



UNIVERSIDAD REGIONAL AMAZÓNICA IKIAM

FACULTAD DE CIENCIAS DE LA VIDA

CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

**EVALUACIÓN DEL POTENCIAL METANOGÉNICO DE
CONSORCIOS MICROBIANOS LACUSTRES ACLIMATADOS A
TEMPERATURAS PSICRÓFILAS Y MESÓFILAS EN LAS
PROVINCIAS IMBABURA Y NAPO**

Proyecto de investigación previo a la obtención del Título de:

INGENIERA EN BIOTECNOLOGÍA

AUTORA: JOYCE CATHERYN ANDRADE OÑA

TUTOR: Ph.D. Jaime Martí Herrero

CO-TUTORA: Ph.D. Zulay Niño Ruiz

Napo - Ecuador

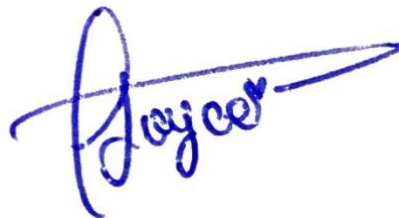
2024

DECLARACIÓN DE DERECHO DE AUTOR, AUTENTICIDAD Y RESPONSABILIDAD

Yo, JOYCE CATHERYN ANDRADE OÑA con documento de identidad N°1751485481, declaro que los resultados obtenidos en la investigación que presento en este documento final, previo a la obtención del título de Ingeniería en Biotecnología, son absolutamente inéditos, originales, auténticos y personales.

En virtud de lo cual, el contenido, criterios, opiniones, resultados, análisis, interpretaciones, conclusiones, recomendaciones y todos los demás aspectos vertidos en la presente investigación son de mi autoría y de mi absoluta responsabilidad.

Tena, 26 de febrero de 2024



Joyce Catheryn Andrade Oña

C.I: 1751485481

AUTORIZACIÓN DE PUBLICACION EN EL REPOSITORIO INSTITUCIONAL

Yo, JOYCE CATHERYN ANDRADE OÑA, con documento de identidad N° 1751485481, en calidad de autor/a y titular de los derechos morales y patrimoniales del trabajo de titulación: EVALUACIÓN DEL POTENCIAL METANOGENICO DE CONSORCIOS MICROBIANOS LACUSTRES ACLIMATADOS A TEMPERATURAS PSICRÓFILAS Y MESÓFILAS EN LAS PROVINCIAS IMBABURA Y NAPO de conformidad con el Art. 114 del CÓDIGO ORGÁNICO DE LA ECONOMÍA SOCIAL DE LOS CONOCIMIENTOS, CREATIVIDAD E INNOVACIÓN, reconozco a favor de la Universidad Regional Amazónica Ikiam una licencia gratuita, intransferible y no exclusiva para el uso no comercial de la obra, con fines estrictamente académicos.

Así mismo autorizo a la Universidad Regional Amazónica Ikiam para que realice la publicación de este trabajo de titulación en el Repositorio Institucional de conformidad a lo dispuesto en el Art. 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.

Tena, 26 de febrero de 2024



Joyce Catheryn Andrade Oña

C.I:1751485481

CERTIFICADO DE DIRECCIÓN DE TRABAJO DE INTEGRACIÓN CURRICULAR

Certifico que el Trabajo de Integración Curricular Titulado: EVALUACIÓN DEL POTENCIAL METANOGENICO DE CONSORCIOS MICROBIANOS LACUSTRES ACLIMATADOS A TEMPERATURAS PSICRÓFILAS Y MESÓFILAS EN LAS PROVINCIAS IMBABURA Y NAPO, en la modalidad: proyecto de investigación formato artículo, fue realizado por: Joyce Catheryn Andrade Oña, bajo mi dirección.

El mismo ha sido revisado en su totalidad y analizado por la herramienta de verificación de similitud de contenido; por lo tanto, cumple con los requisitos teóricos, científicos, técnicos, metodológicos y legales establecidos por la Universidad Regional Amazónica Ikiam, para su entrega y defensa.

Tena, 26 de febrero de 2024



Jaime Emilio Martí Herrero

C.I:1757205651



Zulay Marina Niño Ruiz

C.I:1757560303

AGRADECIMIENTO

Agradezco a mi familia, en especial a mis padres Beatriz Oña y Fernando Andrade y a mi hermana Soledad Nicolalde, quienes me supieron aconsejar y brindar su amor incondicional, permitiéndome culminar con este paso importante en mi vida. Su apoyo fue fundamental en cada etapa de este proceso.

Mención especial al PhD. Jaime Martí Herrero y a la PhD. Zulay Niño Ruiz, tutor y co-tutora de esta investigación, quienes me acogieron como tesista y me brindaron constantes asesoramientos en cada uno de los pasos a seguir en esta investigación.

Se reconoce y agradece al ministerio ecuatoriano MAATE (Ministerio del Ambiente, Agua y Transición Ecológica) por haber facilitado la autorización del Trámite N°MAATE-ARSFC-2023-0358.

Expreso mi sincero agradecimiento a todas las personas que formaron parte de esta investigación, incluyendo compañeros y amigos que estuvieron a mi lado desde la fase inicial de la recolección de muestras, durante las diversas caminatas y en los distintos momentos de transporte hasta llegar a la URAI.

TABLA DE CONTENIDOS

DECLARACIÓN DE DERECHO DE AUTOR, AUTENTICIDAD Y RESPONSABILIDAD	ii
AUTORIZACIÓN DE PUBLICACION EN EL REPOSITORIO INSTITUCIONAL	iii
CERTIFICADO DE DIRECCIÓN DE TRABAJO DE INTEGRACIÓN CURRICULAR..	iv
AGRADECIMIENTO.....	v
RESUMEN	x
ABSTRACT	xi
RESUMEN	1
1. INTRODUCCIÓN.....	2
2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	5
2.1. Origen del inóculo	5
2.2. Configuración Experimental para los ensayos de AME y PBM	6
2.3. Actividad Metanogénica Específica (AME)	6
2.4. Potencial Bioquímico de Metano (PBM)	7
2.5. Medición de los gases	7
2.6. Análisis estadístico	8
3. RESULTADOS	9
3.1. Metanogénesis.....	9
3.2. Producción de Metano en Reactores Batch.....	10
3.3. Análisis estadístico en la producción de CH ₄	12
4. DISCUSIÓN.....	14
4.1. Inóculos mesófilos en condiciones psicrófilas	14
4.2. Producción de CH ₄ acumulado en el tiempo en base a la RIS	14
5. CONCLUSIÓN	17
AGRADECIMIENTOS	
REFERENCIAS	
ANEXOS	

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1-2: Parámetros físico-químicos de los inóculos en estudio.	5
Tabla 2-2: Configuración experimental para el ensayo AME a diferentes temperaturas.	6
Tabla 3-2: Configuración experimental para el ensayo PBM a diferentes temperaturas y distintas RIS	6
Tabla 4-3: Valores de la producción de Metano con diferentes RIS y temperaturas para cada inóculo. Análisis estadístico entre las temperaturas en la producción de CH ₄	13
Tabla 5-A: Análisis de varianza de dos factores con varias muestras por grupo para el inóculo IP, considerando las RIS: 1, 2 y 4 a 37°C para el ensayo PBM.	
Tabla 6-A: Análisis de varianza de dos factores con varias muestras por grupo para los distintos inóculos a diferentes temperaturas para el ensayo AME	
Tabla 7-A: Análisis de varianza de dos factores con varias muestras por grupo para el inóculo IM, considerando las RIS a distintas temperaturas (37 y 10°C) para el ensayo PBM.	
Tabla 8-A: Análisis de varianza de dos factores con varias muestras por grupo para el inóculo IC, considerando las RIS a distintas temperaturas (37 y 25°C) para el ensayo PBM.	

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1-3: Valores Acumulados de Metano del ensayo AME a diferentes temperaturas (a), Inóculo Mojanda (b), Inóculo Papallacta (c), Inóculo Caimán.	9
Figura 2-3: Producción de metano acumulado en el tiempo para el inóculo IM con diferentes RIS y temperaturas.....	11
Figura 3-3: Producción de metano acumulado en el tiempo para el inóculo IP con diferentes RIS a 37 °C.....	11
Figura 4-3: Producción de metano acumulado en el tiempo para el inóculo IM con diferentes RIS y temperaturas.....	11
Figura 5-3: Tasa de producción de metano (AME) a la temperatura original (10, 14 y 25 °C) y a 37 °C para cada inóculo.	12

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1-A: Experimentación (a), Sistema de medición para los ensayos AME y PBM	
(b), Reactores Batch para los ensayos AME y PBM.....	7

RESUMEN

La digestión anaeróbica (DA), esencial para reacciones biológicas complejas, depende de consorcios microbianos. Sin embargo, su implementación óptima a 37°C resulta costosa en climas fríos. Este estudio evaluó inóculos de consorcios lacustres aclimatados a diversas temperaturas para analizar su capacidad de producción de metano (CH_4) a distintas temperaturas. Se examinaron consorcios de tres lagunas: Mojanda (4.263 msnm), Papallacta (3.250 msnm) y Caimanes (510 msnm). Se emplearon la actividad metanogénica específica (AME) y el potencial bioquímico de metano (PBM) de celulosa bajo condiciones estándares y adaptadas al inóculo. El AME reveló mayor producción de metano para Caimanes a 37°C (0.021 g DQO/g SV), mientras que Mojanda mostro la menor a 10°C (0.005 g DQO/g SV), con nula producción para Papallacta a bajas temperaturas. El ensayo de PBM exhibió variación en la producción según temperaturas y Relaciones Inoculo/Sustrato (RIS). Caimanes destaco con la mayor producción de metano a RIS 2 y 37°C (409 NmL CH_4 /g SV), Papallacta presento (203 NmL CH_4 /g SV) a RIS 2, y Mojanda evidenció la máxima producción a RIS 4 (137 NmL CH_4 /g SV). La producción de metano a temperaturas bajas fue significativamente inferior, indicando una mayor eficiencia en rangos mesófilos y sugiriendo naturaleza psicotrófica en lugar de psicrófila en estos inóculos. Estos resultados resaltan la adaptabilidad de los consorcios a temperaturas variadas y tienen implicaciones prácticas para optimizar la DA en climas fríos.

Palabras claves: Digestión Anaerobia, Inóculo, Temperatura, AME, PBM

ABSTRACT

Anaerobic digestion (AD), essential for complex biological reactions, relies on microbial consortia. However, their optimal implementation at 37°C is costly in cold climates. This study evaluated inocula from lake consortia acclimated to various temperatures to analyze their methane (CH_4) production capacity at different temperatures. Consortia from three lagoons were examined: Mojanda (4,263 masl), Papallacta (3,250 masl), and Caimanes (510 masl). Specific methanogenic activity (SMA) and cellulose biochemical methane potential (BPM) were used under standard and inoculum-adapted conditions. SMA revealed the highest methane production for Caimanes at 37°C (0.021 g COD/g SV), while Mojanda showed the lowest at 10°C (0.005 g COD/g SV), with no production for Papallacta at low temperatures. The BPM trial exhibited variation in production according to temperatures and Inoculum/Substrate Ratios (ISR). Caimanes stood out with the highest production at RIS 2 and 37°C (409 NmL CH_4 /g SV), Papallacta presented (203 NmL CH_4 /g SV) at RIS 1, and Mojanda showed the highest production at RIS 4 (137 NmL CH_4 /g SV). Methane production at lower temperatures was significantly lower, indicating higher efficiency in mesophilic ranges and suggesting a psychrotrophic rather than psychrophilic nature in these inocula. These results highlight the adaptability of the consortia to varied temperatures and have practical implications for optimizing AD in cold climates.

Keywords: Anaerobic Digestion, Inoculum, Temperature, SMA, BPM

EVALUACIÓN DEL POTENCIAL METANOGÉNICO DE CONSORCIOS MICROBIANOS LACUSTRES ACLIMATADOS A TEMPERATURAS PSICRÓFILAS Y MESÓFILAS EN LAS PROVINCIAS IMBABURA Y NAPO

J. Andrade-Oña ^a, J. Martí-Herrero ^a, Z. Niño-Ruiz ^a

^a Laboratorio de Biomasa, Grupo de investigación Biomass to Resource, Universidad Regional Amazónica Ikiam, Tena, Ecuador

RESUMEN

La digestión anaeróbica (DA), esencial para reacciones biológicas complejas, depende de consorcios microbianos. Sin embargo, su implementación óptima a 37°C resulta costosa en climas fríos. Este estudio evaluó inóculos de consorcios lacustres aclimatados a diversas temperaturas para analizar su capacidad de producción de metano (CH_4) a distintas temperaturas. Se examinaron consorcios de tres lagunas: Mojanda (4.263 msnm), Papallacta (3.250 msnm) y Caimanes (510 msnm). Se emplearon la actividad metanogénica específica (AME) y el potencial bioquímico de metano (PBM) de celulosa bajo condiciones estándares y adaptadas al inóculo. El AME reveló mayor producción de metano para Caimanes a 37°C (0.021 g DQO/g SV), mientras que Mojanda mostro la menor a 10°C (0.005 g DQO/g SV), con nula producción para Papallacta a bajas temperaturas. El ensayo de PBM exhibió variación en la producción según temperaturas y Relaciones Inoculo/Sustrato (RIS). Caimanes destaco con la mayor producción de metano a RIS 2 y 37°C (409 NmL CH_4 /g SV), Papallacta presento (203 NmL CH_4 /g SV) a RIS 2, y Mojanda evidenció la máxima producción a RIS 4 (137 NmL CH_4 /g SV). La producción de metano a temperaturas bajas fue significativamente inferior, indicando una mayor eficiencia en rangos mesófilos y sugiriendo naturaleza psicotrónica en lugar de psicrófila en estos inóculos. Estos resultados resaltan la adaptabilidad de los consorcios a temperaturas variadas y tienen implicaciones prácticas para optimizar la DA en climas fríos.

Palabras claves: Digestión Anaerobia, Inóculo, Temperatura, AME, PBM

1. INTRODUCCIÓN

La digestión anaerobia (DA) es un proceso biológico en el cual los microorganismos descomponen la materia orgánica en ausencia de oxígeno para producir biogás y digestato como subproducto [1]. Este proceso biológico, llevado a cabo en biodigestores, se compone de cuatro etapas cruciales: hidrólisis, acidogénesis, acetogénesis y metanogénesis [2]. En la etapa de la metanogénesis dos vías metabólicas principales influyen en la producción de metano: la utilización de acetato y la combinación de H_2/CO_2 . A pesar de que la metanogénesis hidrogenotrófica es termodinámicamente más favorable, aproximadamente el 70 % de la producción de biogás proviene de la vía del acetato.

Las condiciones ambientales, especialmente la temperatura, y la presencia de residuos lignocelulósicos han sido factores limitantes en la eficiencia de la DA [3]. En regiones caracterizadas por climas cálidos, el mantenimiento y funcionamiento de los digestores anaeróbicos revelan una eficiencia destacada. Este rendimiento se atribuye al hecho de que los biodigestores en países más desarrollados son calentados para mantener una temperatura constante, generalmente en el rango de 35-37 °C, siendo así como aseguran las condiciones mesofílicas óptimas para su operación. Sin embargo, a temperaturas bajas, la velocidad de la digestión anaerobia empieza a decaer, conllevando a la reducción de la producción de biogás [3], si es que no se aumenta el tiempo de retención del reactor. Por debajo de los 15°C los digestores anaeróbicos que operan con inóculos mesofílicos, pierden más del 90 % de su actividad metanogénica [4], cuando no existe adaptación del inóculo y no se incrementa el tiempo de retención. La eficiencia de la DA a temperaturas templadas o frías puede potenciarse mediante la optimización de la configuración de los reactores utilizados, como sugiere [5] la preferencia por el lecho de lodo granular expandido. Asimismo, se destaca la opción de mejorar este proceso mediante la incorporación de un consorcio microbiano psicrófilo adaptado a bajas temperaturas [6].

En la actualidad se conoce la probable existencia de lodos activos en el fondo de lagos y lagunas, los cuales están adaptados a temperaturas bajas o psicrófilas [7]. Entre los ecosistemas naturales, los humedales destacan como la principal fuente de emisiones de metano CH_4 [8,9]. Se ha demostrado que la producción biológica de metano puede ocurrir a bajas temperaturas (5-10 °C), ya sea en sedimentos de lagos [10], permafrost

[11,12] y sedimentos subglaciares. Por ejemplo, en entornos naturalmente fríos, como la alta turba del Ártico, se ha identificado la presencia de arqueas metanogénicas adaptadas a bajas temperaturas (1-5 °C) [13]. Es imprescindible mencionar que, aunque la metanogénesis ocurra a bajas temperaturas, hasta la actualidad solo se han caracterizado pocos metanógenos psicrófilos, los cuales han sido clasificados como microorganismos que tienen una temperatura óptima de crecimiento ≥ 20 °C [14].

Diferentes estudios indican que microorganismos psicrófilos o psicotróficos presentan diversos grupos funcionales involucrados en las reacciones de la producción de metano [15]. Una investigación sobre las comunidades microbianas y el potencial metanogénico en los sedimentos de humedales en las regiones altas del Ártico concluyó que la temperatura ejerce un control dominante sobre las tasas de metanogénesis y las estructuras de la comunidad metanogénica [16]. A pesar de la demostrada producción de metano en ecosistemas fríos, las arqueas metanogénicas que los habilitan generalmente se consideran psicotolerantes. La tasa de producción de metano (MPR), a partir de inóculos psicrófilos, suele aumentar con la elevación de la temperatura, alcanzando su máximo al menos a 20 °C [17,18]. No obstante, en sedimentos anóxicos constantemente a bajas temperaturas de lagos profundos en Suiza, se observó que la actividad metanogénica máxima ocurrió a baja temperatura (6 °C) dentro de un rango de 2 °C a 70 °C, evidenciando actividad psicrófila de esta comunidad metanogénica [7]. En Ecuador las formaciones de lagunas, se han dado, por procesos volcánicos, glaciares y fluviales. Tal como se observa en la provincia de Napo, en donde se encuentran las Lagunas de Papallacta-Negra (14 °C) [19] y la laguna de los Caimanes cuya temperatura es de 25 °C. Asimismo, la Laguna de Mojanda-KariCocha que se encuentra ubicada en la región Sierra con una temperatura mínima de 2 °C y máxima de 12 °C. La variación de temperaturas entre estas lagunas proporciona el contexto propicio para abordar un estudio dedicado a la producción de metano utilizando inóculos lacustres a temperaturas mesófilas y psicrófilas. Este enfoque representa un avance significativo en la exploración de fuentes alternativas de energía, ya que el potencial metanogénico acetoclástico de los suelos y sedimentos lacustres han sido poco estudiados [20]. Además, no existe evidencia de estudios previos que hayan abordado este tema.

De este modo, diversas metodologías, como el Potencial Bioquímico de Metano (PBM) y la Actividad Metanogénica Específica (AME), se aplican para evaluar el rendimiento de inóculos y sustratos en la DA [15]. El PBM es un ensayo que permite determinar el

potencial metanogénico. Este ensayo depende de varios factores como: la temperatura a la cual se va a llevar a cabo, el tipo de sustrato y la relación inóculo sustrato (RIS). Por otro lado, el ensayo AME evalúa la capacidad del inóculo en un reactor de generar la tasa máxima de producción de CH₄ [21]. Una de las características importantes de este ensayo es que el tiempo de ejecución es corto y sus resultados generan información acerca del comportamiento de los reactores [22].

Se evidencian escasos estudios en donde utilizan sedimentos/suelos de regiones constantemente frías para el tratamiento de residuos a bajas temperaturas [20]. Por lo tanto, los objetivos de esta investigación son (i) Evaluar el potencial metanogénico de consorcios microbianos lacustres adaptados a temperaturas psicrófilas y mesofílicas, y (ii) Caracterizar física y químicamente los lodos activos provenientes de las Lagunas de Mojanda-KariCocha, Papallacta-Negra y Caimanes. Este trabajo proporcionara resultados que puedan contribuir al desarrollo de las soluciones energéticas y además podría servir como un modelo de referencia para otras regiones con condiciones climáticas similares.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Origen del inóculo

Los tres inóculos estudiados están compuestos por muestras de sedimento y suelo (características fisicoquímicas disponibles en la Tabla 1; temperatura, pH, sólidos volátiles, DQO y densidad), mezclados de forma homogénea y tamizados a través de una malla de 5 mm [23] para eliminar materiales gruesos que estaban presentes. Los tres inóculos fueron:

1. **IM:** inóculo procedente de la Laguna de Mojanda (Kari-Cocha) (10 °C) ubicada en los páramos de la provincia de Imbabura (4.263 msnm/ 0.139°N, 78.267°W) y proveedora de agua a pobladores rurales y urbanos.
2. **IP:** inóculo procedente de la laguna de Papallacta-Negra (14 °C), ubicada en la provincia de Napo-Papallacta dentro del Parque Nacional Cayambe-Coca (3.250 msnm/ 0.183°S, 78.11°W) y proveedora de agua para animales como osos, venados y pumas.
3. **IC:** inóculo procedente de la Laguna de los Caimanes (Caiman-Cocha) (25 °C), que alberga reptiles, animales de sangre fría que se han adaptado a su medio, ubicada en la provincia de Napo-Ahuano (510 msnm/ 1.030°S, 77.314°W).

Todas las muestras recolectadas estaban en áreas abundantes de agua e impactadas por materia orgánica como; humedales, bosques primarios y suelos de origen volcánico.

Tabla 1-2: Parámetros físico-químicos de los inóculos en estudio.

Parámetros	IM	IP	IC
Temperatura (°C)	10	14	25
pH	7.33±1	7±1	6.85±1
SV (g/L)	64.71	49.69	39.63
DQO (mg/L)	248	779	250
Densidad (g/mL)	1.614	1.426	1.418

Realizado por: Andrade, Joyce, 2024

2.2. Configuración Experimental para los ensayos de AME y PBM

Los ensayos de AME y PBM se llevaron a cabo por triplicado (Tabla 2-2 y 3-2), en frascos de vidrio (reactores) de 135 ml con un 70 % de volumen de trabajo tanto para el blanco (inóculo, representado por la letra "B") como para la muestra (inóculo + sustrato, representado por la letra "M"), inoculados con una concentración de sólidos volátiles similar, (es decir para AME 10 g SV/L y PBM 20 g SV/L). El espacio de cabeza se lavó con un gas inerte que fue el N₂ durante 1 minuto para garantizar las condiciones anaeróbicas [20]. Los reactores se incubaron a 2 temperaturas controladas. Las temperaturas originales de cada inóculo: 10, 14 y 25 °C, y la temperatura óptima de la DA: 37 °C, con un (± 2°C precisión).

Tabla 2-2: Configuración experimental para el ensayo AME a diferentes temperaturas.

AME				
Temperatura (°C)				
IM	37		10	
	B	M	B	M
IP	37		14	
	B	M	B	M
IC	37		25	
	B	M	B	M

Realizado por: Andrade, Joyce, 2024.

Tabla 3-2: Configuración experimental para el ensayo PBM a diferentes temperaturas y distintas RIS

PBM					RIS
Temperatura (°C)					
IC	37		10		1, 2 y 4
	B	M	B	M	
IP	37		14		1, 2 y 4
	B	M			
IM	37		25		1, 2 y 4
	B	M	B	M	

Realizado por: Andrade, Joyce, 2024.

2.3. Actividad Metanogénica Específica (AME)

El ensayo AME se realizó mediante el método descrito por Astals et al., (2015) en donde se usa acetato como sustrato y la proporción de inóculo a acetato fue de 5. Además, cada inóculo fue diluido a una concentración de 10 gSV/L y se trabajó con dos temperaturas diferentes (Tabla 2). El sustrato usado fue de grado reactivo analítico; el acetato de sodio anhidrido (≥ 99.0 % de pureza) (número de lote 127-09-3).

2.4. Potencial Bioquímico de Metano (PBM)

EL PBM se llevó a cabo siguiendo las recomendaciones de Holliger et al., (2016), en donde el sustrato modelo fue la celulosa microcristalina. La relación entre SV del inóculo y SV del sustrato es un parámetro clave para este ensayo. Por lo que, al tratarse de inóculos completamente desconocidos se utilizaron tres RIS diferentes [23].

1. RIS: ≤ 1 para sustratos menos degradables.
2. RIS: ≥ 4 para sustratos fácilmente de degradar
3. RIS: 2 para un sustrato completamente desconocido.

Se aseguró que la concentración total de SV esté dentro del rango recomendado de 20 a 60 gSV/L y que la cantidad de SV del inóculo haya sido mayor a la del sustrato para evitar problemas de inhibición [20].

Los RIS empleados (1, 2 y 4) en este estudio permitieron llevar a cabo los experimentos a dos temperaturas, tanto para las temperaturas originales de IM, IC e IP como para la temperatura óptima de la DA, Tabla 3. El sustrato usado en este ensayo fue la celulosa microcristalina (Alta pureza) (número de lote 9004-34-6), se agregó como sustrato modelo para garantizar una buena calidad en la actividad del inóculo [24], esto debido a que se trabajó con inóculos desconocidos.

2.5. Medición de los gases

El volumen de biogás se midió usando un manómetro digital (HT-1890) acoplado para dos salidas en donde una conectaba al reactor y la otra salida conectaba a una jeringa que almacenaba la presión. Posteriormente, mediante el método de desplazamiento volumétrico por medio de una solución alcalina compuesta por hidróxido de sodio (NaOH 0.79 M), que se emplea como una trampa para capturar el CO₂ y así medir solo el CH₄ en el biogás. La jeringa que almacenó la presión estaba conectada a una manguera de PVC (3mm DI) y esta manguera fue sumergida en el interior de una probeta invertida que contenía la solución alcalina. Se registraron los valores obtenidos para convertir el volumen de gas medido en condiciones estándar (273,15 K y 10133 kPa) [25]. Para la producción de metano en el ensayo PBM se tomó en cuenta el valor B₀ que corresponde al valor máximo acumulado de CH₄ en el tiempo [20]. Mientras que para el ensayo AME

se consideraron los tres puntos de la pendiente que corresponden a los tres días del ensayo representados en g DQO/gSV [24].

La medición para AME se realizó por tres días consecutivos para los inóculos IM, IP e IC. Por otro lado, los experimentos de PBM se terminaron de medir cuando la producción diaria de metano se encontraba por debajo del 1 % de la producción acumulada de CH₄ por tres días consecutivos [21].

2.6. Análisis estadístico

Para el análisis de los datos obtenidos de cada muestra de los diferentes inóculos, se usó la herramienta Excel 2019. Con esta herramienta se pudo encontrar la pendiente más pronunciada entre los tres puntos, que equivale al valor en gDQO/gSV * día para la actividad metanogénica específica. Mientras que para el potencial bioquímico de metano se tomaron al menos 4 puntos de la producción de CH₄ que equivale a NmL CH₄/gSV vs tiempo. Además, para evaluar la diferencia significativa de la producción de metano influenciada por la temperatura se usó Excel 2019 con la opción Análisis de Datos: (ANOVA): análisis de varianza de dos factores con varias muestras por grupo, para las diferentes RIS de todos los inóculos.

3. RESULTADOS

3.1. Metanogénesis

Las mediciones del ensayo AME arrojaron resultados variables debido a la diferencia de temperaturas aplicadas. A la temperatura de 37 °C de los inóculos IM, IP e IC los resultados fueron: 0.008, 0.011 y 0.021 gDQO/gSV * día, respectivamente. En contraste, a las temperaturas originales de los inóculos los resultados obtenidos fueron: 0.005, NA y 0.014 gDQO/gSV * día, respectivamente, evidenciando que para el inóculo IP no hubo producción de metano, (Figura 1-3).

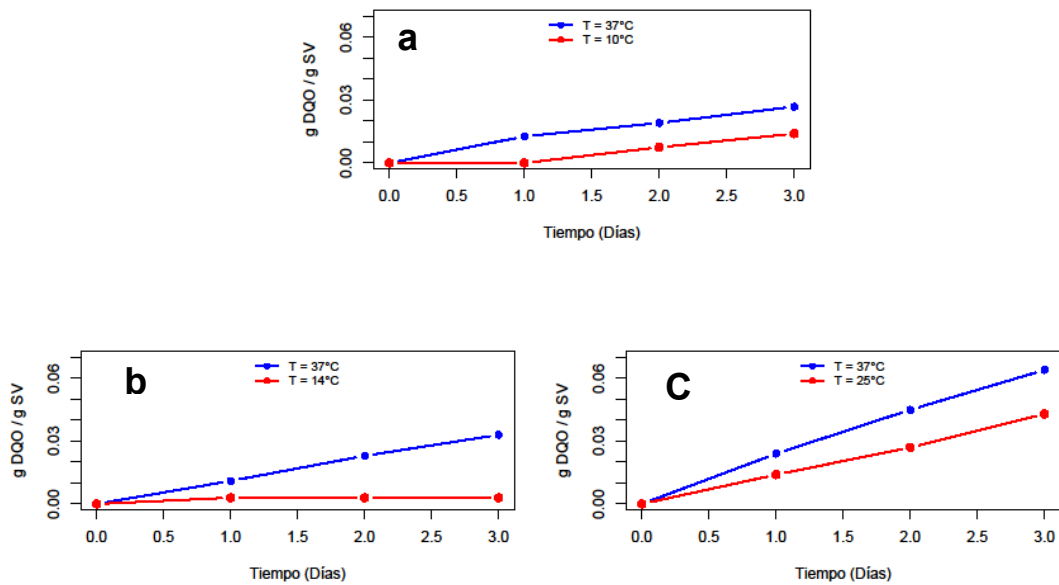


Figura 1-3: Valores Acumulados de Metano del ensayo AME a diferentes temperaturas (a), Inóculo Mojanda (b), Inóculo Papallacta (c), Inóculo Caimán.

Realizado por: Andrade, Joyce, 2024.

La producción de metano en las tres lagunas sometidas a diferentes temperaturas, reveló variaciones significativas. El inóculo IM operando a 10 °C y 37 °C, mostró una marcada sensibilidad térmica, evidenciada por los resultados estadísticamente significativos (ANOVA, $gl=7$, $F=33.94$, valor $p=4.60 \cdot 10^{-13}$). En cuanto al inóculo IC, empleado a temperaturas de 25 °C y 37 °C, también exhibió una respuesta a las variaciones térmicas, confirmada por los resultados (ANOVA, $gl=7$, $F=12.18$, valor $p=1.78 \cdot 10^{-7}$). Por último, el inóculo IP que operó a temperaturas de 14 °C y 37 °C, se observan resultados que revelaron una variación altamente significativa (ANOVA, $gl=7$,

$F=52.10$, valor $p=1.05 \cdot 10^{-15}$). En conjunto, estos resultados proporcionan evidencia cuantitativa de las diferencias significativas en la producción de metano entre las distintas temperaturas de operación en las tres lagunas.

3.2. Producción de Metano en Reactores Batch

La Figura 2-3 ilustra el PBM, en el cual se llevó a cabo el proceso de DA para la producción de CH_4 utilizando el inóculo IM, con variaciones en la Relación Inóculo Sustrato establecidas en 1, 2 y 4, y a dos temperaturas distintas 37°C y 10°C . Los resultados obtenidos exhibieron una marcada dependencia de la temperatura, revelando una mayor producción de $137 \text{ NmL CH}_4/\text{gSV}$ para la RIS de 4 a 37°C . En contraste, la producción mínima se registró a 10°C , siendo de $23 \text{ NmL CH}_4/\text{gSV}$ para la misma relación de 4. Es importante destacar que se observaron patrones similares de producción para la RIS de 2 a 10°C en comparación con la RIS 4 a la misma temperatura (10°C). Por otro lado, la Figura 4-3 presenta los resultados obtenidos en cuanto a la producción de CH_4 por el inóculo IC, considerando diversas temperaturas y diferentes (RIS 1, 2 y 4). Se destaca una notable producción de metano acumulado a 37°C con una RIS de 2, alcanzando un valor de $409 \text{ NmL CH}_4/\text{gSV}$. En contraste, se observa una producción significativamente más baja para la RIS de 4 a 25°C , registrando tan solo $95 \text{ NmL CH}_4/\text{gSV}$. Además, se aprecia una producción similar entre las RIS 1 y 2 a 25°C con un dato de $129 \text{ NmL CH}_4/\text{gSV}$.

La Figura 3-3 representa de manera gráfica los resultados obtenidos para la producción de metano utilizando el inóculo IP a 37°C , ya que a 14°C no se observó ninguna generación de CH_4 en ninguna de las RIS consideradas. Esta ausencia de producción a 14°C no solo se refleja en la figura, sino que también resalta la sensibilidad del proceso de producción de metano a las variaciones de temperatura. La figura revela una producción más elevada para la RIS de 2 y una producción mínima para la RIS de 4 a 37°C , con valores de $203 \text{ NmL CH}_4/\text{gSV}$ y $112 \text{ NmL CH}_4/\text{gSV}$, respectivamente. Finalmente, la Figura 5-3 hace referencia a la tasa de producción de CH_4 por día para en ensayo AME, considerando las variaciones de temperatura. En donde las barras del lado derecho hacen referencia a la temperatura de 37°C , con mayor producción de metano.

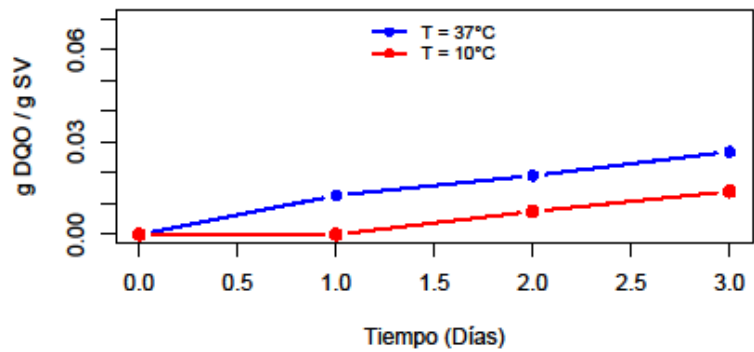


Figura 2-3: Producción de metano acumulado en el tiempo para el inóculo IM con diferentes RIS y temperaturas.
Realizado por: Andrade, Joyce, 2024.

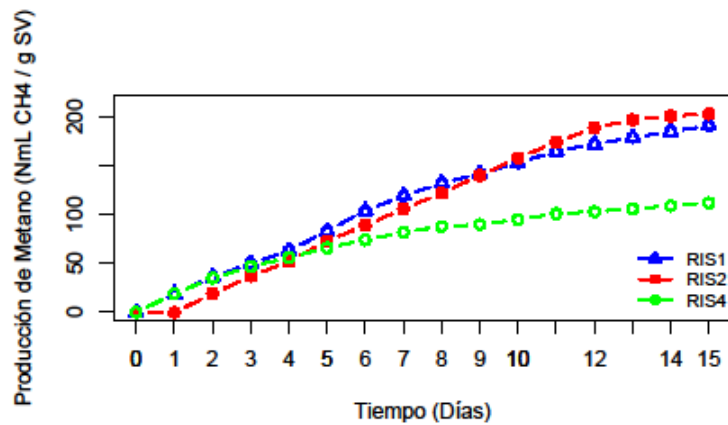


Figura 3-3: Producción de metano acumulado en el tiempo para el inóculo IP con diferentes RIS a 37 °C.
Realizado por: Andrade, Joyce, 2024.

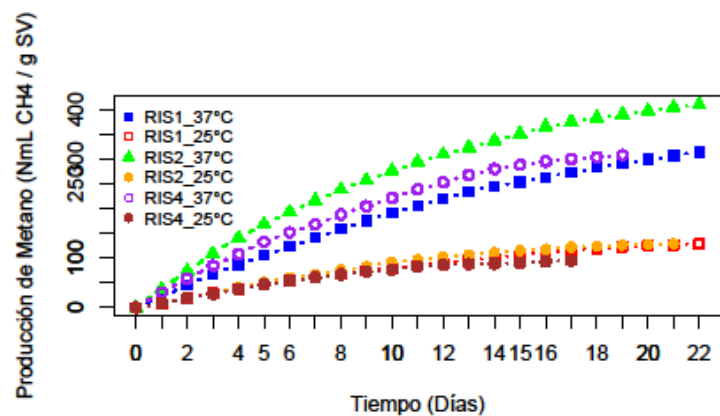


Figura 4-3: Producción de metano acumulado en el tiempo para el inóculo IC con diferentes RIS y temperaturas.
Realizado por: Andrade, Joyce, 2024.

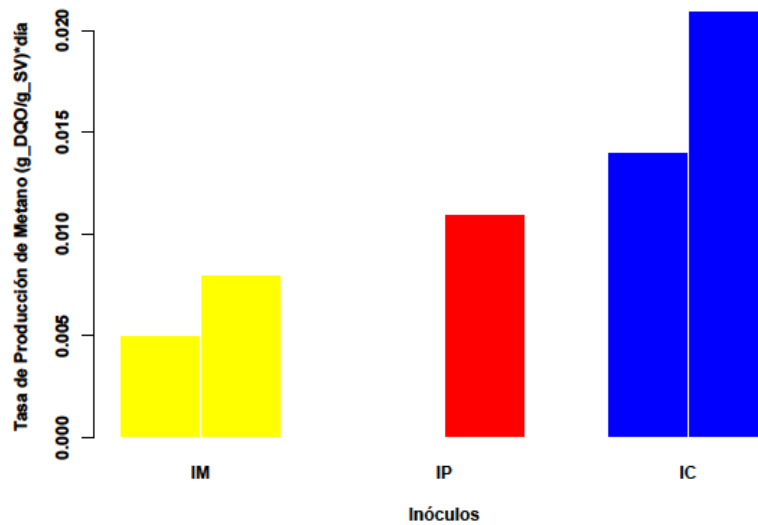


Figura 5-3: Tasa de producción de metano (AME) a la temperatura original (10, 14 y 25 °C) y a 37 °C para cada inóculo.
Realizado por: Andrade, Joyce, 2024.

3.3. Análisis estadístico en la producción de CH₄

Por otro lado, en la Tabla 4-3 se presentan los resultados del ANOVA. Esta tabla no solo detalla las diferencias significativas en las temperaturas en función de las distintas RIS entre los diversos inóculos, sino que también proporciona una visión pormenorizada de la evolución de la de producción de metano a lo largo del tiempo. Es crucial enfatizar, que, al examinar los IC e IM, se incluyó ANOVA específicos para la RIS 1, abordando las diferentes temperaturas (T °C original del inóculo y T °C óptima de la DA). Este mismo enfoque se replicó para la RIS 2 y 4, permitiendo discernir con precisión las influencias de la temperatura en la producción de metano para cada inóculo. Por otra parte, en el caso del inóculo IP, se optó por un ANOVA diferente. Consistió en evaluar las diferencias significativas de las RIS 1, 2 y 4, específicamente a una temperatura de 37 °C, dado que no se observó producción de CH₄ a 14 °C en este inóculo. Este enfoque meticuloso destaca la importancia de adaptar las estrategias analíticas a las peculiaridades de cada inóculo, subrayando el impacto determinante de las condiciones térmicas de este estudio.

Tabla 4-3: Valores de la producción de Metano con diferentes RIS y temperaturas para cada inóculo. Análisis estadístico entre las temperaturas en la producción de CH4.

Producción de Metano (NmL CH ₄ / gSV)							ANOVA (Valor p)		
	RIS 1		RIS 2		RIS 4		(Entre 37 °C y 10° C)		
IM	37°C	10°C	37°C	10°C	37°C	10°C	RIS 1	RIS 2	RIS 4
	95	26	60	26	137	23	3.1*10 ⁻¹¹	3.3*10 ⁻¹⁴	3.8*10 ⁻²⁶
	RIS 1		RIS 2		RIS 4		(Solo a 37 °C)		
IP	37°C	14°C	37°C	14°C	37°C	14°C	RIS 1	RIS 2	RIS 4
	191	NA	203	NA	112	NA	1.6*10 ⁻⁴⁵		
	RIS 1		RIS 2		RIS 4		(Entre 37 °C y 25 °C)		
IC	37°C	25°C	37°C	25°C	37°C	25°C	RIS 1	RIS 2	RIS 4
	314	129	409	129	359	147	8.7*10 ⁻³⁹	9.3*10 ⁻⁵⁴	2.1*10 ⁻⁵²

Realizado por. Andrade, Joyce, 2024.

4. DISCUSIÓN

4.1. Inóculos mesófilos en condiciones psicrófilas

En esta investigación se evidenció que a 37 °C los resultados de AME son mejor para todos los inóculos que a su temperatura original (Figura 5-3). El mejor resultado de AME se da para el inóculo IC, tanto a 37 °C como a 25 °C, en comparación con los demás inóculos. Esta variación podría ser atribuida primero a la mayor temperatura de esta laguna. A pesar de que está laguna cuenta con una población de caimanes, y que estos son animales de sangre fría [26], y, por tanto, se espera que tengan microorganismos psicrófilos en su sistema digestivo, se encuentra que el inóculo IC es mesófilo. En el caso de los inóculos de altura, IM e IP, presentan una temperatura original menor (10 °C y 14 °C, respectivamente), en comparación al IC (25 °C). Los resultados del AME para IM e IP son el 28 a 38 % del AME obtenido para IC (Figura 5-3) a 37 °C. Cuando se desarrolla el AME a la temperatura original de las lagunas, se encuentra que en el inóculo IP no se detecta actividad metanogénica, y en el caso de IM se reduce en 37.5 % respecto a su resultado en mesofilia (Figura 1-3).

Estos resultados indican que la temperatura óptima de los microorganismos involucrados en la metanogénesis en lagunas de ambientes fríos [27], e incluso cálidas y habitadas por animales de sangre fría (como es el caso de IC), parece ser más alta que la temperatura de sus hábitats [28]. Coincidiendo con otros trabajos [29], donde se incubaron sedimentos a diferentes temperaturas (2-70 °C), en donde las tasas más altas de producción de metano siempre se observaron en el rango de temperaturas mesófilas, respaldando así los resultados de este estudio. De este modo, dada la variabilidad de la temperatura en los diferentes ecosistemas y los resultados obtenidos, las comunidades psicotolerantes estarían más involucradas en la producción de metano que las comunidades metanogénicas psicrófilas [30].

4.2. Producción de CH₄ acumulado en el tiempo en base a la RIS

En áreas con bajas temperaturas, la aplicación de procesos de Digestión Anaerobia (DA) a temperatura ambiente para el tratamiento de desechos orgánicos se considera atractiva desde perspectivas económicas y ambientales [31]. La comparación de datos sobre la producción de CH₄ presenta desafíos debido a la escasez de información

específica sobre el uso de inóculos derivados de suelos y sedimentos, y el uso de celulosa como sustrato principal [20]. Con respecto a los resultados en base a las distintas RIS se encontró diferencias significativas (Tabla 4-3). Evidenciando, que para los inóculos IP e IC se exhibió la mayor producción de metano para la RIS de 2 a 37 °C. Mientras que para la RIS de 1 y 4 a 37 °C, los resultados de IC muestran un 23 y 12 %, respectivamente, menos producción de metano en comparación a la RIS de 2.

Asimismo, a 25 °C el inóculo IC mostró un aumento en la producción de metano con una RIS de 4, teniendo un 13 % más de producción con respecto a las RIS de 1 y 2, estos resultados contrarrestan las expectativas de [32,33] que sugieren una disminución en la producción de metano con RIS más altas de 0.5. Mientras que al analizar la RIS de 4 a 10 °C para el inóculo IM, se observó que tiene un 11 % menos de producción de metano (Tabla 4-3). Sin embargo, a 37 °C, se registró un 44 y 128 % más de producción de metano para la RIS de 4 del inóculo IM, con respecto a las RIS de 1 y 2, respectivamente, indicando que la temperatura mesófila y con una mayor RIS favorece la actividad microbiana. Finalmente, haciendo referencia al inóculo IP a 37 °C, se observó un 44 % menos en la producción de metano a RIS de 4, en comparación con la RIS de 2, concordando con [34] en donde sugieren inhibiciones de los consorcios microbianos posiblemente por acción de la acumulación de ácidos grasos volátiles asociadas con RIS mayores, mientras que a RIS de 1 el inóculo IP produce un 70 % más de CH₄ que a RIS de 4, coincidiendo con el estudio de Zhou et al., (2011), quienes encontraron una mayor producción de metano con relaciones ≤ 0.6 .

Por otra parte, los resultados experimentales, especialmente con celulosa (Tabla 4-3), evidencian la producción de metano acumulado a lo largo del tiempo, influenciados por las diferentes temperaturas. Según Holliger et al., (2016), establecen que el PBM con celulosa debe estar en el rango de 352 y 414 NmL CH₄/ gSV, para evidenciar que el ensayo PBM ha sido llevado a cabo de manera eficiente. Siendo, solamente los datos de IC a 37 °C para las RIS de 2 y 4 que están dentro del rango. Destacando la RIS de 2 un 13 % más que la RIS de 4. Sin embargo, para los demás inóculos se evidenció una producción de metano inferior al rango sugerido por Holliger et al., (2016), lo cual puede deberse a los bajos resultados obtenidos en el ensayo AME o a su vez a las variaciones térmicas, ya que pueden influir significativamente en los procesos metabólicos de los microorganismos [35]. Por ejemplo, temperaturas más bajas pueden ralentizar la actividad de los microorganismos y reducir la eficiencia de la descomposición de la celulosa, lo que limitaría la producción de metano. Además, la composición específica

de los inóculos IM e IP podría no ser la más adecuada y por ende la diversidad microbiana y la actividad enzimática pueden variar entre los inóculos, lo que afectaría su capacidad para descomponer eficazmente la celulosa. Otro factor a considerar son los posibles inhibidores, entre los principales inhibidores están los ácidos como el acético, estos compuestos pueden interferir con la actividad microbiana [36], afectando negativamente la producción de metano. La presencia de tales inhibidores podría ser más pronunciada en ciertos inóculos o condiciones experimentales, lo que explicaría las diferencias observadas en la producción de metano entre los diferentes tratamientos.

5. CONCLUSIÓN

Este estudio reveló que la utilización de inóculos conformados por consorcios microbianos lacustres aclimatados a diversas temperaturas, tanto bajas como mesófilas, proporcionó una perspectiva valiosa para optimizar la digestión anaeróbica. Los resultados obtenidos en este estudio aportan evidencia significativa acerca de la presencia de consorcios metanogénicos en lagunas, incluso en aquellas situadas a elevadas altitudes y expuestas a condiciones de temperaturas frías. Este fenómeno certifica la notable adaptabilidad de los microorganismos encargados de la producción de metano, exhibiendo una capacidad para prosperar en diversos entornos lacustres, incluso en condiciones climáticas adversas. La actividad metanogénica de los inóculos analizados se manifestó de manera más pronunciada en las lagunas con temperaturas originales más elevadas. Es notorio que, independientemente de las particularidades de las lagunas, estos consorcios demostraron ser altamente sensibles a las variaciones térmicas, alcanzando su máxima actividad a 37 grados centígrados.

Por otro lado, los resultados indicaron que la producción de metano estaba estrechamente vinculada a la temperatura y las RIS, mostrando variaciones significativas entre los inóculos evaluados. A pesar de las discrepancias en las respuestas de los inóculos IM, IP e IC, se confirma que la temperatura es un factor crítico que influye en la actividad de los consorcios metanogénicos. De igual forma, se evidenció la importancia del rol de los microorganismos, confirmando en este estudio la presencia de microorganismos psicotróficos, que han sido obligados a operar en condiciones de temperaturas bajas, los cuales son capaces de generar mayor producción de metano a temperaturas mesófilas. Asimismo, es indispensable mencionar que, aunque se evidenció menor producción de metano a temperaturas bajas, también se da indicios de que en los inóculos de temperatura baja pueden estar presentes microorganismos psicrófilos. Estos hallazgos contribuyeron a una comprensión más profunda de los factores que influyen en la producción de metano, ofreciendo perspectivas valiosas para el diseño y la operación eficiente de sistemas de digestión anaeróbica, especialmente en entornos de climas fríos a templados.

AGRADECIMIENTOS

Se reconoce al ministerio ecuatoriano MAATE (Ministerio del Ambiente, Agua y Transición Ecológica) por haber facilitado la autorización del Trámite N°MAATE-ARSFC-2023-0358.

Esta investigación da una mención especial al Laboratorio de Biomasa de la Universidad Regional Amazónica Ikiam.

REFERENCIAS

1. Angelidaki, I., Karakashev, D., Batstone, D., Plugge, C., Stams, A. (2011). Chapter sixteen - biomethanation and its potential 494, 327– 351. doi: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-385112-3.00016-0>.
2. Cazier, E., Trably, E. and Steyer, J., Escudie, R. (2015). Biomass hydrolysis inhibition at high hydrogen partial pressure in solid-state anaerobic digestion. *Bioresource Technology*, 106–113 doi: <http://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.04.055>.
3. McKeown, R.M., Hughes, D., Collins, G., Mahony, T., O'Flaherty, V., (2012). Low-temperature anaerobic digestion for wastewater treatment. *Current Opinion in Biotechnology* 23, 444–451. doi: <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2011.11.025>.
4. Lettinga, G., Rebac, S., Zeeman, G. (2001). Challenge of psychrophilic anaerobic wastewater treatment. *Trends in Biotechnology* 19, 363–370. doi: [https://doi.org/10.1016/S0167-7799\(01\)01701-2](https://doi.org/10.1016/S0167-7799(01)01701-2).
5. McKeown, R.M., Scully, C., Enright, A.M., Chinalia, F.A., Lee, C., Mahony, T., O'Flaherty, G.C. V. (2009). Psychrophilic methanogenic community development during long-term cultivation of anaerobic granular biofilms. *ISME* 3, 1231–1242. doi: <https://doi.org/10.1038/ismej.2009.67>.
6. McKeown, R.M., Scully, C., Mahony, T., Collins, G., O'Flaherty, V. (2009). Long-term (1243 days), low-temperature (4–15°C), anaerobic biotreatment of acidified wastewaters: Bioprocess performance and physiological characteristics. *Water Research* 43, 1611–1620. doi: <https://doi.org/10.1016/j.watres.2009.01.015>
7. Nozhevnikova, A.N., Zepp, K., Vázquez, F., Zehnder, A.J.B., Holliger, C. (2003). Evidence for the existence of psychrophilic methanogenic communities in anoxic sediments of deep lakes. *Applied and Environmental Microbiology* 69, 1832–1835. doi:10.1128/AEM. 69.3.1832-1835.2003.
8. Reay, D., Smith, P., Amstel, A. (2010). Methane and climate change 1st, 261.
9. Saunio, M., Stavert, A.R., Poulter, B., Bousquet, P., Canadell, J.G., Jackson, R.B., Raymond, P.A., Dlugokencky, E.J., Houweling, S., Patra, P.K., Ciais, P., Arora, V.K., Bastviken, D., Bergamaschi, P., Blake, D.R., Brailsford, G., Bruhwiler, L., Carlson, K.M., Carrol, M., Castaldi, S., Chandra, N., Crevoisier, C., Crill, P.M., Covey, K., Curry, C.L., Etiope, G., Frankenberg, C., Gedney, N., Hegglin, M.I., Hoglund-Isaksson, L., Hugelius, G., Ishizawa, M., Ito, A., Janssens-Maenhout, G., Jensen, K.M., Joos, F., Kleinen, T., Krummel, P.B., Langenfelds, R.L., Laruelle, G.G., Liu, L., Machida, T., Maksyutov, S., McDonald, K.C., McNorton, J., Miller, P.A., Melton, J.R., Morino, I., Muller, J., Murguia-Flores, F., Naik, V., Niwa, Y., Noce, S., O'Doherty, S., Parker, R.J., Peng, C., Peng, S., Peters, G.P., Prigent, C., Prinn, R., Ramonet, M., Regnier, P., Riley, W.J., Rosentretter, J.A., Segers, A., Simpson, I.J., Shi, H., Smith, S.J., Steele, L.P., Thornton, B.F., Tian, H., Tohjima, Y., Tubiello, F.N., Tsuruta, A., Viovy, N., Voulgarakis, A., Weber, T.S., van Weele, M., van der Werf, G.R., Weiss, R.F., Worthy, D., Wunch, D., Yin, Y., Yoshida, Y., Zhang, W., Zhang, Z., Zhao, Y., Zheng, B., Zhu, Q., Zhu, Q., Zhuang, Q. (2020). The global methane budget 2000–2017. *Earth System Science Data* 12, 1561–1623. doi:10.5194/essd-12-1561-2020.
10. Franzmann, P.D., Roberts, N.J., Mancuso, C.A., Burton, H.R., Mcmeekin, T.A. (1991). Methane production in meromictic ace lake, antarctica. doi: <https://doi.org/10.1007/BF00034677>.

11. Franzmann, P.D., Springer, N., Ludwig, W., Macario, E.C.D., Rohde, M. (1992). A methanogenic archaeon from ace lake, antarctica: *Methanococoides burtonii* sp. nov. *Systematic and Applied Microbiology* 15, 573–581. doi:10.1016/S0723-2020(11)80117-7Kotsyurbenko, O.R.,
12. Chin, K.J., Glagolev, M.V., Stubner, S., Simankova, M.V., Nozhevnikova, A.N., Conrad, R. (2004). Acetoclastic and hydrogenotrophic methane production and methanogenic populations in an acidic west-siberian peat bog. *Environmental Microbiology* 6, 1159–1173. doi:10.1111/j.1462-2920.2004.00634. x.
13. Høj, L., Olsen, R.A., Torsvik, V.L. (2008). Effects of temperature on the diversity and community structure of known methanogenic groups and other archaea in high arctic peat. *ISME Journal* 2, 37–48. doi:10.1038/ismej.2007.84.
14. Dong, X.Z., Chen, Z.J. (2012). Psychrotolerant methanogenic archaea: Diversity and cold adaptation mechanisms. *Science China Life Sciences* 55, 415–421. doi:10.1007/s11427-012-4320-0.
15. Dhaked, R.K., Singh, P., Singh, L. (2010). Biomethanation under psychrophilic conditions. *Waste Management* 30, 2490–2496. doi: <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2010.07.015>.
16. Blake, L.I. and Tveit, A., Øvreås, L. and Head, I.G.N. (2015). Response of methanogens in arctic sediments to temperature and methanogenic substrate availability. doi: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0129733>.
17. de Jong, A.E., in 't Zandt, M.H., Meisel, O.H., Jetten, M.S., Dean, J.F., Rasigraf, O., Welte, C.U. (2018). Increases in temperature and nutrient availability positively affect methane-cycling microorganisms in arctic thermokarst lake sediments. *Environmental Microbiology* 20, 4314–4327. doi:10.1111/1462-2920.14345.
18. Lavergne, C., Aguilar-Muñoz, P., Calle, N., Thalasso, F., Astorga-España, M.S., Sepúlveda-Jauregui, A., Martínez-Cruz, K., Gandois, L., Mansilla, A., Chamy, R., Barret, M., Cabrol, L. (2021). Temperature differently affected methanogenic pathways and microbial communities in sub-antarctic freshwater ecosystems. *Environment International* 154, 106575. doi: <https://doi.org/10.1016/j.envint.2021.106575>.
19. Tarupí, E.A. (2019). Ecosistema ecológico y social: el caso de la laguna de Papallacta- Napo-Ecuador, cooperativismo y desarrollo, 27, 1–26. doi: <https://doi.org/10.16925/2382-4220.2019.02.02>.
20. Aguilar, P., Lavergne, C., Chamy, R., Cabrol, L. (2022). The biotechnological potential of microbial communities from Antarctic soils and sediments: Application to low temperature biogenic methane production. *Journal of Biotechnology* 351, 38–49. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2022.04.014>.
21. Astals, S., Batstone, D., Tait, S., Jensen, P. (2015). Development and validation of a rapid test for anaerobic inhibition and toxicity. *Water Research* 81, 208–215. doi: <https://doi.org/10.1016/j.watres.2015.05.063>.
22. Morales, P. (2018). Evaluación experimental del potencial de producción de biogás a partir de aguas residuales procedentes del camal metropolitano de Quito. Tesis de pregrado. Universidad Politécnica Nacional, Quito - Ecuador. URL: <http://bibdigital.epn.edu.ec/handle/15000/19526>.
23. Holliger, C., Alves, M., Andrade, D., Angelidaki, I., Astals, S., Baier, U., Bougrier, C., Buffiere, P., Carballa, M., Wilde, V.D., Ebertseder, F., Fernandez, B., Ficara, E., Fotidis, I., Frigon, J.C., Laclós, H.F.D., Ghasimi, D.S., Hack, G., Hartel, M., Heerenklage, J., Horvath, I.S., Jenicek, P., Koch, K., Krautwald, J., Lizasoain, J., Liu, J., Mosberger, L., Nistor, M., Oechsner, H., Oliveira, J.V., Paterson, M., Pauss, A., Pommier, S., Porqueddu, I., Raposo, F., Ribeiro, T., Pfund, F.R.,

- Stromberg, S., Torrijos, M., Eekert, M.V., Lier, J.V., Wedwitschka, H., Wierinck, I. (2016). Towards a standardization of biomethane potential tests. *Water Science and Technology* 74, 2515–2522. doi:10.2166/wst.2016.336.
24. Angelidaki, I., Alves, M., Bolzonella, D., Borzacconi, L., Campos, J.L., Guwy, A.J., Kalyuzhnyi, S., Jenicek, P., Lier, J.B.V. (2009). Defining the biomethane potential (bmp) of solid organic wastes and energy crops: A proposed protocol for batch assays. *Water Science and Technology* 59, 927–934. doi:10.2166/wst.2009.040.
25. Strömberg, S., Nistor, M., Liu, J. (2014). Towards eliminating systematic errors caused by the experimental conditions in biochemical methane potential (bmp) tests. *Waste Management* 34, 1939–1948. doi: 10.1016/J.WASMAN.2014.07.018.
26. Pérez, F. (1996). *Cocodrilos del mundo*. URL: <http://www.adeve.es/libros2016/Cocodrilos.pdf>. aDEVE.
27. Anisimov, O.A. (2007). Potential feedback of thawing permafrost to the global climate system through methane emission. *Environmental Research Letters* 2, 045016. doi:10.1088/1748-9326/2/4/045016.
28. Schulz, S., Conrad, R. (1996). Influence of temperature on pathways to methane production in the permanently cold profundal sediment of lake Constance. *FEMS Microbiology Ecology* 20, 4. doi: <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.1996.tb00299.x>.
29. Nozhevnikova, A.N., Holliger, C., Ammann, A., Zehnder, A.J. (1997). Methanogenesis in sediments from deep lakes at different temperatures (2–70°C). *Water Science and Technology* 36, 57–64. doi:10.1016/S0273-1223(97)00507-6.
30. Nozhevnikova, A.N., Simankova, M.V., Parshina, S.N., Kotsyurbenko, O.R. (2001). Temperature characteristics of methanogenic archaea and acetogenic bacteria isolated from cold environments, doi: <https://doi.org/10.2166/wst.2001.0460>.
31. Lettinga, G., Rebac, S., Zeeman, G. (2001). Challenge of psychrophilic anaerobic wastewater treatment. doi: [https://doi.org/10.1016/S0167-7799\(01\)01701-2](https://doi.org/10.1016/S0167-7799(01)01701-2).
32. Zhou, Y., Zhang, Z., Nakamoto, T., Li, Y., Yang, Y., Utsumi, M., Sugiura, N. (2011). Influence of substrate-to-inoculum ratio on the batch anaerobic digestion of bean curd refuse-okara under mesophilic conditions. *Biomass and Bioenergy* 35, 3251–3256. doi: 10.1016/j.biombioe.2011.04.002.
33. Parra, B., Torres, P., Marmolejo, L., Cárdenas, L., Vásquez, C., Torres, W., Ordoñez, J. (2015). Efecto de la relación sustrato-inoculo sobre el potencial bioquímico de metano de biorresiduos de origen municipal. *Ingeniería, Investigación y Tecnología* 16, 515–526. doi: 10.1016/j.riit.2015.09.004.
34. Raposo, F., Banks, C.J., Sievert, 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, 1444–1450. doi: 10.1016/j.procbio.2006.01.012.
35. Borbor, E. y Gamarra, J. (2023). Evaluación del tiempo de vida útil de pechugas de pollo cocidas empacadas al vacío, almacenado en refrigeración. Tesis de pregrado. Universidad de Guayaquil, Guayaquil, Ecuador. URL: <https://repositorio.ug.edu.ec/server/api/core/bitstreams/e4278a45-02a5-460c-a551-ba15c300c45c/content>.
36. Jaramillo, O.J., Gomez García, M., Fontalvo Alzate, J. Remoción de los inhibidores de la fermentación etanoica usando membranas de polidimetilsiloxano (pdms) por evaporación. *Revista ION* 25. (2012) URL: <https://revistas.uis.edu.co/index.php/revistaion/article/view>

ANEXOS



Anexo 1-A: Experimentación (a), Sistema de medición para los ensayos AME y PBM (b), Reactores Batch para los ensayos AME y PBM.

Tabla 5-A: Análisis de varianza de dos factores con varias muestras por grupo para el inóculo IP, considerando las RIS: 1, 2 y 4 a 37°C para el ensayo PBM.

ANÁLISIS DE VARIANZA (RIS 1, 2 y 4/ 37°C)						
<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Muestra	1261.575	2	630.78787	1382.5	1.722E-71	3.091191
Columnas	1017.882	15	67.858814	148.72	1.966E-59	1.77180
Interacción	659.0659	30	21.968865	48.149	1.668E-45	1.57804
Dentro del grupo	43.80148	96	0.4562654			
Total	2982.325	143				

Realizado por. Andrade, Joyce, 2024.

Tabla 6-A: Análisis de varianza de dos factores con varias muestras por grupo para los distintos inóculos a diferentes temperaturas para el ensayo AME.

ANÁLISIS DE VARIANZA (PAPALLACTA)						
<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Muestra	64.40333	1	64.40333	984.5095	1.321E-25	4.149097
Columnas	29.83333	7	4.261904	65.15013	3.967E-17	2.312741 1
Interacción	23.86	7	3.408571	52.10555	1.050E-15	2.312741 1
Dentro del grupo	2.093333	32	0.065416			
Total	120.19	47				
ANÁLISIS DE VARIANZA (CAIMAN)						
<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Muestra	78.03	1	78.03	302.2953	7.291E-18	4.149097
Columnas	193.21	7	27.60142	106.9304	2.302E-20	2.312741
Interacción	22.02333	7	3.146190	12.18863	1.783E-07	2.312741
Dentro del grupo	8.26	32	0.258125			
Total	301.5233	47				
ANÁLISIS DE VARIANZA (MOJANDA)						
<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Muestra	15.98520	1	15.98520	174.7813	1.638E-14	4.149097
Columnas	38.39312	7	5.484732	59.96973	1.346E-16	2.312741
Interacción	21.72979	7	3.104255	33.94175	4.604E-13	2.312741
Dentro del grupo	2.926666	32	0.091458			
Total	79.03479	47				

Realizado por. Andrade, Joyce, 2024.

Tabla 7-A: Análisis de varianza de dos factores con varias muestras por grupo para el inóculo IM, considerando las RIS a distintas temperaturas (37 y 10°C) para el ensayo PBM.

ANÁLISIS DE VARIANZA (RIS 1/ 37-10°C)						
<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Muestra	70.341348	1	70.34134	865.66	7.226E-42	3.973896
Columnas	94.808303	17	5.576959	68.633	1.624E-37	1.766576
Interacción	11.616418	17	0.683318	8.4093	3.165E-11	1.766576
Dentro del grupo	5.8505259	72	0.081257			
Total	182.61659	107				
ANÁLISIS DE VARIANZA (RIS 2/ 37-10°C)						
<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Muestra	30.263858	1	30.26385	736.733	3.279E-38	3.981896
Columnas	43.898368	16	2.743648	66.7904	3.835E-35	1.794556
Interacción	7.9870745	16	0.499192	12.1521	3.386E-14	1.794556
Dentro del grupo	2.7933333	68	0.041078			
Total	84.942635	101				
ANÁLISIS DE VARIANZA (RIS 4/ 37-10°C)						
<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Muestra	131.28544	1	131.2854	1989.17	1.033E-47	4.001191
Columnas	63.332888	14	4.523777	68.5420	1.692E-31	1.860242
Interacción	40.372888	14	2.883777	43.6936	3.829E-26	1.860242
Dentro del grupo	3.96	60	0.066			
Total	238.95122	89				

Realizado por. Andrade, Joyce, 2024.

Tabla 8-A: Análisis de varianza de dos factores con varias muestras por grupo para el inóculo IC, considerando las RIS a distintas temperaturas (37 y 25°C) para el ensayo PBM.

ANÁLISIS DE VARIANZA (RIS 1 / 37-25°C)						
<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Muestra	1378.139	1	1378.1392	4712.68	7.954E-81	3.94453
Columnas	1487.978	22	67.635392	231.286	8.898E-71	1.65913
Interacción	273.6357	22	12.437990	42.5329	8.735E-39	1.65913
Dentro del grupo	26.90370	92	0.2924315			
Total	3166.657	137				
ANÁLISIS DE VARIANZA (RIS 2 / 37-25°C)						
<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Muestra	1393.137	1	1393.1378	5842.17	4.806E-85	3.94453
Columnas	1761.441	22	80.065527	335.757	4.337E-78	1.65913
Interacción	502.2176	22	22.828075	95.7303	9.337E-54	1.65913
Dentro del grupo	21.93851	92	0.2384621			
Total	3678.735	137				
ANÁLISIS DE VARIANZA (RIS 4 / 37-25°C)						
<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Muestra	804.5089	1	804.50898	4225.30	1.091E-78	3.94453
Columnas	1572.173	22	71.462414	375.322	2.775E-80	1.65913
Interacción	372.9943	22	16.954288	89.0444	2.190E-52	1.65913
Dentro del grupo	17.51703	92	0.1904025			
Total	2767.193	137				

Realizado por. Andrade, Joyce, 2024.