hemos experimentado en las últimas décadas y la llamamos calentamiento global (US EPA, 2015).

Los efectos del calentamiento global tienen un efecto pronunciado fácil de observar principalmente en los ambientes fríos. La temperatura aumenta a medida que las concentraciones de gases aumentan y esto causa el derretimiento de la tierra, la nieve y las capas de hielo. Con el derretimiento grandes superficies de tierra y agua que estaban congeladas anteriormente se revelan y absorben más calor proveniente del sol, aumentando más la temperatura en la tierra y derritiendo más superficies en esos ambientes, creando un *feedback positivo* conocido como retroalimentación del albedo de hielo (MACHÍN OLIVERA, 2022; SOLOMON et al., 2007).

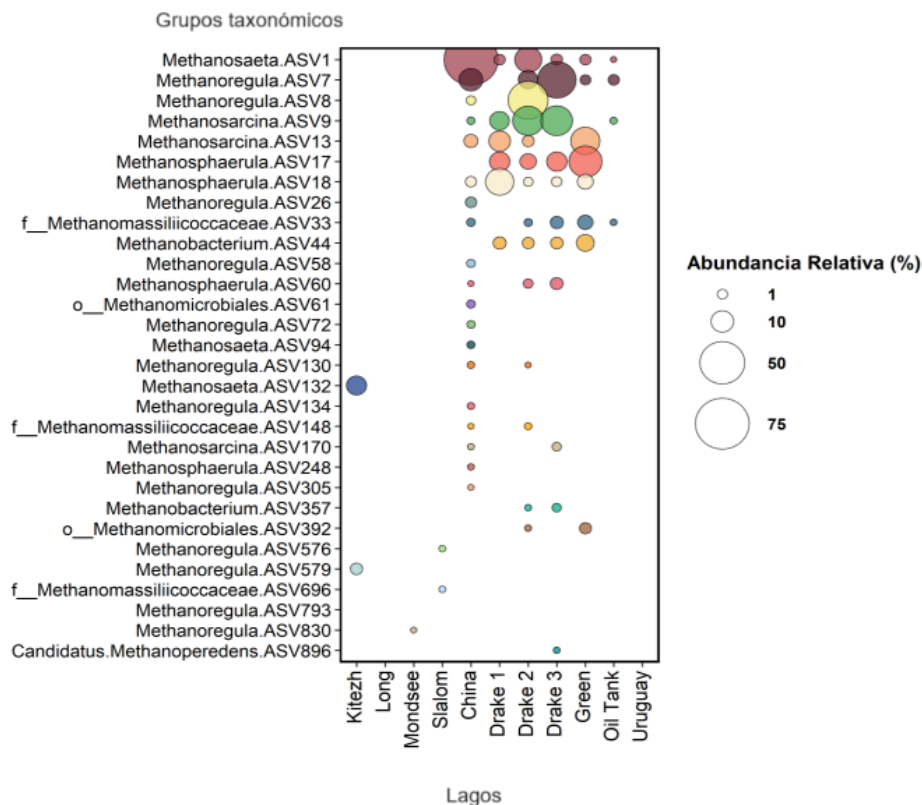
El metano (CH<sub>4</sub>) es uno de los principales gases de efecto invernadero que aumenta el calentamiento global. Después del dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) es el segundo compuesto de carbono más abundante en la atmósfera (CONRAD, 2007). La mayor parte del metano que es emitida a la atmósfera es de origen biótico o biogénico de orígenes naturales. Varios estudios demostraron que la producción biológica de metano puede ocurrir en diferentes ambientes anaeróbicos como humedales naturales, reservorios de agua dulce con poco oxígeno, sistemas digestivos de rumiantes y cúmulos residuos orgánicos (MACHÍN OLIVERA, 2022). Además de estos ambientes, también fue reportada la emisión de metano en ambientes fríos como por ejemplo en permafrost derretido (METJE; FRENZEL, 2007).

## 2.7 COMUNIDADES DE MICROORGANISMOS METANOGÉNICOS EN AMBIENTES FRÍOS

Según estudios realizados por MACHÍN OLIVEIRA (2022) con sedimentos de 11 lagos ubicados en la Isla Rey Jorge - Antártica, existe una variedad en abundancia y ocurrencia de grupos taxonómicos entre los lagos muestreados, sin embargo, afirma que la mayoría de estos lagos poseen una comunidad de arqueas mayormente dominadas por géneros metanogénicos. Estos están representados por los géneros *Methanosaeta*, *Methanoregula*, *Methanosarcina*, *Methanosphaerula*, *Methanobacterium* y otros géneros de metanogénicos pertenecientes a la familia *Methanomassiliicoccaceae*.

La familia más abundante fue *Methanosarcinaceae* representando 38% de la abundancia relativa promedio de la comunidad metanogénica. Otras familias metanogénicas que fueron observadas con una abundancia relativa fueron *Methanobacteriaceae*, *Methanosaetaceae*, *Methanoregulaceae* y *Methanocellaceae*. En cuanto a metanogénicas de gran interés para la aplicación en procesos de digestión anaeróbica que fueron hallados, fueron reportados metanogénicas hidrogenotróficas y acetoclásticas en el lago China, mientras que en el lago Drake 3 solo se reportaron metanogénicas acetoclásticas. El género hidrogenotrófico *Methanoregula* fue uno de los géneros más abundantes en los lagos Drake 2 y 3, representando entre 46 y 36 % de la abundancia metanogénica. La abundancia relativa de la comunidad metanogénica en los lagos muestreados de la Isla Rey Jorge puede ser observada en el **Gráfico 1** a seguir (MACHÍN OLIVERA, 2022):

**Gráfico 1:** Gráfico de abundancia relativa de grupos taxonómicos (orden, familia y género) de arqueas metanogénicas en lagos de la Isla Rey Jorge. El tamaño de los círculos corresponde al porcentaje de abundancia relativa.



Fuente: Adaptado de MACHÍN OLIVEIRA, 2022.

En este contexto, el estudio de cultivos mixtos tolerantes a un ambiente extremo y a diferentes sustratos, podría ser un punto de partida para estudios para un mejoramiento de procesos anaeróbicos para producción de metano.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GENERAL

- Evaluar la biodegradabilidad y el potencial de producción de metano de la avena y evaluar el efecto de la técnica de bioaumentación en la digestión anaeróbica utilizando un extracto de suelo enriquecido proveniente de una colina en deshielo de la Antártica.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

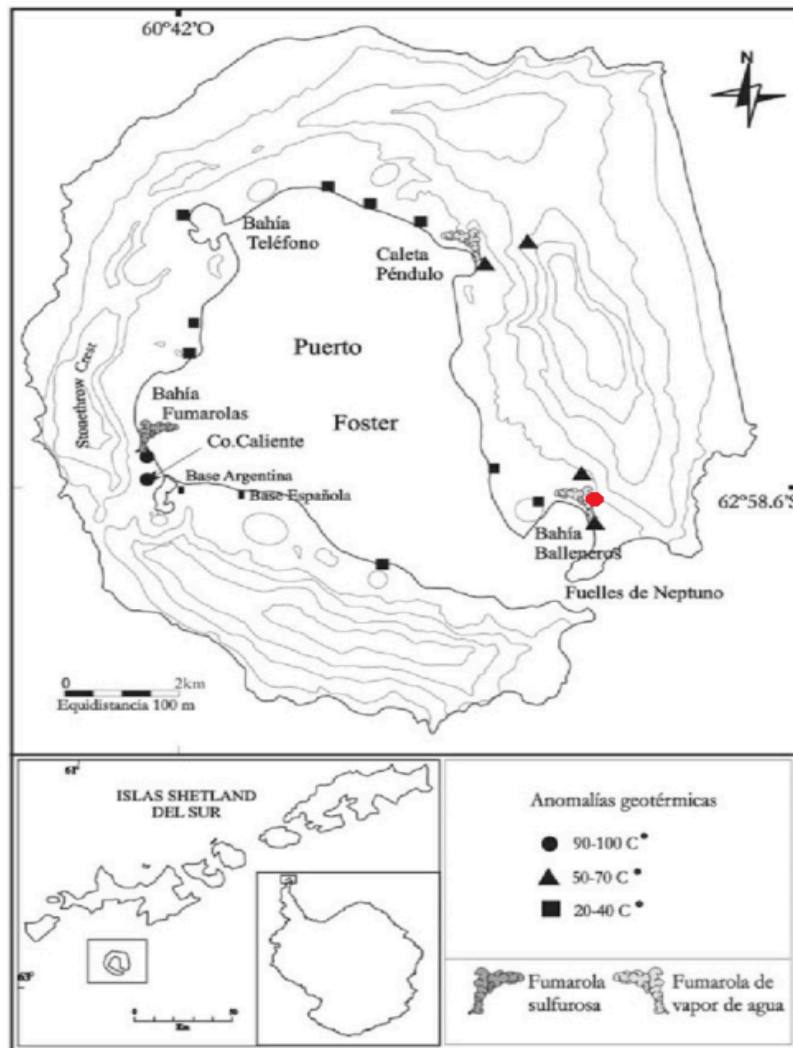
- Realizar un enriquecimiento utilizando una muestra de suelo en proceso de deshielo, colectado de la Isla Deception, Whalers Bay - Antártica;
- Separación de componentes más densos de la muestra de suelo enriquecida por el proceso de decantación;
- Realizar la caracterización fisicoquímica de la avena;
- Determinar Sólidos Totales, Sólidos Volátiles y Sólidos Fijos del cultivo mixto;
- Determinar el Potencial Bioquímico Metanogénico de la avena;
- Evaluar el efecto de la técnica de bioaumentación con extracto de suelo enriquecido sobre la digestión anaeróbica de avena.

## 4. METODOLOGÍA

### 4.1 MUESTRA DE SUELO ANTÁRTICO

El suelo en proceso de deshielo fue colectado durante la Operación Antártica (OPERANTAR) XLI entre los meses de noviembre y diciembre de 2022, en el ámbito del grupo de investigación Mycoantar. Las muestras fueron colectadas con el auxilio de una espátula previamente limpiada con etanol 70%. Cerca de 10 cm de la parte superior del suelo fue removida para retirar el hielo y posibles contaminantes. Las muestras fueron recolectadas del suelo en proceso de deshielo sobre una colina en la Isla Deception, Whalers Bay, Antártica, coordenada  $\varnothing 63^{\circ} 3' 33.7702'' S 60^{\circ} 57' 26.7559'' W$ , y acondicionadas en bolsas de plástico de colectas esterilizadas, en triplicado. La temperatura del suelo al momento de recolectar fue de 2.7 °C. La **Figura 2** muestra el mapa de la Isla Deception y apunta en rojo donde está ubicado Whalers Bay.

**Figura 2:** Mapa y ubicación de la Isla Deception.



● Whalers Bay

Fuente: Adaptado de CASELLI et al., (2007).

## 4.2 COLECTA DE LA MUESTRA DE AVENA

La muestra de avena de hojuelas pequeñas fue obtenida de la aprehensión de los órganos fiscalizadores y enviada a la unidad de demostración de la Itaipu Binacional por la cual el laboratorio de CIBiogás es responsable por la operación. Para la realización de los ensayos, la muestra de avena fue transportada hasta el Laboratorio de Biogás del Centro Internacional de Energías Renovables - Biogás (CIBiogás), que posee acreditación de la ABNT NBR ISO/IEC 17.025 desde el año 2016, por cumplir con criterios exigidos mundialmente para ensayos de PBM. En el laboratorio,

la muestra se mantuvo sobre refrigeración en bolsas de plástico para la conservación de sus propiedades hasta el momento de inicio de los ensayos.

Antes de cada etapa del ensayo como la caracterización y la incubación, la avena fue retirada del refrigerador y dejada en reposo hasta alcanzar la temperatura ambiente (entre 21 - 25 °C). Luego esta fue triturada, utilizando un licuador de la marca Britania Diamante 800, hasta obtener una muestra con una mezcla de partículas menores.

#### 4.3 CARACTERIZACIÓN DE LA AVENA

La caracterización de la muestra de Avena Individual (AI) fue realizada en el laboratorio de CIBiogás. Fueron realizados análisis descriptivos de las propiedades de la AP, que incluyen análisis de sólidos totales (ST), sólidos fijos (SF) y sólidos volátiles (SV). Estos valores ayudan a calcular la concentración del sustrato a ser utilizado para una buena relación sustrato/inóculo. Otros análisis físicoquímicos no pudieron ser realizados debido a la característica predominantemente sólida del sustrato. Todos los procedimientos realizados fueron conforme al protocolo de actuación del laboratorio.

Para el mejor aprovechamiento de la avena, este fue pretratado con un proceso de trituración, utilizando un licuador de la marca Britania Diamante 800, para reducir la muestra en partículas menores.

Luego los ensayos de caracterización de ST, SF y SV fueron realizados siguiendo el procedimiento adoptado por el laboratorio de CIBiogás, que está adaptado de la metodología presentada en el libro “*Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*” (APHA, 2017), con la adaptación del método gravimétrico de número 2540-B.

##### 4.3.1 Sólidos Totales (ST)

Los ensayos para la obtención de valores de ST fueron realizados en duplicados para garantizar la obtención de resultados precisos. Fueron utilizados crisoles de porcelana, que fueron previamente preparados para el ensayo, siendo calcinados con el uso de una mufla a 550 °C de temperatura por 1 hora. Estos crisoles fueron reservados en un desecador para evitar el contacto de los crisoles con la humedad del ambiente. Luego de unos minutos, con la ayuda de un termómetro se midió la temperatura de los crisoles para cerciorarse de que estos hayan alcanzado la temperatura ambiente. Cuando

los crisoles alcanzaron la temperatura ambiente, estos fueron pesados utilizando una balanza analítica para saber la masa de los crisoles vacíos y el valor de los pesos se registraron como P1.

Luego, las muestras de cada componente de los ensayos fue pesada en los crisoles y los valores de estos fueron registrados como PA. Después, para la remoción completa de la humedad de las muestras, estas fueron transferidas a una estufa, donde estuvieron en reposo a una temperatura constante de 104 °C durante 12 horas. Terminado ese proceso, los crisoles se colocaron en reposo dentro un desecador hasta que alcanzaran la temperatura ambiente, para posteriormente ser pesados nuevamente hasta la obtención del valor de masa constante, lo que llevó a que los crisoles sean puestos nuevamente en la estufa a una temperatura de 104 °C por un periodo de 1 hora. El valor de la masa constante fue registrada como P2 (APHA, 2017).

El valor de ST se obtiene a través de la **Ecuación 5** presentada a continuación (APHA, 2017):

$$ST\% = \frac{P2-P1}{PA-P1} \times 100 \quad \text{Ecuación (5)}$$

Donde:

P1 = Peso del crisol vacío (g);

PA = Peso inicial de la muestra de AP (g);

P2 = Peso del crisol luego del secado de las muestras (g);

P3 = Peso del crisol luego de la calcinación de las muestras (g).

#### 4.3.2 Sólidos Fijos (SF) y Volátiles (SV)

La determinación de los SF presentes en las muestras fue realizada a través de la utilización de los mismos crisoles conteniendo la muestra después de haberse realizado la determinación de los valores de ST.

Para esto, los crisoles fueron calcinados nuevamente en una mufla a una temperatura de 550 °C por 4 horas. Luego de la calcinación, estos crisoles fueron reservados en el desecador, y después de alcanzar la temperatura ambiente fueron pesados por tercera vez para saber el valor de las masas hasta llegar a un valor

constante. Esto llevó a otro pasaje por la mufla a 550 °C por 1 hora y el peso luego se registró como P3.

Los porcentajes de SV fueron calculados con base en el contenido volatilizado durante la calcinación de los SF. Los valores de SF y SV fueron obtenidos a través de las **Ecuaciones 6 y 7** presentadas a continuación (APHA, 2017):

$$SF\% = \frac{P3-P1}{P2-P1} \times 100 \quad \text{Ecuación (6)}$$

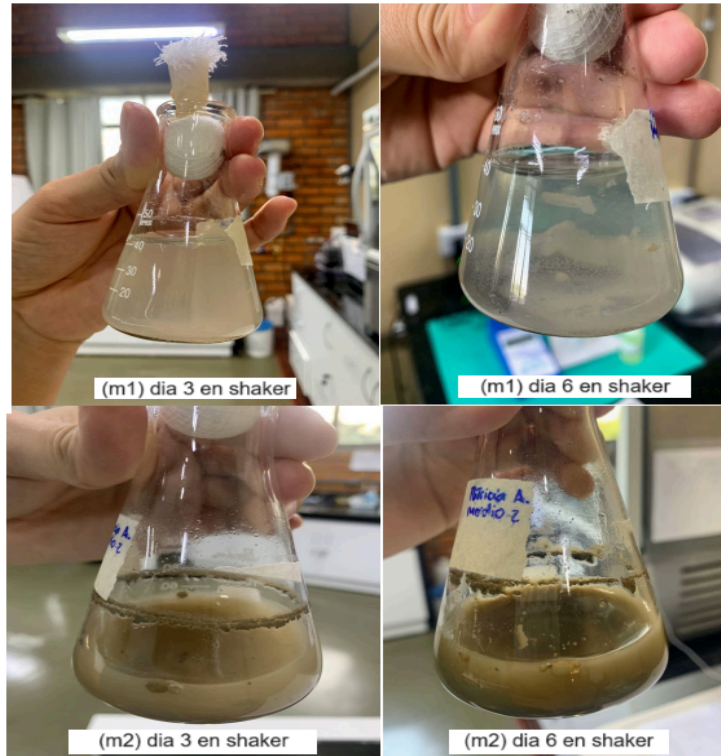
$$SV\% = \frac{P2-P3}{P2-P1} \times 100 \quad \text{Ecuación (7)}$$

#### 4.4 PREPARO DEL ENRIQUECIMIENTO UTILIZANDO SUELO ANTÁRTICO EN DESHIELO

Los procedimientos para la obtención del cultivo mixto fueron realizados en el laboratorio G011 de la Universidad Federal de Integración Latino-Americana (UNILA). Para esto, primeramente todos los materiales utilizados fueron esterilizados previamente. Luego, una muestra de suelo en deshielo tomada de la Isla Deception fue retirada del congelador y colocada dentro de un flujo laminar previamente esterilizado para que la muestra fuera descongelada. Seguidamente, con la ayuda de un Becker esterilizado y papel aluminio para tapar el Becker, fueron pesados 5 gramos de la muestra. Luego dentro del flujo laminar, a cada uno de 6 Erlenmeyers de 50 mL conteniendo 40 mL de medio de cultura (m1) a base de peptona (0,25 g/50 mL de agua) y azúcar (0,1 g/50 mL de agua) previamente esterilizado, fueron agregados 5 g de la muestra de suelo, tapados con tapones y agitados levemente para homogeneizar. Seguidamente, a cada uno de otros 6 Erlenmeyers de 100 mL conteniendo 40 mL de medio de cultura (m2) Nutrient Broth (NB) previamente esterilizados, fueron agregados también 5 g de la muestra de suelo, tapados con tapones, y agitados levemente para homogeneizar. Por último, los Erlenmeyers conteniendo las mezclas más 2 Erlenmeyers, uno conteniendo el medio m1 (Control m1) y otro con medio m2 (Control m2) sin muestra de suelo, fueron colocadas en un Shaker a una temperatura de 28 °C y RPM de 150 por

un periodo de 15 días. La visualización de la evolución del enriquecimiento en diferentes días de incubación pueden ser vistas en la **Figura 3**.

**Figura 3:** Cultivo microbiológico m1 y m2 con 3 y 6 días de incubación.



**Fuente:** La autora, 2024.

Luego de 15 días, los Erlenmeyers fueron retirados del shaker para la observación. En los 6 Erlenmeyers m1 fueron observados la presencia de una película de color blanco cristalino en un medio levemente turbio. Mientras que los Erlenmeyers m2 demostraron un aspecto con más turbidez, presentando un color más opaco y presencia de grumos. Los controles con los medios m1 y m2 sin muestra de suelo no presentaron ninguna alteración, como lo esperado. Los 6 m1 y 6 m2 con suelo indicaron que hubo crecimiento microbiano por lo tanto estos fueron mezclados para formar un cultivo mixto oriundo del enriquecimiento. Para formar el cultivo mixto con suelo enriquecido, los 6 m1 y 6 m2 con suelo fueron colocados dentro de un flujo laminar, luego fueron agitados levemente y con el auxilio de un embudo el contenido de cada uno de los 12 Erlenmeyers fue vertido dentro de un frasco hermético previamente esterilizado y agitado con las manos nuevamente de manera leve. El cultivo mixto de suelo enriquecido fue transportado al laboratorio de CIBiogás, donde bajo las condiciones de este, la mayor parte de los sólidos más densos fueron separados por decantación, retirando la fase

líquida de la fase sedimentada, el líquido fue refrigerado para su conservación para su posterior uso en la incubación para en el ensayo de PBM. Este cultivo mixto de extracto de suelo, fue considerado como enriquecimiento del inóculo del laboratorio, por lo que fueron adoptados los mismos métodos de manipulación a la hora de la realización del ensayo de PBM, utilizando como base la guía VDI 4630 (2016).

#### 4.5 INÓCULO

El inóculo es un medio que debe estar compuesto por bacterias metanogénicas y asegurar la presencia de estas para la producción de metano (BRES, 2019). Para asegurar la actividad del inóculo, son realizados previamente los ensayos fisicoquímicos de este, además de la utilización de los controles positivo y negativo para identificar el potencial del inóculo. Según Raposo (2012), el origen y la mezcla de inóculos de diferentes orígenes puede afectar los resultados de biodegradabilidad por la diferencia en la concentración de las comunidades microbianas presentes en cada inóculo. Esto es comprobado por MØLLER; SOMMER; AHRING, (2004) en un estudio sobre productividad de inóculos de diferentes orígenes, donde el rendimiento de producción de metano es mayor en el inóculo proveniente de estiércol de cerdo (aproximadamente  $530 \text{ L/Kg}^{-1} \text{ SV}$ ), comparado con el inóculo de estiércol de vaca ( $468 \text{ L/Kg}^{-1} \text{ SV}$ ) que es muy utilizado para la digestión anaeróbica.

El inóculo del laboratorio de Biogás es un lodo que está compuesto en mayor proporción por efluentes de porcicultura y de estiércol bovino. Este es cultivado en un reactor anaeróbico de mezcla completa con un sistema operado de manera discontinua y con un sistema de control de condiciones de temperatura estables ( $37,5 \pm 2$  °C), pH (7,5) y agitación constante. De forma diaria, el inóculo recibe una alimentación compuesta por carbohidratos, proteínas y lípidos. Y para mantener la productividad del inóculo y conservar sus propiedades, este recibe periódicamente una carga orgánica fresca compuesta por una mezcla de 70% de efluente de porcicultura y 30% de estiércol bovino. Esta mezcla llamada de incremento, debe ser proporcionada al reactor anaeróbico una semana antes del ensayo de PBM, para aumentar la productividad del inóculo. En la **Figura 5** se puede observar uno de los reactores anaeróbicos utilizados en el laboratorio para el cultivo de inóculo.

**Figura 4:** Reactor anaeróbico para cultivo de inóculo



Fuente: La autora, 2024.

## 4.6 ENSAYO DE POTENCIAL BIOQUÍMICO METANOGENÉTICO (PBM)

### 4.6.1 Equipamiento de Fermentación Anaeróbica

El ensayo de PBM fue realizado con base en la guía alemana VDI 4630 (2016) - "*Fermentation of organic materials, characterization of the substrate, sampling, collection of material data, fermentation tests*" de la Verein Deutscher Ingenieure - Asociación de Ingenieros Alemanes, que define el procedimiento para digestión anaeróbica y los protocolos que son necesarios para la caracterización de los sustratos e inóculos.

El equipamiento de fermentación anaeróbica está compuesto por un digestor de vidrio de 250 mL, donde son agregados el inóculo y el sustrato, a este digestor va acoplado un tubo de vidrio graduado de 0 a 500 mL cuyo nombre es eudiómetro, al cual es agregado el líquido de barrera que sirve de indicador (VDI, 2016).

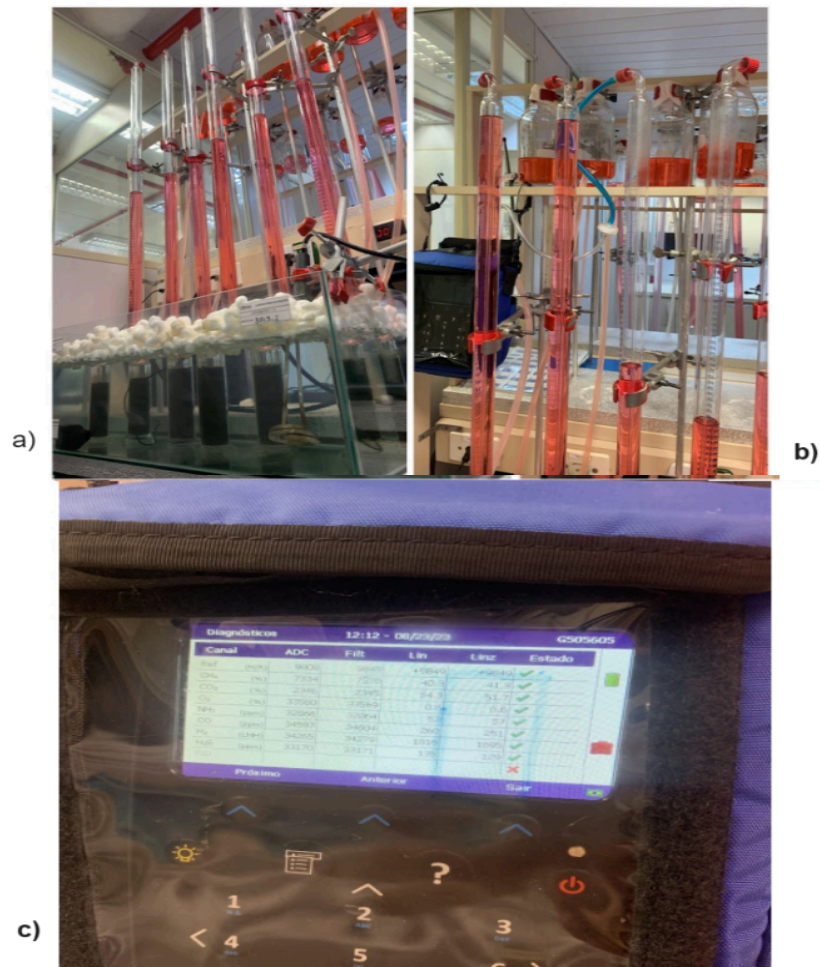
El líquido de barrera es una solución que está compuesta por sulfato de sodio decahidratado ( $\text{Na}_2\text{SO}_4 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ ) y ácido sulfúrico 99% ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ), en una proporción de

7:1. Para abastecer los seis eudiómetros utilizados en los dos triplicados, fue necesaria la preparación de líquido de barrera utilizando 1 kg de sulfato de sodio decahidratado, 150 mL de ácido sulfúrico y agua destilada purificada hasta completar el volumen de un balón volumétrico de 5 litros. Para la visualización del líquido de barrera son agregadas unas gotas de anaranjado de metilo que sirve como indicador. El anaranjado de metilo presenta un color rosado al entrar en contacto con el ácido, debido a la sensibilidad a cambios de pH (DIN 38414, 1985).

Siguiendo con la descripción del equipamiento de digestión anaeróbica, el eudiómetro es conectado a un frasco compensador, que sirve como almacenamiento del líquido de barrera cuando este es desplazado por el gas producido en el sistema, por un sistema de vaso comunicante.

Los ensayos fueron realizados en un sistema operado de manera discontinua, en triplicados, con una temperatura mesofílica ( $37,5 \pm 2 \text{ }^{\circ}\text{C}$ ) controlada por un sistema de baño maría. Este sistema de baño maría consiste en una cuba con agua que es calentada con ayuda de una resistencia o calentador y una bomba de agua para que la temperatura del agua sea uniforme. Este calentador es regulado por un controlador, que controla la temperatura del agua y la mantiene regulada a una temperatura mesofílica. En la **Figura 4** se puede observar a) el sistema de digestión anaeróbica instalada, además de b) un registro de la realización de lectura de gases y c) el equipamiento lector de gases.

**Figura 5:** a) Sistema de digestión anaeróbica instalada; b) Lectura de gases; c) equipamiento lector de gases.



Fuente: La autora, 2024.

Antes de realizar las incubaciones, fueron hechos los cálculos para la definición de las masas de sustrato e inóculo a ser utilizadas en el ensayo de PBM. Estos fueron calculados de acuerdo con la norma VDI 4630, que recomienda que, para evitar la inhibición durante el experimento, la cantidad de sólidos volátiles del sustrato no debe ser mayor en proporción cuando comparada con los sólidos volátiles del inóculo. Para esto se aplica la **Ecuación 8** presentada a continuación (VDI 4630, 2016):

$$\frac{SV \text{ de sustrato}}{SV \text{ de inóculo}} \leq 0,5$$

**Ecuación (8)**

La Avena Individual (AI) fue incubada en un triplicado solo con el inóculo, además se realizó la incubación de avena más el cultivo mixto (A+CM) junto con el

inóculo como otro triplicado. Luego de la adición del inóculo y la avena, fueron agregados 30 mL de CM en cada digester de este triplicado. Además, para el control negativo, fue incubado el inóculo individualmente. Para la evaluación de la eficiencia de la actividad biológica del inóculo, fue incubada una muestra de Celulosa Microcristalina, que es reconocida como un sustrato de referencia y tiene un rango de potencial de producción de biogás estimada entre 740 a 750 LN.Kg SV<sup>-1</sup>, esta muestra sirve como control positivo (VDI 4630, 2016).

Fueron calculadas las masas de la avena y de la celulosa microcristalina, con relación a la cantidad de inóculo utilizado (200 g), en cada proporción de 1:3 (S/I), usando la **Ecuación 9** presentada a continuación (VDI 4630, 2016):

$$\text{Masa de la muestra (g)} = \left( \frac{m}{\%SV} \times 100 \right) \quad \text{Ecuación (9)}$$

Donde:

m: Masa (g) de SV en base húmeda del inóculo (200 g) dividido por la proporción determinada (1:3);

%SV: Porcentaje de SV en base húmeda de la muestra.

Las masas fueron pesadas en los biodigestores utilizando una balanza semianalítica. En la **Tabla 3** se muestran los valores correspondientes a las masas previstas para cada muestra que fue calculada utilizando la **Ecuación (9)**, como también se muestran los valores de masa real de estos y el volumen real (mL) del cultivo mixto (CM). Los datos son presentados como la media del conjunto de valores, por lo tanto están acompañados de sus valores de desvío padrón.

**Tabla 3** - Valores de masas utilizadas en el ensayo de PBM

<b>Muestra</b>	<b>Masa prevista para el sustrato (g)</b>	<b>Masa real del sustrato (g)</b>	<b>Masa prevista del inóculo (g)</b>	<b>Masa real del inóculo (g)</b>	<b>Cultivo mixto (CM) (mL)</b>
CN (inóculo)	-	-	200	203,3±4,25	-
CP(Celulosa Microcristalina)	1,40	1,38±0,005	200	205,9±0,80	-
AI	1,53	1,53±0,005	200	212,2±14,8	-
A+CM	1,53	1,59±0,08	200	202,5±1,50	30

CN: Control Negativo; CP: Control Positivo; AI: Avena Individual; A+CM: Avena+Cultivo Mixto

Fuente: La autora, 2024.

Dado que la concentración de ST del cultivo mixto fueron en un porcentaje menor que 1%, no se consideró un factor que pueda interferir en el cálculo de masa, ya que no influencia en la concentración de ST y SV del inóculo.

Para iniciar con el proceso de incubación. Primeramente, para garantizar la condición de anaerobiosis, fueron colocados en cada eudiómetro nitrógeno gaseoso hasta comprobar que el sistema no poseía ninguna fuga y posteriormente el gas fue liberado.

El volúmen de gas generado fue registrado diariamente observando la graduación del eudiómetro. La composición de los gases fue determinada utilizando un analizador multigas modelo GA 5000 de Landtec/Geotech. Este aparato posee sensores electroquímicos e infrarrojos que permite la determinación de las concentraciones de los gases que componen el biogás.

Para el cálculo de producción específica que indica la concentración de metano producido, fueron utilizados los valores de sólidos volátiles presentes en las muestras. Y para la presentación de resultados precisos, fue restada la humedad proveniente del vapor de agua presente entre los gases, dejando así el metano seco (VDI 4630, 2016).

El metano producido pasó por normalización para condiciones normales de temperatura y presión (CNTP). El laboratorio de ensayos de PBM posee condiciones de temperatura, presión y humedad diariamente controladas y registradas. Para la obtención del rendimiento de metano de la muestra (AI), el valor de la producción de metano del control negativo (negativo) fue restado de la media de producción de metano de los triplicados estudiados.

El laboratorio de CIBiogás, mantiene las condiciones de pH, concentración de AGV y alcalinidad del inóculo controladas, por medio de un monitoreo realizado cada semana. Para estos son realizados semanalmente análisis de coeficiente FOS/TAC que es un indicador clave para la mantener la estabilidad del proceso ya que auxilia en la determinación de la concentración de AGVs y carbono inorgánico total del inóculo. Además el inóculo recibe alimentación diaria rica en carbohidratos, lípidos y proteínas, los cuales son pesados y mezclados en proporciones previamente calculadas considerando la concentración de SV, ST y SF de los sustratos.

El inóculo, es constantemente monitoreado por medio de análisis fisicoquímicos para mantener el sistema en equilibrio. Luego de la colecta de las cargas orgánicas que componen el inóculo (efluente de porcicultura 70% y estiércol bovino 30%), estos son transportados hasta el laboratorio donde con muestras de estos son hechos análisis fisicoquímicos como, análisis de Demanda Química de Oxígeno (DQO) y SV para determinar el contenido de materia orgánica presente en estas y así mantener la estabilidad de la actividad biológica del inóculo.

## 5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 5.1 ANÁLISIS FÍSICOQUÍMICAS

El ensayo de sólidos totales es utilizado para la interpretación cuantitativa de los sólidos presentes en una muestra, sean estos en forma de sustancias disueltas, en forma coloidal y en suspensión (BOTELHO; LYRA, 1974). El porcentaje de ST en la muestra de salvado de avena utilizada en este estudio fue de 88,78% de ST. Este valor obtenido se acerca al valor presentado en un estudio hecho por DUBROVSKIS & PLUME (2017), donde la muestra de salvado de avena triturada tuvo 90,17% de ST. La diferencia entre los valores de ST en diferentes estudios puede variar, debido a variaciones en la composición del sustrato o por presencia de otras partes de la avena. El valor 4,94% de ST presentes en la mezcla (A+CM), representa al total de sólidos presentes en la mezcla de 30 mL de cultivo mixto (material líquido), más los 1,53 g de avena (material sólido). Los resultados del test de sólidos totales presentes en 30 mL de CM individual indicaron un 0,65% de ST, que por ser menor que 1% no es un factor que pueda haber interferido en la cantidad de masa utilizada. En la **Tabla 4** son exhibidos los resultados de los ensayos de ST, SV y SF, estos valores representan al promedio de los resultados de cada ensayo.

**Tabla 4:** Caracterización de Sólidos Totales, Volátiles y Fijos

Muestra	masa(g)	Volumen (mL)	ST (%)	SV <sup>1</sup> (%)	SF <sup>1</sup> (%)
AI	1.53	-	88,78	96,58	3,42
CM	-	30	0.65	13.2	86.8
A+CM	1.53	30	4,94	86,11	13,89

<sup>1</sup>:Resultados expresos en masa seca; AI: Avena lindividual; CM: cultivo mixto; A+CM: Avena+Cultivo Mixto; - nada.

Fuente: La autora, 2024.

Los sólidos volátiles son aquellos presentes en una muestra y que volatilizan por calcinación. Luego de la determinación de ST, la muestra es calcinada a 550°C, donde parte del material es oxidado (combustión) transformándose en CO<sub>2</sub> que es evaporado. El material sobrante que no fue volatilizado es definido como la porción de sólidos fijos. Y el valor de sólidos volátiles es determinado por la diferencia de sólidos fijos con relación a los ST (BOTELHO; LYRA, 1974). La gran mayoría de los sólidos volátiles es material orgánico biodegradable y no biodegradable. Mientras que la gran mayoría de los sólidos fijos son de material mineral (BOTELHO; LYRA, 1974).

Se puede observar en la **Tabla 4**, que la concentración de SF presente en la avena individual fue de 3,42% lo que significa que la parte orgánica es considerablemente mayor. Ya en el estudio realizado por DUBROVSKIS & PLUME (2017), la concentración de SF fue de 5,84%, que es un valor mayor de sólidos no aptos para biodegradación en la muestra. Esto indica una vez más la diferencia que puede existir en las muestras con relación a la composición de estas. En la mezcla de avena y cultivo mixto (CM) se pudo observar un aumento de la fracción de los SF, esto es debido a la gran concentración de SF presentes en el CM, que de los 0,65% de sólidos totales presentes en 30 mL de CM, 86,8% representa a la fracción de SF no biodegradable, junto con la fracción de SF proveniente de la avena. La fracción de SF que en su mayoría son minerales provenientes del suelo, dependiendo de la concentración, puede representar un factor positivo o negativo. Si este suelo es rico en CaCO<sub>3</sub>, en una concentración adecuada para el sistema puede contribuir con la elevación del pH en sistemas con altas concentraciones de AGV, sin embargo en concentraciones altas puede contribuir a una reducción de CO<sub>2</sub> del sistema, que en concentraciones bajas, representa una menor cantidad de aceptor de H<sub>2</sub> en el proceso redox que da origen al CH<sub>4</sub>, lo que significa también una reducción en la producción de metano (LORENZO; ABREU, 2005). Sin embargo, no existen informaciones precisas sobre el rango de concentración de minerales adecuados para sistemas de degradación anaeróbica.

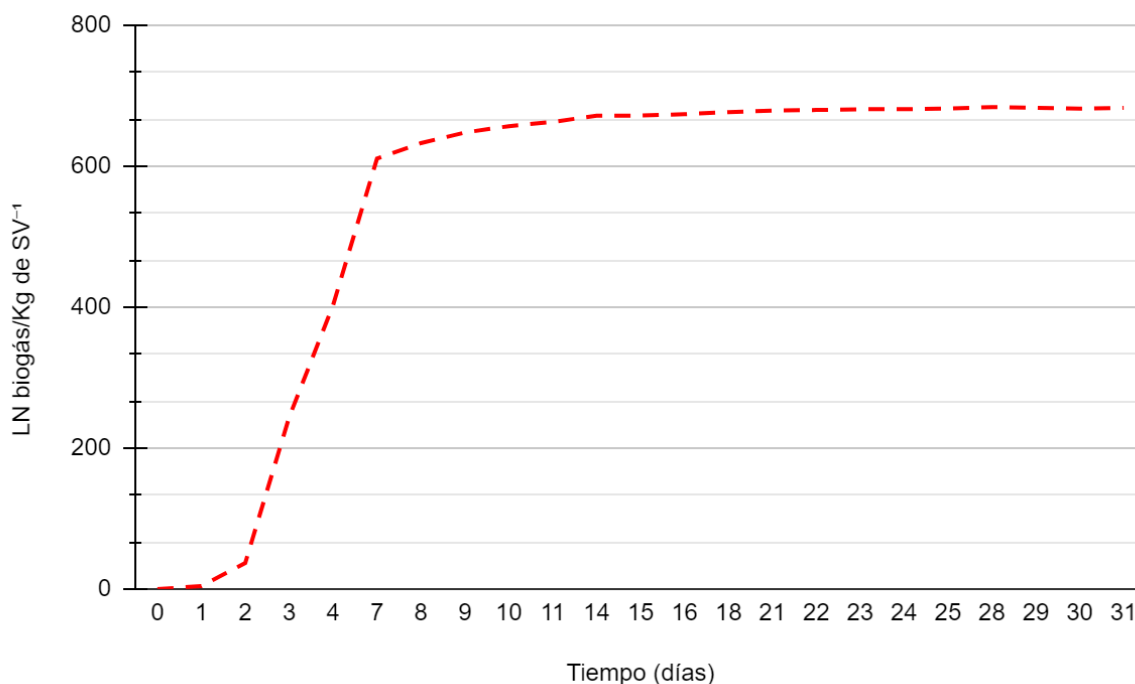
En cuanto a los Sólidos Volátiles (SV), la muestra de avena individual, presentó una concentración de SV de 96,58%, es decir, que la muestra individual posee un alto potencial de producción de biogás. Los resultados del estudio realizado por DUBROVSKIS & PLUME (2017) con relación a SV, indicaron un porcentaje similar para la muestra de avena individual triturada, que fue de 94,16% de SV, mientras que la muestra de avena no triturada fue de 92,66% de SV. Este último valor, demuestra la importancia

del pretratamiento del sustrato para el mejoramiento del potencial de producción de biogás.

## 5.2 POTENCIAL BIOQUÍMICO METANOGÉNICO (PBM)

### 5.2.1 Control Positivo

La muestra de celulosa microcristalina tiene como función demostrar la actividad biológica que posee el inóculo, por eso es utilizada como control positivo. Es posible esto ya que la celulosa tiene un potencial de producción de biogás estimada conocida en la literatura que es de 740 a 750 LN./Kg SV<sup>-1</sup>. Según las normas establecidas en la VDI 4630 (2016), para que los resultados sean confiables, la muestra estudiada debe tener una producción mínima de 80% de ese valor. La producción de celulosa alcanzó la producción de 684 LN./Kg SV<sup>-1</sup> de biogás que representa un 91,2% del valor establecido por la norma VDI 3630 (2016). Estos valores confirman el potencial biológico del inóculo para la digestión anaeróbica y que los resultados de producción de biogás y metano presentados son confiables. A continuación, en el **Gráfico 2** es posible observar la curva cinética de producción de biogás de la celulosa microcristalina.

**Gráfico 2:** Promedio de la producción acumulada de biogás del control positivo

Fuente: La autora, 2024.

### 5.2.2 Comparación de Datos y Evaluación de la Técnica de Bioaumentación con Cultivo Mixto de Permafrost

Los resultados de los ensayos con avena individual y avena más el cultivo mixto (A+CM) fueron en un promedio de 595 LN/kg SV<sup>-1</sup> y 561 LN/Kg SV<sup>-1</sup> de biogás respectivamente. Los resultados obtenidos por DUBROVSKIS & PLUME (2017), fueron en un promedio de 400 LN/Kg SV<sup>-1</sup> y 439 LN/Kg SV<sup>-1</sup> de biogás para avena triturada y avena no triturada respectivamente, sin el agregado de ningún aditivo y con el uso de 500 g de inóculo a base de estiércol bovino y 10 g de avena. Son muchos los factores que pueden influir sobre el rendimiento de producción de biogás, algunos de estos son, la composición del inóculo como mencionado anteriormente y la relación sustrato/inóculo (S/I). Según ALEXIS et al., (2015), una relación menor a 2:1 (S/I) permite un desempeño adecuado del proceso de degradación anaeróbica, mientras que con mayores valores, el proceso tiende a desestabilizarse debido a la acidificación por acúmulo de AGV's.

Igualmente, los resultados del porcentaje promedio de metano producido en los ensayos con avena individual y avena más el cultivo mixto (A+CM) fueron satisfactorios, ya que fueron en promedio de 53% de metano para la avena individual y

57% de metano para la avena más cultivo mixto (A+CM). Estos resultados también fueron mejores que los resultados obtenidos por DUBROVSKIS & PLUME (2017), que presentaron un valores de 48% de metano producido en el ensayo con avena triturada y 44% de metano con avena no triturada.

Existen muy pocos estudios sobre PBM de avena, siendo el estudio publicado por DUBROVSKIS & PLUME (2017), uno de los más aptos para la comparación, debido a la similitud de las características del sustrato utilizado. Comparando entre estos, los resultados obtenidos en el presente trabajo con apoyo del laboratorio del CIBiogás, fueron relativamente mejores. En la **Tabla 5** son presentados los promedios de biogás y metano obtenidos en los ensayos de avena individual y avena más cultivo mixto (A+CM).

**Tabla 5:** Resultados de los ensayos de PBM

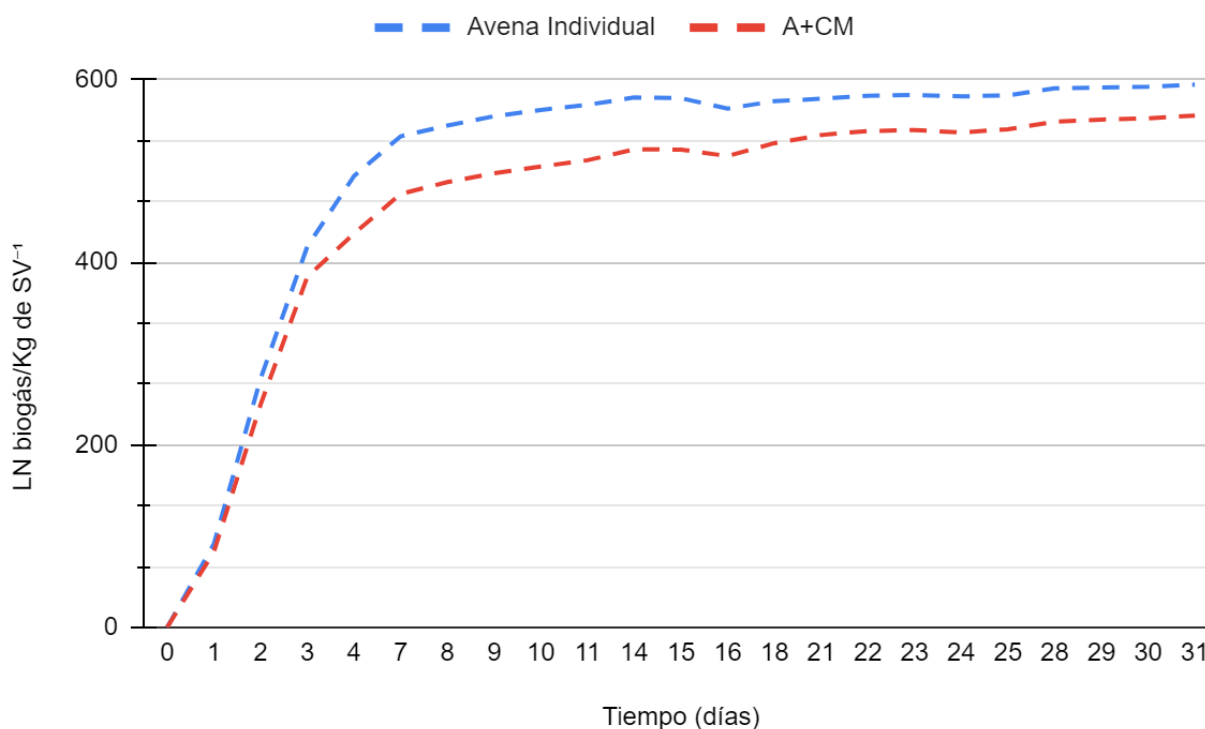
Ensayo	Biogás LN/Kg SV <sup>-1</sup>	Metano LN/Kg SV <sup>-1</sup>	Metano (%)
AI	595±17,9	315±7,5	53
A+CM	561±26,5	319±0,0	57

AI: Avena Individual; A+CM: Avena + Cultivo Mixto.

Fuente: La autora, 2024.

Las mediciones de los ensayos fueron finalizados luego de 31 días, una vez que el volúmen medido empezara a ser 0,5% menos del total de volumen acumulado, de acuerdo a la guía VDI 4630 (VDI 4630, 2016). En el **Gráfico 3** se puede observar como la producción en ambas muestras presenta una caída abrupta entre los días 15 y 18, y luego empieza a subir nuevamente. Este fenómeno puede relacionarse a una falla del controlador de temperatura que luego fue solucionado. También se puede observar que la producción de biogás en ambas muestras crece exponencialmente hasta aproximadamente el día 10 y luego el gráfico adopta una apariencia lineal, esto puede significar que la mayor parte del material orgánico disponible fue degradado hasta ese momento.

**Gráfico 3:** Promedio de producción acumulada de biogás en el ensayo de PBM. AI: Avena Individual; A+CM: Avena + Cultivo Mixto.



Fuente: La autora, 2024.

La producción de biogás tuvo inicio inmediatamente luego de la incubación de las dos muestras en cuestión. Los resultados mostraron una menor producción de biogás en el ensayo con A+CM con relación al resultado del ensayo con avena individual. Sin embargo, como presentado en la **Tabla 5**, el contenido de metano fue 4 % mayor en el ensayo con A+CM comparado con el ensayo con avena individual. La muestra de avena en estudio, presentó valores de degradabilidad de 92,23% en el ensayo de avena individual más inóculo y 91,76% para la avena más CM, es decir, del total de biogás producido en los dos ensayos, más del 90% fue proveniente de la avena.

La curva cinética de producción de biogás para el ensayo A+CM, como puede ser observado en el **gráfico 3**, tiene un comportamiento similar al gráfico del ensayo con Avena Individual, sin embargo, el primer ensayo mencionado posee la inclinación de producción máxima antes que el ensayo de la Avena individual. Esto indica que la producción máxima de biogás del ensayo A+CM es menor que lo obtenido en el ensayo de la Avena Individual. Esta diferencia puede estar relacionada a muchos factores, como los mencionados anteriormente en la sección **2.2.2** que a su vez pueden

estar relacionados directamente al aumento de la concentración de sólidos fijos proporcionados por la muestra del CM, estos sólidos fijos que en su mayoría pueden estar representados por minerales presentes en el suelo Antártico, pueden formar una capa de sedimento que dificulte la actividad de los microorganismos y así disminuir la producción de biogás. La diferencia en la producción de biogás para cada ensayo puede ser debido a cualquiera de los factores mencionados anteriormente, independientemente si en cada ensayo existe una variable diferente o no, debido a que diferencias mínimas en las masas o en las condiciones pueden afectar la producción de manera única.

La avena representa una importante fuente para la producción de biogás por las toneladas de residuos que la producción de esta genera cada año a nivel mundial. Según la USDA - *Foreign Agricultural Service*, (2023), la producción mundial de avena entre los años 2022/2023 fue de 25,24 millones de toneladas métricas. Sin embargo, la digestión anaeróbica de la avena todavía presenta una barrera que es su naturaleza lignocelulósica. Debido a que las enzimas deben romper la membrana de barrera de la lignina para poder tener acceso a la holocelulosa, la velocidad de reacción está directamente relacionada con el área de superficie a la que pueden acceder las bacterias hidrolizantes (KUSCH et al., 2011; TONG et al., 1990).

La técnica de bioaumentación con cultivos mixtos puede ser un paso clave para estudios relacionados a mejoramiento de digestión anaeróbica de materiales lignocelulósicos. Sin embargo, en este estudio los resultados en la producción de biogás de avena no fueron muy satisfactorios con la bioaumentación utilizando el ESE. Una alternativa es la utilización del ESE realizado luego de estudios de mejoramientos en la metodología, como la evaluación de diferentes medios de cultura, diferentes condiciones y otros sustratos diferentes de la avena. Además, como visto anteriormente en la sección **2.2.2**, la digestión anaeróbica está influenciada por varios factores que se interrelacionan, lo que la hace un proceso muy complejo que necesita ser estudiada con más profundidad sobre la relación óptima de los factores mencionados y las proporciones adecuadas para que estos funcionen de manera equilibrada, y así poder aprovechar la técnica de la bioaumentación de una manera más precisa y consecuentemente viable.

La mayoría de los trabajos sobre bioprospección y aplicación de microorganismos metanogénicos en ambientes fríos han sido volcados a lagos y permafrost del hemisferio norte (MACHÍN OLIVERA, 2022). No se han hallado estudios de PBM de sustratos lignocelulósicos utilizando extracto de suelo de la Antártica y en las condiciones presentadas en el presente trabajo. Por lo tanto, es necesaria la realización

de otros estudios para conocer mejor el potencial de producción de biogás y metano proveniente de extracto de suelo antártico. La mayoría de los estudios sobre microorganismos metanogénicos de la antártica son trabajos que confirman la diversidad de comunidades y la actividad metanogénica de estos, usando métodos moleculares o realizando ensayos en anaerobiosis y utilizando sustratos específicos de la digestión anaeróbica como H<sub>2</sub>, acetato o compuestos metilados para la determinación de actividad metanogénica (MACHÍN OLIVERA, 2022; RAFAEL, 2018; FRANCO et al., 2011). Este es un paso muy importante para la confirmación de presencia de arqueas metanogénicas en el suelo enriquecido, pero debido a la poca disponibilidad de tiempo no fue posible su realización para este trabajo, por lo que puede ser un trabajo para estudios posteriores.

Todavía no se han reportado trabajos sobre digestión anaeróbica realizados con microorganismos provenientes de la Isla Deception. Un estudio sobre diversidad y adaptación procariótica en la Isla Deception, relata que los grupos y arqueas hallados en la Isla, específicamente en Whalers Bay y Fumarole Bay, presentaron una combinación taxonómica única en comparación con otros ambientes geotermales, ya que en esta habitan microorganismos normalmente encontrados en ambientes geotermales continentales, como marinos poco y muy profundos. Además, una de las observaciones del autor es que las comunidades microbianas de la Isla poseen diferentes respuestas metabólicas y adaptativas de acuerdo a los gradientes de temperatura. También menciona que parámetros de pH, amoníaco y nitrato influenciaron positivamente a la diversidad de arqueas. Y en cuanto a la diversidad de arqueas, los resultados indicaron que las arqueas son predominantes en sedimentos de hieleras y que estos son en su mayoría representados por arqueas metanogénicas de la orden Methanomassiliicoccales y Thermoplasmatales (BENDIA, 2017). En este contexto, los trabajos sobre diversidad de metagenómicos de la Antártica sirven como justificativa y una puerta para otros estudios para su aplicación en la producción de biogás a partir de residuos lignocelulósicos.

## **6. CONSIDERACIONES FINALES**

Los resultados del PBM de avena presentados, demuestran que la avena es un material con una característica fisicoquímica con buen potencial para la producción de biogás. Sin embargo, la principal barrera es la característica rígida proporcionada por su naturaleza lignocelulósica que afecta la velocidad de reacción de la degradación

anaeróbica. A causa de esto y buscando alternativas amigables con el ambiente, el uso de cultivos microbiológicos en estudios de mejoramiento de digestión anaeróbica puede presentar resultados satisfactorios.

Los resultados del ensayo con avena individual demostraron una mayor producción de biogás comparado con el ensayo con avena y cultivo mixto a partir de extracto de suelo enriquecido (ESE), sin embargo, el contenido de metano presentado por el ensayo de avena y cultivo mixto fue 4% mayor que en el ensayo con avena individual (57% y 54% respectivamente). Por otra parte, son necesarios más estudios para saber con más profundidad sobre el cultivo metanogénico de ambientes fríos y su potencial para contribuir al mejoramiento de digestión anaeróbica de materiales lignocelulósicos, además de la relación entre diferentes comunidades microbiológicas.

Son muchos los factores que pueden influenciar en los resultados de cada ensayo, por lo tanto, la adición de un factor más puede o no ser responsable de las variaciones en los resultados. Una propuesta para próximos trabajos podría ser el estudio de actividad metanogénica del cultivo mixto individual.

## BIBLIOGRAFIA

ACHINAS, S. et al. Influence of sheep manure addition on biogas potential and methanogenic communities during cow dung digestion under mesophilic conditions. **Sustainable Environment Research**, v. 28, n. 5, p. 240–246, 1 set. 2018.

AKKARAWATKHOOSITH, N.; KAEWCHADA, A.; JAREE, A. High-throughput CO<sub>2</sub> capture for biogas purification using monoethanolamine in a microtube contactor. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers, Microreactor: Fundamentals and Applications in Chemical Engineering*. v. 98, p. 113–123, 1 maio 2019.

ALEXIS, P.-O. B. et al. Efecto de la relación sustrato-inóculo sobre el potencial bioquímico de metano de biorresiduos de origen municipal. **Ingeniería, Investigación y Tecnología**, v. 16, n. 4, p. 515–526, 1 out. 2015.

Al Seadi, T., Rutz, D., Prassl, H., Köttner, M., Finsterwalder, T., Volk, S., Janssen, R., 2008. *Biogas Handbook*, Igarss 2014. <https://doi.org/10.1533/9780857097415.1.85>

Angelidaki, I., Alves, M., Bolzonella, D., Borzacconi, L., Campos, J. L., Guwy, A. J., Kalyuzhnyi, S., Jenicek, P., & Lier, J. B. Van. (2009). Defining the biomethane potential (BMP) of solid organic wastes and energy crops : a proposed protocol for batch assays. 927–934. <https://doi.org/10.2166/wst.2009.040>

Angelidaki, I., Karakashev, D., Batstone, D.J., Plugge, C.M., Stams, A.J.M., 2011. *Biomethanation and its potential*, 1st ed, *Methods in Enzymology*. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-385112-3.00016-0>

Appels, L., Baeyens, J., Degre, J., Dewil, R., 2008. Principles and potential of the anaerobic digestion of waste-activated sludge 34, 755–781. <https://doi.org/10.1016/j.pecs.2008.06.002>

BANIK, S. Jute caddis — A new substrate for biogas production. *Journal of Scientific and Industrial Research*, v. 63, 1 set. 2004.

BENDIA, A. G. **A vida microbiana em um vulcão antártico: diversidade e adaptação procariótica na Ilha *Deception***. Doutorado em Microbiologia—São Paulo: Universidade

de São Paulo, 11 maio 2017.

Bharathiraja, B., Sudharsanaa, T., Bharghavi, A., Jayamuthunagai, J., Praveenkumar, R., 2016. Biohydrogen and Biogas – An overview on feedstocks and enhancement process. Fuel 185, 810–828. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2016.08.030>

BOTELHO, M. H. C.; LYRA, P. G. Revista DAE - Artigo - Interpretação das análises sanitárias de despejos tendo em vista seus tratamentos. Disponível em: <<https://revistadae.com.br/site/artigo/434-Interpretacao-das-analises-sanitarias-de-despejos-tendo-em-vista-seus-tratamentos>>. Acesso em: 9 abr. 2024.

BRES, P. A. **Optimización de la digestión anaeróbica del guano de aves ponedoras.** info:ar-repo/semantics/tesis doctoral—[s.l.] Instituto de Investigación e Ingeniería Ambiental, Universidad Nacional de San Martín, 2019.

BRES, P.; BEILY, M. E.; CRESPO, D. Ensayo potencial bioquímico metanogénico: Una metodología clave para conocer la energía de las biomásas. [s.l.] Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, 2022.

CASELLI, A. et al. Seismic activity and an anomalous fumarolic chemical composition due to seal effect in the volcanic system of Deception Island (Antarctica). **Revista de la Asociación Geológica Argentina**, v. 62, p. 545–552, 1 jan. 2007.

COELHO, A. A. UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS DEPARTAMENTO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS CURSO DE GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS. 2020.

CORNET, C.; EUVERINK, G. J. W. **Inhibiting factors in the anaerobic digestion process for biogas production.** bachelor—Groningen: Faculty of Science and Engineering, 2017.

DIN 38414 - Part 8 (1985 – Sludge and sediments (group S): Determination of the amenability to anaerobic digestion

DITTMER, C. L. et al. OBTENÇÃO DE FIBRAS DE CELULOSE A PARTIR DA CASCA DE

AVEIA. 2015.

Divya, D., Gopinath, L.R., Christy, P.M., 2015. A review on current aspects and diverse prospects for enhancing biogas production in sustainable means. *Renew. Sustain. Energy Rev.* 42, 690–699. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2014.10.055>

DUBROVSKIS, V.; PLUME, I. Suitability of oat bran for methane production. 2017.

Easterbrook, D. J. (2016). Greenhouse Gases. *Evidence-Based Climate Science*, 163–173. DOI:10.1016/b978-0-12-804588-6.00009-4.

ELSAID, K. et al. Recent progress on the utilization of waste heat for desalination: A review. *Energy Conversion and Management*, v. 221, p. 113105, 1 out. 2020.

FRANCO, D. C. et al. Caracterização de comunidades de arqueias metanogênicas em sedimentos marinhos ao longo de um gradiente de profundidade na Baía do Almirantado e estreito de Bransfield, Ilha Rei George, Antártica. **Caderno de Resumos**, 2011.

Foster Carneiro, T., 2005. Digestión anaerobia termofílica seca de residuos sólidos urbanos : estudio de las variables del proceso en el arranque y estabilización del bio-reactor. *Dep. Ing. Química. Tecnol. Aliment. y Tecnol. del Medio Ambient. Univ. Cádiz, España*. 1–383.

Guebitz, G.M., Bauer, A., Bochmann, G., Gronauer, A., Weiss, S., 2015. *Biogas Science and Technology*, *Biogas Science and Technology*. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-21993-6>

HACH LANGE Information “Routine-Analytik für Biogas”, Art.No. DOC032.72.20007.APR07

HAO, L. et al. Waste-to-wealth: Sustainable conversion of polyester waste into porous carbons as efficient solar steam generators. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, v. 115, p. 71–78, 1 out. 2020.

IRENA (2021), Renewable capacity statistics 2021 International Renewable Energy Agency (IRENA), Abu Dhabi.

JIANG, J. et al. Bioaugmentation to enhance anaerobic digestion of food waste: Dosage, frequency and economic analysis. *Bioresource Technology*, v. 307, p. 123256, 1 jul. 2020.

Khanal, S.K., 2008. *Anaerobic Biotechnology for Bioenergy Production* Anaerobic Biotechnology for Bioenergy Production.

Kundu, K., Bergmann, I., Klocke, M., Sharma, S., Sreekrishnan, T.R., 2014. Influence of hydrodynamic shear on performance and microbial community structure of a hybrid anaerobic reactor. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 89, 462–470.

KUSCH, S. et al. Methane yield of oat husks. *Biomass and Bioenergy*, v. 35, n. 7, p. 2627–2633, 1 jul. 2011.

Lei, C., 2018. Microbiology of biogas fermentation, in: *Biogas Institute of Ministry of Agriculture and Rural Affairs (BIOMA) (Ed.), Training Course on Biogas Technology in the Treatment and Utilization of Agricultural Waste for Developing Countries*. South Remnmin Road, Chengdu, China, pp. 14–22.

Lesteur, M., Bellon-Maurel, V., Gonzalez, C., Latrille, E., Roger, J. M., Junqua, G., & Steyer, J. P. (2010). Alternative methods for determining anaerobic biodegradability: A review. *Process Biochemistry*, 45(4), 431–440.  
<https://doi.org/10.1016/j.procbio.2009.11.018>

Lindmark, J., Thorin, E., Fdhila, R.B., Dahlquist, E., 2014. Effects of mixing on the result of anaerobic digestion. *Renew. Sustain. Energy Rev.* 40, 1030–1047.

Li, L., He, Qingming, Wei, Y., He, Qin, Peng, X., 2014. Early warning indicators for monitoring the process failure of anaerobic digestion system of food waste. *Bioresour. Technol.* 171, 491–494. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.08.089>

LINSONG, H. et al. Bioaugmentation with methanogenic culture to improve methane production from chicken manure in batch anaerobic digestion. *Chemosphere*, v. 303, p.

135127, 1 set. 2022.

LI, X. et al. Process synthesis and simultaneous optimization of extractive distillation system integrated with organic Rankine cycle and economizer for waste heat recovery. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, v. 102, p. 61–72, 1 set. 2019.

LORENZO, Y.; ABREU, M. La digestión anaerobia. Aspectos teóricos. Parte I. **ICIDCA. Sobre los Derivados de la Caña de Azúcar**, v. XXXIX, p. 35–48, 1 jan. 2005.

MACHÍN OLIVERA, E. V. *Metanogénesis en lagos de la Antártida marítima*. 2022.

Mao, C., Feng, Y., Wang, X., Ren, G., 2015. Review on research achievements of biogas from anaerobic digestion. *Renew. Sustain. Energy Rev.* 45, 540–555.  
<https://doi.org/10.1016/j.rser.2015.02.032>

Meegoda, J.N., Li, B., Patel, K., Wang, L.B., 2018. A review of the processes, parameters, and optimization of anaerobic digestion. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 15.  
<https://doi.org/10.3390/ijerph15102224>

Metje, M., & Frenzel, P. (2007). Methanogenesis and methanogenic pathways in a peat from subarctic permafrost. *Environmental Microbiology*, 9(4), 954–964.  
DOI::10.1111/j.1462-2920.2006.01217.x.

MISHRA, A. et al. Multidimensional approaches of biogas production and up-gradation: Opportunities and challenges. *Bioresource Technology*, v. 338, p. 125514, 1 out. 2021.

Moody, L., Burns, R., Wu-Haan, W., Spajic, R., & Spajić, R. (2009). Use of biochemical methane potential (BMP) assays for predicting and enhancing anaerobic digester performance. *Proceedings of The 4th International and 44th Croatian Symposium of Agriculture*, 930–934. [http://sa.agr.hr/pdf/2009/sa2009\\_p1009.pdf](http://sa.agr.hr/pdf/2009/sa2009_p1009.pdf)

MØLLER, H. B.; SOMMER, S. G.; AHRING, B. K. Methane productivity of manure, straw and solid fractions of manure. *Biomass and Bioenergy*, v. 26, n. 5, p. 485–495, 1 maio 2004.

MOSIER, N. et al. Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. *Bioresource Technology*, v. 96, n. 6, p. 673–686, 1 abr. 2005.

Oats | USDA Foreign Agricultural Service. Disponível em: <<https://fas.usda.gov/data/production/commodity/0452000>>. Acesso em: 29 mar. 2024.

OBAIDEEN, K. et al. Biogas role in achievement of the sustainable development goals: Evaluation, Challenges, and Guidelines. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, v. 131, p. 104207, 1 fev. 2022.

OLABI, A. G. et al. Application of nanofluids for enhanced waste heat recovery: A review. *Nano Energy*, v. 84, p. 105871, 1 jun. 2021.

PRINSEN, P. Composición química de diversos materiales lignocelulósicos de interés industrial y análisis estructural de sus ligninas. 2010.

Prof. Dr. Peter Weiland, Christa Rieger, Institut für Technologie und Biosystemtechnik, Abt. Technologie, Bundesforschungsanstalt für Landwirtschaft (FAL): “Prozessstörungen frühzeitig erkennen”, *BIOGAS Journal* 4/06

RABAIA, M. K. H. et al. Environmental impacts of solar energy systems: A review. *Science of The Total Environment*, v. 754, p. 141989, 1 fev. 2021.

RAFAEL, L. S. [UNIFESP. Estudos sobre a produção biogênica de metano em sedimento marinho próximo à Geleira Wanda, Ilha Rei George, Península Antártica. 8 jun. 2018.

RAPER, E. et al. Industrial wastewater treatment through bioaugmentation. *Process Safety and Environmental Protection*, v. 118, p. 178–187, 1 ago. 2018.

Raposo, F., Banks, C. J., Siegert, I., Heaven, S., & Borja, R. (2006). Influence of inoculum to substrate ratio on the biochemical methane potential of maize in batch tests. *Process Biochemistry*, 41(6), 1444–1450. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2006.01.012>

Raposo, F., De La Rubia, M. A., Fernández-Cegrí, V., & Borja, R. (2012). Anaerobic digestion of solid organic substrates in batch mode: An overview relating to methane yields and experimental procedures. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 16(1), 861–877. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2011.09.008>

SAYED, E. T. et al. A critical review on environmental impacts of renewable energy systems and mitigation strategies: Wind, hydro, biomass and geothermal. *Science of The Total Environment*, v. 766, p. 144505, 20 abr. 2021.

SALILIH, E. M. et al. Annual performance analysis of small scale industrial waste heat assisted solar tower power plant and application of nanofluid. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers, Applications of Nanofluid in Renewable Energy*. v. 124, p. 216–227, 1 jul. 2021.

SEQUEDA BARROS, R. et al. Evaluation of the methanogenic potential of anaerobic digestion of agro-industrial wastes. *Heliyon*, v. 9, n. 3, p. e14317, 1 mar. 2023.

Schnurer, A., Jarvis, A., 2010. Microbiological handbook for biogas plants. *Swedish Waste Manag. U 2009*, 1–74.

Solomon, S., Quin, D., Manning, M., Marquis, M., Averyt, K., Tinor M. M. B., LeRoy Miller, H. (eds). 2007. *Climate Change 2007: The Physical Science Basis*. Cambridge University Press: Cambridge.

Tabatabaei, M., Ghanavati, H., 2018. Biogas. Fundamentals, process and operation., in: Kumar Gupta, V., Tuohy, M.G. (Eds.), *Biofuel and Biorefinery Technologies*. Springer International Publishing AG, Switzerland, p. 471.  
<https://doi.org/https://doi.org/10.1007/978-3-319-77335-3>

TONG, X.; SMITH, L. H.; MCCARTY, P. L. Methane fermentation of selected lignocellulosic materials. *Biomass*, v. 21, n. 4, p. 239–255, 1 jan. 1990.

US EPA, O. Climate Change Indicators: Greenhouse Gases. Reports and Assessments. Disponível em: <<https://www.epa.gov/climate-indicators/greenhouse-gases>>. Acesso em: 5 abr. 2024.

V.D.I. (2016). VDI 4630. Fermentation of organic materials. Characterization of the substrate, sampling, collection of material data, fermentation tests. ICS 13.030.30; 27.190.

XU, X. et al. Bioaugmentation with cold-tolerant methanogenic culture to boost methane production from anaerobic co-digestion of cattle manure and corn straw at 20°C. Chemical Engineering Journal, v. 466, p. 143183, 15 jun. 2023.