



UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN MARTÍN

INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN E INGENIERÍA AMBIENTAL

***Optimización de la digestión anaeróbica
del guano de aves ponedoras***

Trabajo de Tesis para optar por el título de
Doctor en Ciencia y Tecnología Mención Química

Por: **Patricia Bres**

Director de Tesis: Roberto Candal

Co-director: Guillermo Cannizzaro

Lugar de Trabajo: Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA)

Instituto de Microbiología y Zoología Agrícola (IMyZA)

Laboratorio de Transformación de Residuos

- 2019 -

Dedicatoria

A mis dos amores, Cristian y mi hijo Ramiro

A mi familia, mis padres Mirta y Carlos y mis hermanos Vero, Julio y Gerar

RESUMEN

La producción avícola de ponedoras en sistemas intensificados se ha incrementado exponencialmente en los últimos años, conduciendo a la generación de grandes volúmenes de residuos que si no son gestionados adecuadamente impactan negativamente en el ambiente. Existe una alta demanda a nivel territorio para resolver esta problemática no solo ambiental sino también social. La digestión anaeróbica (DA) es una alternativa de tratamiento prometedora, debido a que se generan dos productos de gran valor agregado, el biogás: compuesto que puede ser utilizado como energía, y el digerido: un producto semilíquido que puede ser valorizado agronómicamente. Si bien el guano de aves ponedoras (G) tiene características que lo hacen favorables para ser tratado por la DA, la presencia de ciertos compuestos como el nitrógeno amoniacal, puede producir la inhibición del proceso, conduciendo a desestimar la aplicación de esta tecnología. En este contexto, se planteó como objetivo general de esta tesis: desarrollar herramientas metodológicas y mecanismos de acción para el desarrollo del proceso de la DA del G, que conduzcan a la implementación de esta tecnología a escala real.

Se determinaron las características fisicoquímicas, microbiológicas y parasitológicas del G proveniente de sistemas convencionales (SC) y sistemas automatizados (SA) de jaulas en batería, los dos sistemas principales de manejo en nuestro país. Los resultados mostraron que, si bien las concentraciones de compuestos nitrogenados son mayores en el G del SA, éste sería el más recomendable para ser tratado por DA. El G del SC va perdiendo carbono y humedad, concentrando nutrientes y compuestos tóxicos (Mn, Fe), con mayor presencia de microorganismos patogénicos y parásitos.

Se ajustó la metodología del ensayo de actividad metanogénica específica (AME), el cual permitió evaluar la actividad de las bacterias metanogénicas en inóculos de diferentes orígenes. Se generó la protocolización del ensayo y reactores de diseño propio, que aseguraron la hermeticidad y permitieron medir de una forma práctica y sencilla la generación de biogás y metano. Los resultados mostraron que el lodo de mayor actividad fue el lodo de efluente cervecero, de tipo granular.

Se determinó el potencial energético del G para evaluar la viabilidad técnica de la DA como tecnología de tratamiento. Para ello, se ajustó e implementó la metodología del potencial bioquímico metanogénico (PBM). Se empleó el G como sustrato, evaluando 4 relaciones diferentes entre el sustrato y el inóculo ($S/I = 0,4, 1, 2$ y 4 gSV/gSSV) para encontrar la mejor relación. También se evaluó el efecto de la aclimatación del inóculo al

sustrato, utilizando dos inóculos de naturaleza, origen y AME diferentes: inóculo adaptado al sustrato (IA), proveniente de un reactor alimentado con G (AME= 0,05 mLCH₄/gSSV), e inóculo sin adaptación (I), proveniente de un reactor para tratamiento de efluente cervecero, con características granulares (AME= 0,13 mLCH₄/gSSV). Se determinaron variables fisicoquímicas en el líquido al inicio y al final de proceso, y variables en la fase gaseosa (rendimiento de metano, PBM, e índice de biodegradabilidad). Los resultados mostraron que el PBM fue obtenido con la relación S/I= 0,4 gSV/gSSV utilizando el inóculo I. La AME y las características del inóculo granular fueron más influyentes que la aclimatación del inóculo al sustrato en el ensayo de PBM.

Se evaluó la co-digestión del G como una estrategia para mejorar el proceso anaeróbico. Se realizaron ensayos de PBM, utilizando G como único sustrato y co-digerido con estiércol vacuno (V) y con frutas y verduras (FV). Se incluyó en este ensayo, un análisis de patógenos al inicio y final del ensayo. Los resultados sugieren que el guano puede ser co-digerido hasta un 50% con V y residuos de FV, generándose condiciones anaeróbicas estables y favorables, y con la obtención de un producto digerido en buenas condiciones de sanitización.

Por último, se realizó un ensayo en reactor piloto de alimentación semi-continua y se evaluó la *performance* del proceso y la calidad de los dos productos obtenidos (biogás y digerido). El G co-digerido con residuos de FV incrementó en un 30 % la producción y rendimiento de biogás y metano, tuvo una mayor remoción de materia orgánica y menores concentraciones de compuestos inhibitorios. Por otro lado, la materia orgánica, los compuestos nitrogenados (NAT y NTK) y ciertos elementos totales (Zn, Mg, Mn) tuvieron una correlación positiva con la reducción del rendimiento de biogás y metano. En cuanto al producto digerido, los valores de Ca, CE, Mn y Zn, fueron más altos en el tratamiento mono-digerido del guano. Las concentraciones altas de Zn y la presencia de patógenos y parásitos en ambos procesos limitan la aplicación del digerido para su valorización agronómica. La co-digestión del guano con FV no solo mejora el proceso anaeróbico, sino que también representa una alternativa de tratamiento de dos residuos altamente problemáticos a nivel local, regional y territorial que podrían ser utilizados como recursos energéticos.

Han sido logros de esta tesis:

1. La generación de información sobre las características del guano en los dos sistemas principales de manejo de la producción avícola de nuestro país.
2. La puesta a punto e implementación de metodologías específicas de la DA: el ensayo de AME que servirá como herramienta de control de la actividad de la biomasa, y el ensayo de PBM, estudio de pre-factibilidad técnica, ambas con aplicación en plantas de biogás a escala real.
3. La cuantificación e identificación de variables de control y operativas de la digestión anaeróbica del guano: concentración de alcalinidades y AGV, indicadores de la estabilidad, rendimiento de biogás, rendimiento de metano, biodegradabilidad anaeróbica y concentraciones inhibitorias parciales del proceso (por compuestos nitrogenados y por compuestos como el Zn y Mn). Esta información servirá de base para el *scaling up* de esta tecnología
4. El mejoramiento del proceso anaeróbico del guano mediante la co-digestión con frutas y verduras, favoreciendo así no solo el proceso de la DA, sino ofreciendo una alternativa de tratamiento para estos dos residuos que son altamente problemáticos en nuestro país.
5. La generación de información sobre las características del digerido, encontrando ciertas limitaciones para su aplicación por la presencia de patógenos y altas concentraciones de Zn.

Se espera que la información brindada por esta tesis, sirva de base para la implementación y optimización de la DA del guano de aves ponedoras y para impulsar la generación de nuevas alternativas de manejo y gestión en la producción avícola, que mejoren las condiciones del guano, y maximicen su utilización como recurso energético.

ABSTRACT

Poultry production in intensive systems has exponentially grown over the last years. This activity generates high volume of concentrated wastes that, if not treated, can cause a negative environmental impact. The anaerobic digestion (AD) is a promising alternative for the treatment waste. Through AD, poultry manure (PM) can be transformed into biogas and a semi-liquid digested material or digestate. These outputs can be used as an energy source and fertilizer, respectively. Several studies have shown that PM has favorable conditions to be treated by AD. However, the PM also presents inhibitory compounds such as ammonia nitrogen- that might discourage the use of this technology. The main objective of this thesis was to create methodological tools and strategies for the development of AD process for PM, which lead to the implementation of this technology on industrial scale.

Physicochemical, microbiological and parasitological characteristics of PM from conventional systems (CS) and automatic systems (AS) were evaluated. Results show higher nitrogen compounds in PM from AS. PM from CS constantly lost carbon and humidity, concentrating nutrients and toxic compounds (Mn and Fe), the highest presence of pathogenic microorganism and parasites. These results suggest that PM from AS is more recommended to be treated with AD.

Methanogenic bacteria activity of inoculum from different origin were evaluated using the methodology of Specific Methanogenic Activity (SMA). This test was protocolized and the reactors used were specifically designed and created. The hermetic and user-friendly design allowed a safe and simple measurement of methane and biogas generation. The results showed that the most active inoculum was the brewing effluent sludge.

The energetic potential of PM was studied. The Biochemical Methane Potential (BMP) test was developed. PM was used as a substrate and 4 different substrate-inoculum ratios ($S/I = 0.4, 1, 2$ y 4 gVS/gVSS) were evaluated. The effect of inoculum acclimatization on the substrate was also evaluated. Two inoculums of different nature, origin and SMA were used: Acclimatized inoculum (AI) from anaerobic reactor fed with PM ($SMA = 0.05 \text{ mLCH}_4/\text{gVSS}$) and non-acclimatized inoculum (I) from another anaerobic reactor fed with brewing industry wastewater ($SMA = 0,13 \text{ mLCH}_4/\text{gVSS}$). Physicochemical characteristics were evaluated on the initial and end of the process. Methane and biogas yield, BMP and the biodegradability index were also evaluated. Results showed that the best relations between the substrate and the inoculum was $S/I = 0.4 \text{ gVS/gVSS}$, using the

inoculum I. SMA and inoculum granular characteristics showed a stronger influence than inoculum acclimatization on the BMP results.

Co-digestion of PM was evaluated as a strategy to improve the anaerobic process. BMP was evaluated in PM as the single substrate and co-digested with cow manure (C) and Fruits and Vegetables (FV). A pathogenic analysis was included in this experiment. There was a trend towards anaerobic process improvement with the use of co-substrate. Results suggest that PM can be co-digested up to 50% with C and FV, with stable and favorable anaerobic conditions.

Performance of a semi-continuous anaerobic reactor was evaluated. Co-digested PM with FV increased by 30% both biogas and methane yield and production, had a better organic matter removal and lower inhibitory compounds concentration. Organic matter and nitrogen compounds (NAT y NTK) and some total elements (Zn, Mg, Mn) showed a positive correlation with biogas and methane yield reduction. PM mono-digested digestate had the highest Ca, CE, Mn and Zn values. High Zn concentrations and pathogenic organisms could limit the use of these digestates as fertilizer. PM co-digestion with FV improves the anaerobic process. It also presents an alternative for both wastes management at local, regional and territorial level and a renewable energy option.

AGRADECIMIENTOS

A mi Director Roberto Candal, por su dedicación, por su aporte intelectual y por sus sabios consejos profesionales que hicieron posible la finalización de esta tesis.

A Diana Crespo, por el estímulo, por su confianza en mí, por apoyar mi crecimiento profesional, por enseñarme a ser perseverante y a no bajar los brazos cuando todo parecía perdido.

Al Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA), al Programa de Formación de Posgrado y al Proyecto Nacional de Recursos Naturales PNNAT 1128042, los cuales me brindaron el espacio físico y financiaron el desarrollo de esta tesis y mi formación.

A la Universidad Nacional de San Martín, por darme la oportunidad de continuar mi formación académica y por contar con profesionales de excelentísima calidad, que ampliaron mis conocimientos a través de los cursos, congresos y seminarios.

A mi compañera Euge, mi gran compañera de emociones, por compartir y vivenciar mis tropezones y caídas, pero también disfrutar mis avances y logros, por sus sabios consejos profesionales y de la vida también, por tantas horas dedicadas al desarrollo de esta tesis, por su eterna paciencia y por mucho más...este logro es también tuyo.

A todo el equipo de Alaralab, a Jose Luis especialmente, por el financiamiento de los análisis cromatográficos y por el aporte intelectual en el desarrollo del diseño de reactores, pero principalmente por apostar y confiar en mí, y por creer que el crecimiento de un país se consolida con la investigación. A Rosa por su carisma y por su espíritu tan positivo, A Sergio y Martín por tantas horas de dedicación y dejar de lado muchas veces su trabajo, por las charlas de la vida acompañada de mates, cositas dulces y saladas que lo hacían más llevadero. A Mario por su gran apoyo técnico y su sabiduría en electromecánica que salvaron muchas veces a mis ensayos. Estaré eternamente agradecida a todo el equipo de Alaralab, porque sin su ayuda esta tesis no hubiera sido posible.

Al grupo BIOPROA, y principalmente a Liliana Borzacconi y Mauricio Passeggi, quienes me permitieron realizar una capacitación en la Facultad de Ingeniería de la Universidad Nacional de la República del Uruguay (Uruguay). Gente linda del Uruguay, con gran

calidad humana y profesional, quienes han sido un pilar fundamental para el desarrollo de esta tesis.

A todos mis compañeros del laboratorio, a Pedro por compartir horas de trabajo, esfuerzo, y por el aporte de sus conocimientos, a Brian por sus aportes estadísticos, el análisis e interpretación de los datos, a Luis y a Matías (por donde estén girando en estos momentos) gracias gracias por el gran apoyo técnico, a Nico con quien hemos compartido viajes y muestreos juntos, dejando de lado muchas veces sus cosas y su trabajo y a Mauro por su apoyo profesional y técnico, y ayudarme siempre que lo necesite.

A Lorena La Fuente, comunicadora del IMYZA-INTA, por su enorme colaboración en el diseño de las figuras, el armado y estructuración de esta tesis, trasmitiéndome mucha tranquilidad y seguridad, sensaciones muy necesarias en las instancias finales de la presentación.

A mis dos amores, Cristian y mi hijo Ramirito, por entender mi amor por la investigación, por su gran apoyo incondicional, por tanto tanto tiempo no compartido juntos, por disfrutar mis avances tanto como yo, porque son el motor de mi vida, impulsándome en todo momento para superar mis obstáculos, por cada palabra de aliento y por hacerme ver que sí se puede. Eternamente juntos a la par....

A toda mi familia, mis padres quienes me han motivado para hacer lo que me gusta en la vida, porque me enseñaron a ser tenaz y perseverante para llegar a la meta. A mis hermanos queridos, a mis sobrinos, cuñados, a todos ellos: gracias por entender tantos domingos sin mi presencia y por tantas horas que no les pude dedicar.

A mis amigos, porque me bancaron cuando no pude estar, porque me prestaron sus oídos, sin comprender de qué hablaba, pero allí estaban y están siempre; por llenarme el alma de alegrías, risas y momentos felices, muy necesarios para transitar este largo recorrido.

“Quiero compartir con ustedes el secreto que me ha llevado a alcanzar todas mis metas: mi fuerza reside únicamente en mi tenacidad”. Louis Pasteur

ÍNDICE

1. Introducción General.....	12
1.1. Producción Avícola	13
1.1.1. Producción avícola a nivel mundial	13
1.1.2. Producción de huevos en Argentina	14
1.2. Potenciales Contaminantes del Guano y Su Impacto Ambiental.....	16
1.2.1. Potenciales contaminantes en el estiércol avícola	16
1.2.2. Impacto ambiental y riesgo en la salud humana asociado al manejo del guano	18
1.3. Opciones y Consideraciones para la Gestión del Guano	21
1.4. Principios de la Digestión Anaeróbica	23
1.4.1. Vías metabólicas del proceso anaeróbico.....	23
1.5. Factores Ambientales y Operativos Involucrados en el Proceso	28
1.6. Toxicidad e Inhibidores del Proceso	33
1.6.1. Toxicidad por amoníaco.....	34
1.6.2. Mecanismos de toxicidad por el NAL.....	35
1.6.3. Estrategias para controlar la inhibición por nitrógeno amoniacal	36
Objetivos	40
Objetivo General	41
Objetivos específicos	41
2. Métodos Analíticos	42
2.1 pH.....	43
2.2 Conductividad Eléctrica	44
2.2 Humedad, Materia Seca y Sólidos Totales.....	44
2.3 Materia Orgánica y Sólidos Volátiles	46
2.4 Nitrógeno Total Kjeldahl	48
2.5 Nitrógeno Amoniacal Total.....	50
2.6 Nitrógeno Amoniacal Libre	52
2.7 Fósforo Total.....	52
2.8 Determinación de los Cationes Ca, Mg, Mn, K, Na, Zn, Cu, Mo, Fe	54
2.9 Demanda Química de Oxígeno	55
2.10 Demanda Química de Oxígeno Soluble	57
2.11 Alcalinidad Parcial y Total.....	57
2.12 Ácidos Grasos Volátiles	59
2.13 Sólidos Suspendidos Totales y Volátiles	60
2.14 Sulfato	61
2.15 Composición del Biogás	62
2.16 Métodos Microbiológicos y Parasitológicos	62
3. De residuo a recurso: composición del guano.....	67
3.1 Introducción	68
3.2 Objetivo.....	70
3.3 Materiales y Métodos	70

3.4 Resultados y Discusión	73
3.5 Resumen de Resultados y Conclusiones	82
4. Ensayo de actividad metanogénica específica: potencialidades del inóculo.....	84
4.1 Introducción	85
4.2 Objetivo.....	94
4.3 Materiales y Métodos	94
4.4 Resultados y Discusión	102
4.5 Conclusiones	107
5. Ensayo de potencial bioquímico metanogénico: relación entre el sustrato y el inóculo para su optimización	108
5.1. Introducción	109
5.1.1. Ensayo de potencial bioquímico metanogénico (PBM)	109
5.1.2. Influencia de la naturaleza (origen) del inóculo y su relación con el sustrato	116
5.2. Objetivo	118
5.3. Materiales y Métodos	118
5.4. Resultados y Discusión.....	124
5.4.1. Características del inóculo y del sustrato	124
5.4.2. Producción de biogás y metano.....	125
5.4.3. Análisis químico de la fase líquida.....	133
5.5. Resumen y Conclusiones.....	140
6. Ensayo de potencial bioquímico metanogénico: proceso de co-digestión del guano. 143	
6.1. Introducción	144
6.2. Objetivo	145
6.3. Materiales y Métodos	145
6.4. Resultados y Discusión.....	149
6.4.1. Características de los residuos y el inóculo	149
6.4.2. Producción de biogás y metano.....	150
6.4.3. Análisis químico de la fase líquida.....	153
6.5. Conclusiones	158
7. Ensayo en reactores semi-continuos: guano co-digerido con residuos de frutas y verduras	159
7.1. Objetivo.....	162
7.2. Materiales y Métodos	163
7.3. Resultados	166
7.4. Discusión	174
7.5. Resumen y Conclusiones.....	179
8. Conclusiones y Comentarios Generales	181
9. Bibliografía	184
10. Anexos	206
10.1. Anexo 1: Abreviaturas.....	207
10.2. Anexo 2: Publicaciones	209

1. Introducción General

1.1.Producción Avícola

1.1.1. Producción avícola a nivel mundial

La industria avícola abarca principalmente dos tipos de producciones: carne aviar, en la cual se obtienen como productos la carne del ave y sus derivados, y huevos, en la cual se obtienen como productos huevos y sus derivados. En el caso de la producción de carne, abarca desde la faena del ave, hasta la obtención de los distintos productos y subproductos, tanto comestibles como no comestibles. En el caso de la producción de huevos, abarca desde la recolección de huevos en granjas para su expendio directo, hasta la obtención de los distintos productos y subproductos, tanto comestibles como no comestibles (SENASA, 2019).

La producción mundial de huevos y de carne aviar ha experimentado un constante aumento durante las últimas décadas. La rápida expansión de la producción avícola ha sido asociada con los cambios tecnológicos y el incremento de escala de unidad de producción. Específicamente, el desarrollo ha marcado un cambio desde la producción tradicional en pequeña escala, hacia los sistemas de producción comercial intensificados. Los avances genéticos en las líneas de aves, tanto para la producción de huevos como para carnes, el mayor conocimiento sobre la nutrición animal y el control de los microorganismos patogénicos transmisores de enfermedades en las aves, son los factores principales que han impulsado este rápido crecimiento de la producción avícola a nivel mundial. Así, pueden distinguirse tres fases de evolución histórica de los sistemas de producción: los sistemas tradicionales, donde se incluyen las aves de traspatio y la cría de parvadas familiares de aves que se alimentan de desechos principalmente, los sistemas semi-comerciales de pequeña escala y los sistemas comerciales de gran escala. Cada uno de estos sistemas, se basa en una metodología propia, donde difieren notablemente en cuanto a la inversión, tipo de aves utilizadas, nivel de cría, alimentos e insumos asociados (F.A.O., 2008).

Los registros históricos sobre la producción de huevos a nivel mundial, marcan un incremento del 70% desde 1994 al año 2014 (Windhorst, 2018). La Tabla 1 muestra el desarrollo global de la producción de huevos entre 1994 y 2014 por continente. El mayor incremento fue en Asia, representando un 70,2% del incremento total mundial. América del Norte, América del Sur y Central, contribuyeron un 13% y 8% del incremento total mundial, respectivamente, por lo que toda América tuvo un incremento del 21% del total mundial (1994-2014).

Tabla 1. Desarrollo de la producción mundial de huevos entre 1994 y 2014 por continente. Datos en 1000 Tn (Fuente: base de datos de la FAO).

Continente	Año 1994	Año 2014	Incremento (%)
África	1651	3054	85,0
Asia	20710	40925	97,6
Europa	9590	10940	14,1
Norte América ⁽¹⁾	5959	9016	51,3
América central y Sur	2872	5550	93,2
Oceanía	194	305	57,2
Mundial	40976	69791	70,3

Referencias. (1) Canadá, México y USA. Elaborado por Windhorst (2018).

1.1.2. Producción de huevos en Argentina

En Argentina, la población de aves en postura fue de 43,1 millones de aves en el año 2016 con una proyección para el 2017 de 47 millones. Prácticamente, hay una gallina por habitante en Argentina (Prida, 2017).

La actividad agroindustrial de producción de huevo en Argentina se encuentra concentrada principalmente en las provincias de Buenos Aires con el 41%, Entre Ríos con el 24%, Córdoba con el 7%, Mendoza con el 7% y Santa Fe con el 7% (Rodríguez et al., 2016). En la Figura 1 puede observarse un resumen de la producción avícola en el año 2016.

En el año 2017 la producción de huevos fue de 12.900 millones de unidades, significando un crecimiento de 2% en relación al año anterior. El 90% se comercializó como huevo de mesa y el 10% se destinó a la industria del huevo procesado y sólo un 3% del total de unidades anuales se destina a mercado externo. El consumo per cápita se incrementó durante los últimos años, pasando de 272,8 a 284 huevos al año en el año 2017 (Prida, 2018).

Argentina, es un gran consumidor de huevo, ocupando el segundo lugar en Latinoamérica detrás de México y por arriba de Estados Unidos, en el puesto 5 a nivel mundial. En cuanto a los sistemas de producción y la tecnología adoptada en Argentina, conviven distintos sistemas de producción, entre los clásicos, antiguos, abiertos, y los galpones automatizados. Incluso la mayoría de las granjas que tienen automatización, también tiene parte de los galpones antiguos. Se estima que entre un 52 y 55% de las granjas comerciales

se manejan bajo los sistemas automatizados (Prida, 2017). No existe prácticamente la producción de huevo a piso, como así tampoco la producción de galpones con equipamiento de jaulas enriquecidas ni sistemas sin jaulas (Rodríguez et al., 2016).

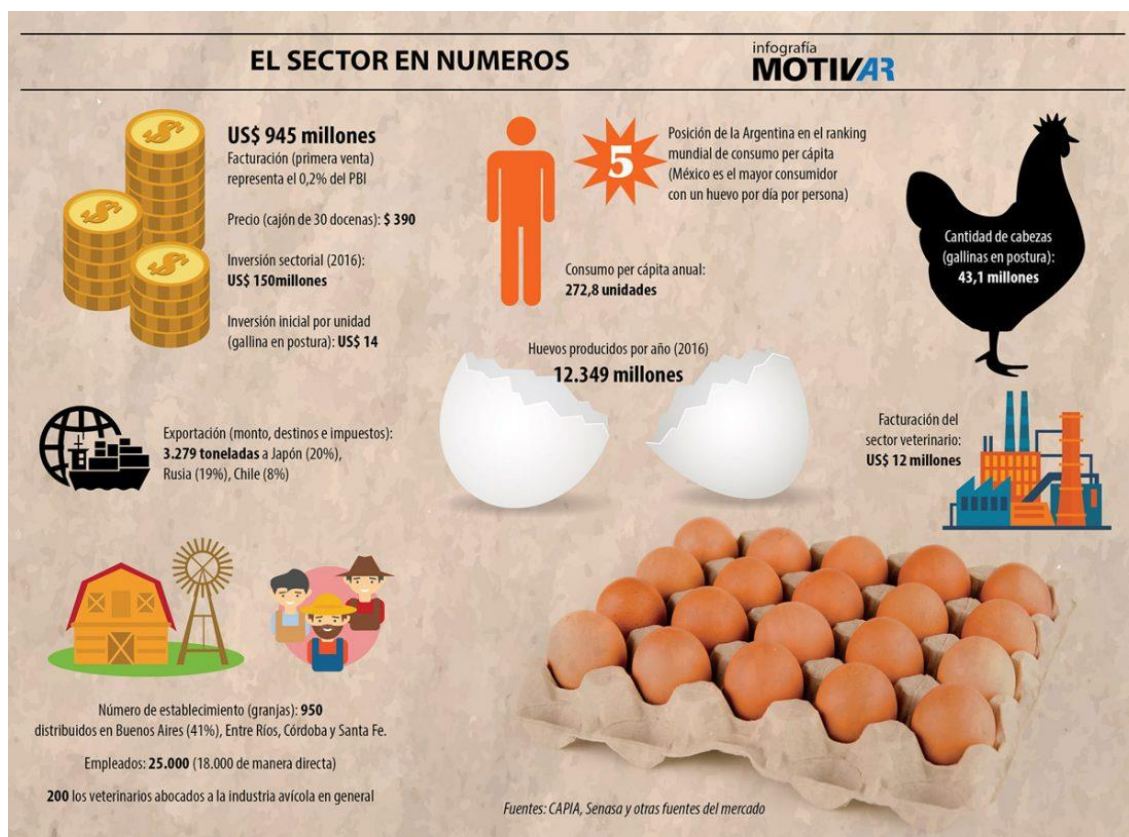


Figura 1. Producción de huevos en Argentina. Infografía extraída de la revista Motivar, 2017.

Como fortaleza de la producción de huevos en Argentina, es que es libre de influenza aviar y enfermedad Newcastle. Asimismo, en octubre de 2015 se aprobó el certificado sanitario de exportación de huevo en cáscara a los Estados Unidos. Las certificaciones internacionales y la oferta nacional de huevo atomizado hacen que esta actividad sea un mercado de competencia a nivel mundial. Otra fortaleza del país, es que posee muy buena disponibilidad de materias primas y facilidades de acceso al agua en la mayoría de los lugares y plantas de procesamiento industrial con alta tecnología.

Entre las debilidades de Argentina se pueden mencionar los escasos recursos humanos y formación en avicultura, superposición de normativas que dificultan el cumplimiento, falta de desarrollo en el *packaging* y presentación del producto, informalidad de la actividad y del sector en general, alta disparidad en la adopción de tecnología, lo que genera un incremento significativo de los costos, el aumento de desechos avícolas y bajo control de calidad de materias primas (Rodríguez et al., 2016).

1.2.Potenciales Contaminantes del Guano y Su Impacto Ambiental

1.2.1. Potenciales contaminantes en el estiércol avícola

El impacto global de los animales pecuarios en el ambiente es actualmente muy alto y contribuye enormemente al cambio climático y al agotamiento de los recursos. Se estima que alrededor de 21,3 billones de gallinas, 1,67 billones de vacas y búfalos, 1,21 billones de ovejas, 1,01 billones de cabras y 0,98 billones de cerdos están siendo criados en todo el mundo (año 2014), para la producción de productos alimenticios (leche, carne, huevos) como así también subproductos de la faena animal (lana, sangre, cuero, grasa, plumas). Estos animales pueden producir 20 millones de toneladas de materia seca y 10 millones de toneladas de materia orgánica a través de sus estiércoles diariamente (Cháves-Fuentes et al., 2017).

En Argentina, durante los últimos 20 años, la producción nacional de huevos creció 143% (2016). Este incremento fue acompañado con un aumento en la cantidad de granjas avícolas y de galpones dentro de las mismas. Actualmente, están registradas 43,1 millones de gallinas en granjas comerciales que excretan diariamente entre 0,08-0,10 kg/animal (Secretaria de Agroindustria, 2018). En relación a estos datos, se generan en promedio 1.300.000 Tn de guano/año.

Los estiércoles, son ricos en compuestos orgánicos y nutrientes, pero pueden causar problemas ambientales significativos si no se manejan adecuadamente. En particular, el estiércol de aves contiene considerables cantidades importantes de nutrientes como el nitrógeno y fósforo, pero también otras sustancias como hormonas, antibióticos, patógenos y metales pesados, los cuales son introducidos en el manejo de la producción y a través de la alimentación (F.A.O., 2008). El lixiviado y la escorrentía de estas sustancias tienen potencial para contaminar los cuerpos de aguas superficiales y acuíferos. A continuación, se describen las principales fuentes de contaminación asociados al estiércol de aves ponedoras.

Nutrientes

Las aves criadas en sistemas de producción intensiva consumen a través de la alimentación una cantidad considerable de proteínas y otras sustancias que contienen nitrógeno. La conversión del nitrógeno proveniente de la dieta es relativamente ineficiente: entre el 50 a 80% del nitrógeno es excretado por las aves como compuestos

orgánicos e inorgánicos (Arogo et al., 2001; Burton and Turner, 2003; Gerber et al., 2007).

El fósforo es un elemento esencial para el crecimiento animal. A diferencia del nitrógeno, el fósforo es relativamente estable una vez que se une a las partículas del suelo y no se filtra a través del suelo en acuíferos. En particular no presenta ningún riesgo ambiental ya que se acumula en el suelo cuando se aplica en exceso. La principal forma de emisión desde el estiércol es como fosfato (F.A.O., 2008).

Metales pesados

El estiércol contiene cantidades apreciables de metales potencialmente tóxicos como el arsénico, el cobre y zinc (Bolan et al., 2004; F.A.O., 2008). Estos metales ingresan al animal a través de la alimentación, ya sea de forma involuntaria por una contaminación del alimento o de forma voluntaria por el agregado de aditivos para satisfacer las necesidades del animal o en mayores proporciones, como uso veterinario y promotores de crecimiento.

Residuos de drogas

Los antibióticos se administran a las aves de corral por razones terapéuticas o para prevenir enfermedades. A dosis mucho más bajas (dosis terapéuticas) los antibióticos son utilizados como aditivos en el alimento para aumentar la tasa de crecimiento y mejorar la eficiencia de la alimentación. Independientemente de la dosis, se estima que un 75 por ciento de los antibióticos administrados a las aves de corral confinadas pueden ser excretados al ambiente (F.A.O., 2008). La interacción entre los organismos bacterianos y los antibióticos en el ambiente puede contribuir al desarrollo de cepas bacterianas resistentes a los antibióticos (Martinez, 2009). Campagnolo et al. (2002), evaluaron la presencia de compuestos antimicrobianos en recursos de agua superficial y subterránea próximos a avícolas intensivas en Ohio y encontraron residuos de antibióticos prevalentes en el 67% de las muestras de aguas analizadas.

Patógenos

El inadecuado manejo y disposición de los estiércoles de aves puede afectar a los recursos hídricos y al suelo por presencia de agentes patógenos. Los parásitos como *Cryptosporidium* y *Giardia* spp pueden fácilmente propagarse desde el estiércol a cuerpos de agua y permanecer viables en el ambiente por extensos períodos de tiempo (Burton and Turner, 2003).

1.2.2. Impacto ambiental y riesgo en la salud humana asociado al manejo del guano

La intensificación de la producción y la concentración geográfica de unidades de producción avícola generalmente producen altos niveles de impacto ambiental, principalmente relacionado con el inadecuado manejo de los estiércoles y la sobrecarga de nutrientes (Hu et al., 2017). En la Figura 2 puede observarse el impacto negativo de contaminantes presentes en el estiércol, que representan un riesgo para el ambiente y para la salud de la población.

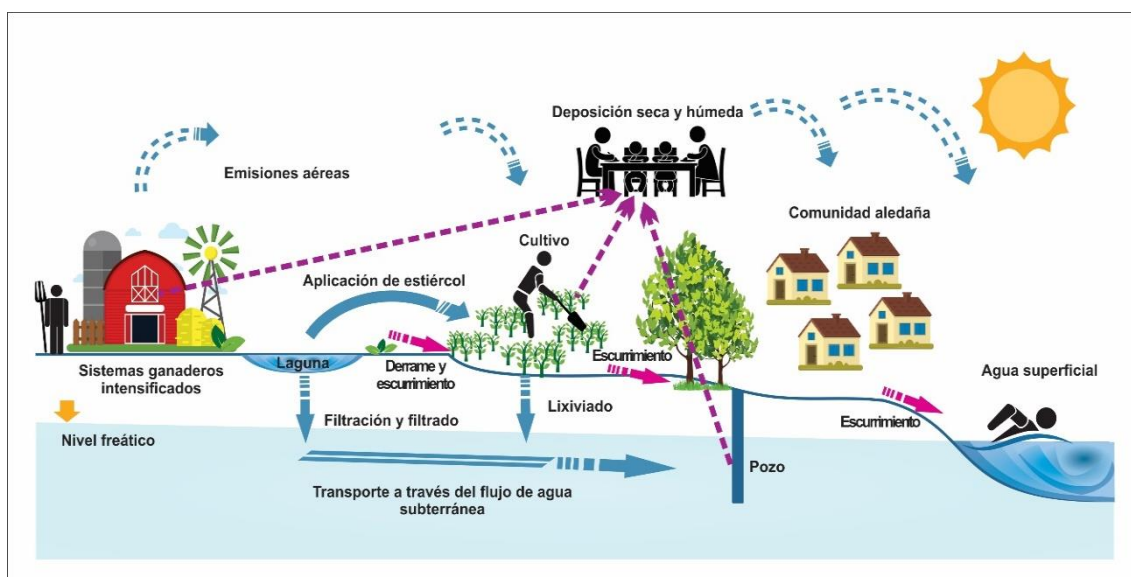


Figura 2. Impacto ambiental y a la salud humana ocasionada por las producciones avícolas de los sistemas intensificados. Fuente: Hu et al. (2017), modificada en español.

La disposición final del guano comúnmente su aplicación al suelo como uso agronómico. Esta práctica, entraña un riesgo de contaminación de las aguas superficiales y subterráneas por potenciales contaminantes contenidos en el estiércol. Su importancia depende de varios factores, entre ellos el potencial agronómico de los cultivos receptores para utilizar los nutrientes, el tipo geológico y las condiciones específicas del suelo receptor, la distancia de las aguas superficiales y subterráneas cercanas, la cantidad de zonas con vegetación adyacentes a las aguas superficiales cercanas y el clima (Williams, 2013). La carga y acumulación de nutrientes dentro de una región es de gran importancia ya que puede impactar en la diversidad y la productividad de los organismos vivos esenciales existentes en estado natural en esa región (Williams, 2013).

Los nutrientes principales que representan un riesgo ambiental son el nitrógeno y el fósforo. Los compuestos de nitrógeno en el guano son muy dinámicos y desaparecen de la tierra por su absorción por el cultivo receptor o su conversión en gases que se volatilizan en la atmósfera principalmente como amoníaco y óxidos de nitrógeno (Hu et al., 2017). El nitrógeno es muy móvil en el suelo y puede ser transportado a las aguas subterráneas y/o las aguas superficiales cercanas. El impacto de la deposición del amoníaco incluye: acidificación del suelo y agua, eutrofización causada por exceso de nitrógeno con la consecuente pérdida de especies e incremento de las emisiones de gases de efecto invernadero por emisión de óxidos de nitrógeno.

El fósforo es un elemento inmóvil pero bajo ciertas condiciones de clima, suelo y concentración, puede filtrarse a las aguas subterráneas poco profundas o ser transportado hasta las aguas superficiales a través de la erosión o las escorrentías subterráneas. El nitrógeno en forma de nitratos en el agua potable puede tener efectos adversos en la salud. Además, el nitrógeno y el fósforo en ciertas concentraciones, así como las condiciones ambientales pueden causar la degradación de las aguas superficiales (Hu et al., 2017).

Algunos metales como el cobre y el zinc pueden estar presentes en el guano. Estos metales en exceso pueden causar toxicidad a las plantas, efectos adversos a organismos que se alimentan de estas plantas y pueden ingresar a cuerpos de agua mediante escorrentía o lixiviación (F.A.O., 2008).

La calidad del aire también puede verse afectada por la producción avícola en sistemas intensificados. El dióxido de carbono, metano, amoníaco, sulfuro de hidrógeno, ácidos orgánicos volátiles, mercaptanos, aminas, son algunos de los compuestos que son liberados de estiércoles animales como producto de su descomposición (Hu et al., 2017).

El amoníaco es el contaminante de mayor impacto ecológico, ya que en altas concentraciones repercute en los ecosistemas locales y a la salud de la población. Su concentración a la atmósfera depende de varios factores como el clima, tipo de establecimiento, condiciones de almacenamiento y gestión del guano (Williams, 2013).

El sulfuro de hidrógeno, los compuestos orgánicos volátiles, metano y dióxido de carbono pueden generarse de la descomposición metabólica del guano. La formación de estos compuestos se ve favorecida bajo condiciones de escasez de oxígeno, que ocurre principalmente cuando el guano es dispuesto en pozos, en lagunas o en sistemas de contención al aire libre (Williams, 2013). Las emisiones de metano y CO₂ por la descomposición del estiércol representan un porcentaje importante de las emisiones de gases de efecto invernadero. Acorde a U.S.E.P.A (2017), en el año 2015 un 10,1 % del

total de las emisiones antropogénicas de metano correspondió al manejo del estiércol en Estados Unidos. En China, el 7,1 % del total de emisiones antropogénicas de metano correspondió al manejo del estiércol (Zhang et al., 2015).

El material particulado y bioareosoles, también afectan a la calidad de aire, a la salud humana y animal, ya que pueden transportar materia fecal seca, bacterias, endotoxinas, hongos, micotoxinas ácaros y otros parásitos (Hu et al., 2017). El esparcimiento del estiércol animal al suelo, particularmente en el caso de sobre-aplicación, puede emitir agentes microbiológicos y productos gaseosos a la atmósfera (Greger and Koneswaran, 2010). Las emisiones de polvo y bioareosoles dependerá de múltiples factores como el clima, el tipo de establecimiento la consistencia del alimento (seco o pellet) y los mecanismos de control (por ejemplo barreras) para prevenir que las partículas grandes de polvo salgan de la zona cercana al establecimiento (Williams, 2013). Las condiciones climáticas juegan un rol importante en el impacto de los contaminantes atmosféricos. Por ejemplo, las condiciones excesivamente secas, causan un aumento de las enfermedades respiratorias que afecta a la productividad de las aves, mientras que un guano húmedo provoca un incremento de las concentraciones de amoníaco y de microorganismos patogénicos en el ambiente que repercuten también negativamente en la productividad (Williams, 2013).

Además de la presencia de estos contaminantes, la inadecuada gestión del guano genera un impacto social vinculado a la generación de olores desagradables y a la presencia de plagas sinantrópicas como moscas y roedores. Los olores (mezcla compleja de amoníaco, sulfuro de hidrogeno, dióxido de carbono y compuestos orgánicos volátiles), son llevados desde las granjas mediante material particulado y polvo. Dependiendo de las condiciones climáticas, estos olores pueden llegar hasta 5-10 Km de distancia (Hribar, 2010). Los olores ocasionados por los estiércoles, pueden generar fuertes cambios en el estilo de vida de los individuos que habitan en zonas cercanas a las avícolas. Cuando los olores son intensos, la gente elije cerrar las ventanas, aunque las temperaturas sean altas y no haya aires acondicionados, prefieren realizar actividades internas antes de salir al exterior. Existe un deterioro mental ocasionado por vivir en ambientes cerrados, como la depresión, tensión, angustia y estados anímicos negativos, entre otros (Hribar, 2010; Hu et al., 2017).

Las características del guano, rico en materia orgánica y alto contenido de humedad, favorecen la proliferación de insectos, principalmente de la mosca doméstica. La mosca puede pasar del estado de huevo a adulto en 10 días, por lo que se necesita una

higienización y manejo del guano regularmente para evitar su proliferación. Si bien las moscas son consideradas solo molestas, éstas pueden ser vehículo de transmisión de microorganismos patogénicos que afectan a la salud humana (Hribar, 2010). Aunque menos frecuente que moscas y mosquitos, se reporta la presencia de ratas y otros roedores, asociada al manejo del alimento de las aves y al almacenamiento y pérdidas en los sistemas de alimentación (F.A.O., 2008).

1.3.Opciones y Consideraciones para la Gestión del Guano

A nivel mundial, la práctica comúnmente utilizada es la aplicación del guano en terrenos para cultivos debido principalmente a que es un sustrato rico en nutrientes. Sin embargo, y en relación a lo expuesto anteriormente, se conoce que esta práctica genera un impacto ambiental negativo, afectando a la salud de la población, asociada a la presencia de otros componentes además de los nutrientes, como metales pesados, antibióticos, parásitos y microorganismos patogénicos, y a la sobre-aplicación del guano. Los riesgos asociados a la aplicación del estiércol pueden ser reducidos si se lleva a cabo un plan de manejo de nutrientes y buenas prácticas de fertilización, donde el estiércol es aplicado respetando los tiempos de aplicación y los requerimientos de nutrientes del cultivo.

El secado del guano es otras de las prácticas utilizadas para el manejo del guano. El secado puede realizarse con máquina o simplemente por esparcimiento. Esto reduce el contenido de humedad y consecuentemente la emisión de olores, la presencia de moscas y patógenos en el guano (F.A.O., 2008). El guano seco, puede ser incinerado en hornos para la producción de calor o ser transportado a centros donde se queman a gran escala para la producción de electricidad. La viabilidad operativa y los problemas derivados de las emisiones también afectan a este proceso, principalmente cuando los hornos no son los adecuados (Williams, 2013).

El compostaje es una de las tecnologías más utilizadas para el tratamiento del guano. Es un proceso biológico aeróbico de descomposición de la materia orgánica que representa un método práctico y económicamente viable para la estabilización del guano (F.A.O., 2008). Si el proceso aeróbico ocurre eficientemente, se obtiene un producto estable y maduro que puede ser valorizado como enmienda en el suelo. A diferencia de la aplicación cruda del guano, el producto compostado, reduce o prácticamente elimina patógenos y larvas de moscas, reduce la humedad, el peso y el volumen para ser

transportado, mejorando así las características del manejo del guano. La desventaja que presenta el compostaje, es que mediante su proceso de degradación se liberan gases de efecto invernadero que impactan en la calidad del aire y la pérdida de nutrientes como el nitrógeno (Glatz et al., 2011). Se ha observado que los olores, emisión de gases, bioareosoles, la falta de uniformidad del índice de madurez del compost y la generación de lixiviados son los obstáculos operacionales más importantes que presentan las plantas de compostaje (Tabatabaei and Ghanavati, 2018).

Otra de las tecnologías apropiadas para tratar el guano es la digestión anaeróbica. Los estiércoles animales son sustratos adecuados para la digestión anaeróbica debido a su alta humedad, capacidad *buffer*, contenido de materia orgánica y a una gran variedad de nutrientes. El proceso anaeróbico de degradación de la materia orgánica transforma al guano en dos productos de valor agregado: el biogás, compuesto gaseoso de potencial uso energético y un compuesto semilíquido que puede ser utilizado como biofertilizante. Otra de las ventajas de esta tecnología, es que reduce el volumen del residuo y las emisiones de gases de efecto invernadero. Debido a estos beneficios, la digestión anaeróbica es una de las tecnologías más utilizadas como tratamiento de los residuos sólidos orgánicos (Glatz et al., 2011). La eficiencia y el rendimiento del biogás dependen de múltiples factores, como la viabilidad operativa y una gestión eficaz de la planta de digestión anaeróbica, como así también la composición y calidad de sustrato.

Un estudio realizado por Cháves-Fuentes et al. (2017) mostró que el potencial de biogás y metano a nivel mundial para los estiércoles animales es de 2845 millones de Nm^3/d y 1894 millones de $\text{Nm}^3\text{CH}_4/\text{d}$, y en particular para los estiércoles de gallinas de 362 millones de Nm^3/d (13% del total) y 221 millones de Nm^3/d (12% del total), respectivamente. Se estima un potencial de recuperación energética de 21000 GWh por día a nivel mundial a través de la utilización de los estiércoles.

Sin embargo, el bajo rendimiento de biogás y metano generado por el guano puede hacer que la relación costo-beneficio sea desfavorable, por lo que se ha desalentado la aplicación de esta tecnología mundialmente en la industria avícola (Glatz et al., 2011). A pesar de ello, los avances tecnológicos sobre el diseño de reactores (por ejemplo reactores de alta carga), y sobre la comprensión en las funciones que gobiernan el proceso anaeróbico, condujeron a un crecimiento de plantas de biogás para el tratamiento de los residuos avícolas (Sakar et al., 2009).

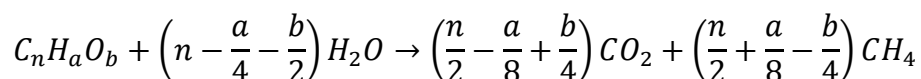
1.4.Principios de la Digestión Anaeróbica

1.4.1. Vías metabólicas del proceso anaeróbico

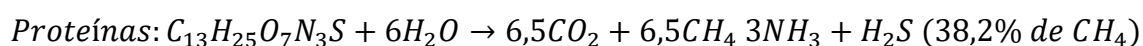
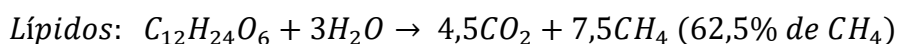
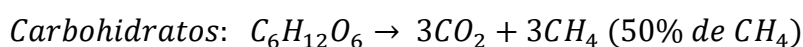
El proceso anaeróbico es definido como un proceso biológico en el cual la materia orgánica es metabolizada en un ambiente libre de oxígeno disuelto o sus precursores. Dependiendo del tipo de aceptor de electrones el proceso anaeróbico puede ser clasificado como fermentación anaeróbica o respiración anaeróbica (Angelidaki et al., 2011). En la fermentación anaeróbica, la materia orgánica es catabolizada en ausencia de un aceptor de electrón inorgánicos, por bacterias estrictas o facultativas anaeróbicas mediante un balance de reacciones de óxido-reducción y bajo condiciones de oscuridad. La mayor parte de la formación del metano se produce vía fermentación anaeróbica, dónde el acetato actúa como dador y aceptor de electrones. La producción de metano por esta vía es comúnmente llamada metanogénesis acetotrófica o acetoclástica.

En la respiración anaeróbica se requiere aceptores de electrones inorgánicos para la disposición de los electrones liberados durante la degradación de la materia orgánica. El aceptor de electrones puede ser CO_2 , SO_4^{2-} o NO_3^- . Cuando el CO_2 , acepta los electrones liberados por la materia orgánica, se reduce a CH_4 . La producción de metano a través de esta vía es conocida como la metanogénesis hidrogenotrófica (Khanal, 2008).

La reacción general de la metanogénesis puede resumirse con la siguiente ecuación estequiométrica (Angelidaki et al., 2011):



Los residuos orgánicos son compuestos insolubles complejos, los cuales pueden agruparse en tres principales grupos: carbohidratos, lípidos y proteínas. A modo de ejemplo, las reacciones químicas de degradación de materia orgánica y producción de metano que ocurren en un reactor anaeróbico son (Lei, 2018):



Como puede observarse, a través de los lípidos podría obtenerse la mayor producción de metano.

Estas reacciones son complejas y ocurren en múltiples etapas, bajo la acción combinada y coordinada de tres principales grupos de microorganismos: bacterias fermentativas primarias (hidrolíticas-acidogénicas), bacterias oxidantes anaeróbicas (sintrofica-acetogénica) y las arqueas metanogénicas. El proceso anaeróbico ocurre en un perfecto equilibrio cuando las velocidades de reacción están balanceadas, donde el producto de una de las etapas es sustrato de la siguiente. Si las bacterias hidrolíticas están inhibidas o no degradan el sustrato, la segunda y tercera etapa estarán limitadas y la producción de metano se verá reducida. A continuación, se describen las principales vías metabólicas de la digestión anaeróbica de residuos orgánicos.

Hidrólisis

Los sustratos orgánicos contienen polímeros complejos (largas moléculas insolubles) los cuales son inaccesibles para los microorganismos sin una ruptura previa de las uniones químicas a través de la hidrólisis. Las moléculas más pequeñas formadas por la lisis de los polímeros son solubles y pueden ser utilizadas por las bacterias acidogénicas. Durante la hidrólisis, las bacterias hidrolíticas excretan enzimas extracelulares para convertir las macromoléculas de carbohidratos, lípidos y proteínas en monosacáridos, ácidos de cadena larga y aminoácidos, respectivamente (Meegoda et al., 2018). Después del clivaje enzimático, los productos son capaces de difundir a través de la membrana celular de las bacterias acidogénicas. Sin embargo, ciertos sustratos como la lignina, celulosa y hemicelulosa, son de difícil degradación debido a su estructura compleja y de difícil acceso para las acidogénicas. Algunas enzimas pueden ser adicionadas para incrementar la hidrólisis de estos carbohidratos (Lin et al., 2010).

La hidrólisis puede ser el paso limitante del proceso, principalmente cuando los sustratos son complejos como estiércoles, lodos, residuos agrícolas y residuos domiciliarios (Meegoda et al., 2018). Sin embargo, se ha demostrado que la metanogénesis puede ser el paso limitante, dependiendo de la relación existente entre los microorganismos hidrolíticos y metanogénicos (Ma et al., 2013). Debido a la importancia de la hidrólisis, se ha prestado gran atención a las diferentes alternativas de pre-tratamientos que la optimicen, especialmente para digestores anaeróbicos que traten residuos lignocelulolíticos (Kumar and Sharma, 2017).

Acidogénesis

Los compuestos producidos durante la vía metabólica hidrolítica son degradados por bacterias facultativas y anaeróbicas a través de procesos fermentativos. Cuando son absorbidos a través de la membrana celular de las bacterias acidogénicas, se producen ácidos grasos volátiles (AGV) y otros compuestos intermediarios del proceso, como compuestos sulfurados y nitrogenados (Angelidaki et al., 2011; Meegoda et al., 2018). Los AGV constituyen una clase de ácidos orgánicos como acetato, y los ácidos de cadena más larga tales como propionato y butirato.

La acidogénesis es la vía metabólica más rápida, donde las bacterias son capaces de regenerarse en un tiempo relativamente corto (Deublein and Steinhauser, 2011). Debido a la rapidez con la que ocurre este paso, varios estudios han reportado una interrupción del proceso anaeróbico por acidificación del sistema (Meegoda et al., 2018).

Los sustratos de mayor abundancia para la fermentación son los monosacáridos y aminoácidos, los cuales presentan diferentes vías fermentativas (Angelidaki et al., 2011). En la acidogénesis se incluye la formación de etanol, butirato, lactato, propionato y acetato a través de aminoácidos y monosacáridos. Un importante producto que se forma en este paso a través de residuos ricos en proteínas, es el amoníaco desde la desaminación de aminoácidos (Khanal, 2008).

Varios tipos de sustratos y condiciones ambientales en el digestor determinan el producto final del metabolismo de las bacterias acidogénicas. La regulación del H_2 es importante para que las reacciones bioquímicas sean termodinámicamente favorables. Los productos acetato, CO_2 e H_2 , los principales sustratos de las metanogénicas, se forman sólo cuando la presión parcial de hidrógeno es baja (Khanal, 2008). Aproximadamente se forman en esta etapa, 51% de acetato, 19% de H_2/CO_2 y 30% de productos reducidos (AGV), alcoholes o lactato (Kumar et al., 2013).

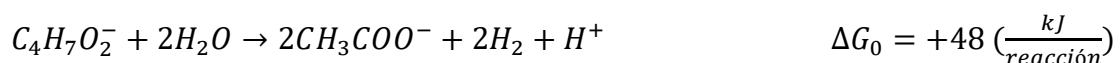
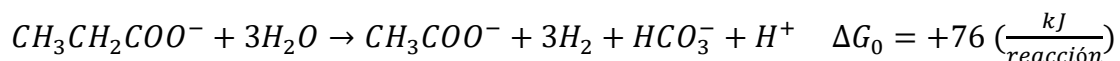
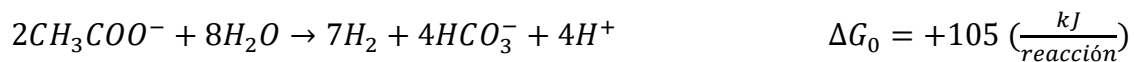
Acetogénesis

El acetato puede ser producido no solo a través de la fermentación de compuestos orgánicos solubles sino también por la acetogénesis. En este paso, se sintetiza acetato a través de la reducción de CO_2 y de la degradación de los ácidos orgánicos (como butirato y propionato) y alcoholes (como etanol) producidos en la acidogénesis. Existen dos grandes grupos de bacterias formadoras de acetato, las acetogénicas consumidoras de H_2 (homoacetogénicas) y las acetogénicas productoras de H_2 (Angelidaki et al., 2011; Divya et al., 2015).

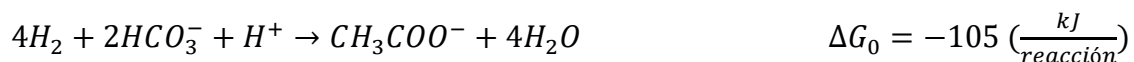
Las homoacetogénicas compiten con las metanogénicas por los sustratos como H_2 , formiato y metanol. Las acetogénicas productoras de H_2 oxidan los ácidos orgánicos y

alcoholes producidos en la acidogénesis a acetato. Durante este proceso se producen H_2 o bicarbonato para generar luego formiato. Como ejemplo, el butirato y el propionato son oxidados por las bacterias acetogénicas productoras de H_2 , utilizando iones hidrógeno y dióxido de carbono como aceptores de electrones para generar como producto H_2 y acetato, los sustratos principales de las metanogénicas. Estas reacciones ocurren en condiciones energéticas desfavorables, por lo que las bacterias solo pueden derivar energía para su crecimiento si las concentraciones de los productos generados se mantienen bajas (Kumar et al., 2013; Meegoda et al., 2018). Existe una dependencia obligada para que las bacterias acetogénicas consumidoras de H_2 , las metanogénicas u otras consumidoras de H_2 (sulfato-reductoras), remuevan el producto H_2 del medio. Esta relación entre las productoras y consumidoras de H_2 es llamada relación sintrófica y es indispensable para mantener el proceso de degradación anaeróbica completo. El acetato formado por las bacterias acetogénicas puede ser usado directamente por las metanogénicas acetoclásticas o puede ser degradado por las asociaciones sintróficas de bacterias y por las bacterias metanogénicas consumidoras de H_2 (Angelidaki et al., 2011). A continuación, se muestra la degradación de los ácidos grasos por la vía sintrófica y los cambios en la energía libre de Gibbs (ΔG_0) de las reacciones (Angelidaki et al., 2011):

1- Oxidación de los ácidos (acetogénicas productoras de H_2 y acetato)



2- Utilización de hidrógeno por las metanogénicas y homoacetogénicas



3- Oxidación sintrófica del acetato acoplado con la metanogénesis hidrogenotrófica



Metanogénesis

La metanogénesis marca el paso final de la digestión anaeróbica, donde los productos intermediarios son consumidos por las metanogénicas para producir metano. Las metanogénicas son un grupo de arqueas anaeróbicas estrictas, que producen metano a

través de tres vías: consumo de acetato por las bacterias acetoclásticas, consumo de H₂ y CO₂ por las bacterias hidrogenotróficas y por consumo de compuestos metilados (metanol, metilaminas, metilmercaptopropionato) por las bacterias metilotróficas (Angelidaki et al., 2011; Bharathiraja et al., 2016):



El acetato es la fuente más importante de producción de metano, representando un 70% del total producido (Angelidaki et al., 2011). Sin embargo, la concentración de amoníaco es uno de los factores claves que influyen en la composición de la comunidad metanogénica y la vía dominante de formación de metano. Un estudio reciente demostró que en digestores con altas concentraciones de nitrógeno amoniacal, un 75% del metano es producido por la vía hidrogenotrófica, mientras que cuando las concentraciones de nitrógeno amoniacal fueron bajas, entre un 9-23% de metano es producido por esta vía (Jiang et al., 2018).

Las metanogénicas parecen tener un tiempo de regeneración significativamente más lento que el resto de las bacterias involucradas en el proceso de digestión anaeróbica, entre 5-16 días. Sin embargo, algunas especies metanogénicas hidrogenotróficas se regeneran en un tiempo mucho menor, en tan sólo 2 horas (Deublein and Steinhauser, 2011; Schnurer and Jarvis, 2010). Debido a que las metanogénicas generalmente crecen en un tiempo relativamente lento, esta etapa puede ser la limitante del proceso. Asimismo, las metanogénicas son frecuentemente las más sensibles a alteraciones o cambios de pH o presencia de compuestos tóxicos como metales pesados o contaminantes orgánicos. Debido a que estos organismos cumplen el rol más importante para la formación del metano, la inhibición o interrupción del desarrollo de las metanogénicas puede afectar seriamente todo el proceso (Schnurer and Jarvis, 2010).

En la Figura 3 se muestra un resumen de las diferentes vías metabólicas de la digestión anaeróbica.

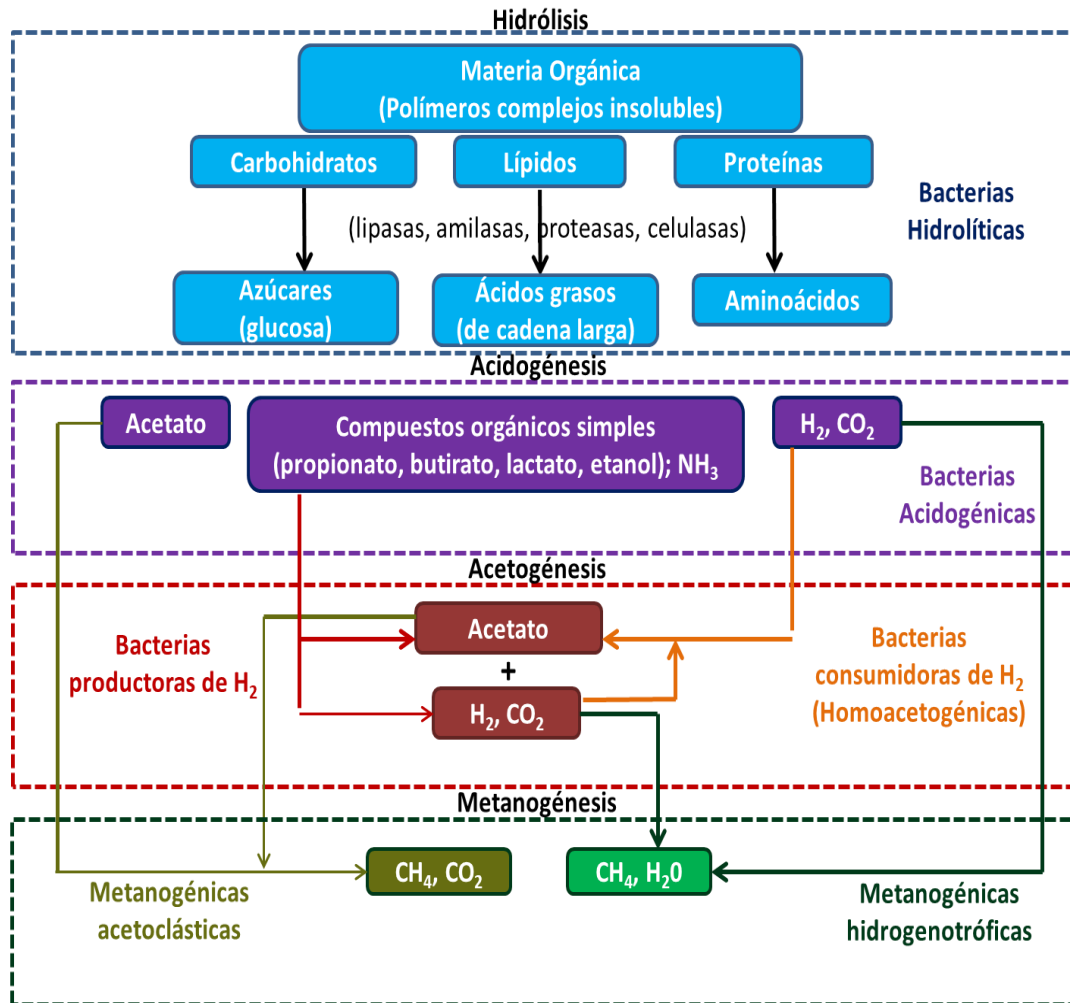


Figura 3. Esquema de las vías metabólicas de la digestión anaeróbica, mostrando los principales sustratos, productos y bacterias involucradas en cada paso (elaboración propia).

1.5. Factores Ambientales y Operativos Involucrados en el Proceso

Como se describió anteriormente el proceso anaeróbico es llevado a cabo por un consorcio microbiano que actúa de manera sincronizada en diferentes pasos y vías metabólicas. La afección de un grupo de bacterias puede producir la interrupción del proceso anaeróbico. Para que ocurran las reacciones de degradación se deben generar las condiciones ambientales para el crecimiento y desarrollo de cada grupo microbiano. A continuación, se describen los principales factores ambientales y operativos que están involucrados en el proceso anaeróbico.

Temperatura

Los microorganismos de la digestión anaeróbica son muy sensibles a cambios en la temperatura, la cual afecta a la producción de metano y la degradación de los materiales

orgánicos. Un decrecimiento de la temperatura resulta en un decrecimiento en la producción de los AGV, de la concentración de nitrógeno amoniacal, la tasa de utilización del sustrato y la tasa metabólica de los microorganismos, factores que conducen al decrecimiento del rendimiento de biogás. Por el contrario, el incremento de la temperatura conduce a un incremento del pH, de la hidrólisis de los materiales orgánicos y del potencial de metano (Mao et al., 2015).

La conversión de materia orgánica tiene su mayor eficiencia a 35-40 °C para condiciones mesofílicas y a 55°C para condiciones termofílicas. Sin embargo, los digestores anaeróbicos pueden operar a temperaturas más bajas sin grandes cambios en el ecosistema microbiano (Khanal, 2008). En la Tabla 2 se muestra el rango de crecimiento óptimo de las bacterias metanogénicas, las cuales son las más sensibles a los cambios de temperatura (Schnurer and Jarvis, 2010). Aunque estas bacterias son activas y crecen en un amplio rango de temperatura, la mayoría de ellas son mesofílicas.

Tabla 2. Rango óptimo de crecimiento de las bacterias metanogénicas.

Grupo de bacterias	Rango de temperatura, °C
Psicrófilas	5-25
Mesófilas	30-35
Thermófilas	50-60
Hypertermófilas	> 65

Fuente: Schnurer and Jarvis (2010) y Khanal (2008).

La temperatura es uno de los factores que más afectan a la actividad microbiana, debido a que influye en la velocidad de reacción y las actividades enzimáticas de las bacterias. Las fluctuaciones de temperatura pueden afectar no solo a las metanogénicas sino también a las acidogénicas, produciendo un cambio en la performance del proceso anaeróbico.

Cuando la biomasa es rica en compuestos nitrogenados, como algunos estiércoles, la degradación anaeróbica es mejor en condiciones mesofílicas que termofílicas, ya que el nitrógeno amoniacal se incrementa con la temperatura (Chen et al., 2008; Mao et al., 2015; Tabatabaei and Ghanavati, 2018). Todos los ensayos en esta tesis doctoral fueron realizados bajo condiciones mesofílicas.

pH

El pH, al igual que la temperatura, ejerce un marcado efecto sobre la velocidad de crecimiento y la actividad enzimática de los microorganismos. En el proceso anaeróbico existen diversos grupos microbianos cuyas actividades metabólicas dependen del pH y

están sincronizadas para que el proceso ocurra en estado de equilibrio. Si bien diferentes grupos microbianos responsables de la degradación anaeróbica presentan distinto grado de sensibilidad al pH, el rango óptimo para el proceso anaeróbico es cercano a la neutralidad, entre 6,5-7,2 (Appels et al., 2008; Kumar et al., 2013) o entre 6,8-7,4 (Mao et al., 2015). Los microorganismos acidogénicos y metanogénicos tienen diferentes rangos de pH óptimos. Las metanogénicas son más eficientes a pH entre 6,5 y 8,2 con un valor óptimo a pH 7. La tasa de crecimiento de las metanogénicas se reduce a valores de $\text{pH} < 6,6$. Sin embargo, las bacterias acidogénicas presentan un pH óptimo entre 5,5 y 6,5. Debido a estas diferencias, se prefiere operar la digestión anaeróbica en dos fases o etapas, donde la etapa de hidrólisis/acidogénesis está separada de la acetogénesis/metanogénesis y puede optimizarse el pH en cada caso (Divya et al., 2015; Mao et al., 2015).

Debido a que muchos fenómenos que ocurren en el proceso tienen influencia sobre el pH, esta variable es considerada como un parámetro de control en reactores anaeróbicos. Sin embargo, algunos investigadores consideran que es una variable de respuesta lenta, ya que una vez que fue detectada la variación importante del pH, el fracaso del sistema puede ser irreversible. Por ello otras variables de respuesta rápida son consideradas como variables de control, como ser, el rendimiento de metano, ácidos grasos volátiles y la relación entre éstos y la alcalinidad (Foster Carneiro, 2005).

Alcalinidad

La alcalinidad es una medida de la cantidad de sustancias alcalinas en el proceso anaeróbico. A mayor alcalinidad, mayor capacidad amortiguadora o *buffer* en el proceso, promoviendo un valor estable de pH (Schnurer and Jarvis, 2010). La alcalinidad primeramente está presente mediante la forma de bicarbonatos (HCO_3^-) que están en equilibrio con el dióxido de carbono (CO_2) en el proceso anaeróbico. El CO_2 en el medio acuoso está en equilibrio con el ácido carbónico (H_2CO_3), alcalinidad bicarbonatada (HCO_3^-) y alcalinidad carbonatada (CO_3^{2-}) (ecuación 1); La degradación de sustratos ricos en proteínas y aminoácidos puede contribuir a incrementar la alcalinidad, debido a la liberación de amoníaco en medio acuoso (base débil, ecuación 2) o bien puede reaccionar con el CO_2 disuelto para formar bicarbonato de amonio (NH_4HCO_3) (ecuación 3).



El equilibrio químico de estas reacciones es una función dependiente del pH. La alcalinidad en un proceso anaeróbico puede ser medida como la alcalinidad total (AT) y la alcalinidad bicarbonatada o alcalinidad parcial (AP). La AP es la fuente primaria de carbono para las bacterias formadoras de metano (Schnurer and Jarvis, 2010).

Tanto la alcalinidad como la formación de ácidos son variables muy importantes a controlar en reactores anaeróbicos. Si se supone que el sustrato de alimentación no tiene la alcalinidad suficiente, entonces, deberá ser agregada químicamente. Esta capacidad *buffer* de los compuestos alcalinos evita la acumulación de los ácidos orgánicos, la consecuente caída del pH y la interrupción del proceso anaeróbico.

Ácidos orgánicos volátiles

Los ácidos grasos volátiles (AGV) son los compuestos intermediarios más importantes del proceso y cumplen un rol muy importante en el monitoreo y control de reactores anaeróbicos (Kumar et al., 2013). La acumulación de los ácidos orgánicos refleja un desacople cinético entre los productores y consumidores de ácidos, reflejando una situación de estrés en el sistema. Esta situación puede ocurrir por una sobrecarga de alimentación o introducción de tóxicos al sistema (Al Seadi et al., 2008).

Una inestabilidad del proceso puede conducir a la acumulación de los AGV dentro del reactor, y consecuentemente a una caída del pH. Por otro lado, cuanto más larga sea la cadena de ácidos grasos, mayor toxicidad causa a las metanogénicas, siendo el ácido acético el de menor toxicidad. Las concentraciones a la cual resultan ser tóxicos dependerán de su longitud y su grado de saturación (Cornet and Euverink, 2017; Khanal, 2008).

No siempre la acumulación de los AGV puede ser acompañada de con una caída del pH, debido a la capacidad *buffer* del sistema, que dependerá del contenido de alcalinidad del sustrato. Los estiércoles, tienen un “plus” de alcalinidad, con lo cual puede haber una acumulación de ácidos antes de ser detectada la caída del pH (Al Seadi et al., 2008). La experiencia muestra que no hay un mismo valor de concentración de AGV que resulta ser tóxico para las bacterias anaeróbicas. Una posible explicación podría ser que la comunidad microbiana varía entre digestores que procesan distintos sustratos y/o distintas condiciones de operación. Por esta razón, no hay un valor recomendado de AGV para el proceso anaeróbico, y su monitoreo debe relacionarse con la alcalinidad del sistema (Al Seadi et al., 2008; Li et al., 2014). Según Schnurer and Jarvis (2010) pueden identificarse tres valores críticos a través de la medición de la relación AGV/AT:

< 0,3: proceso estable

0,3-0,5: proceso alterado

> 0,5 marcada inestabilidad, acidificación del sistema

Nutrientes y relación C/N

Los microorganismos anaeróbicos necesitan para su desarrollo y síntesis de biomasa nutrientes minerales, además de una fuente de carbono y energía. Así, para que ocurra la degradación anaeróbica, macro y micronutrientes deben estar presentes en el medio (Khanal, 2008). Para los ensayos realizados a escala laboratorio, como el potencial bioquímico metanogénico (PBM) y la actividad metanogénica específica (AME), comúnmente se requiere el agregado de vitaminas, macro y micronutrientes, de manera de asegurar las óptimas condiciones para el desarrollo y crecimiento del consorcio microbiano.

Los principales macronutrientes son el carbono, nitrógeno y fósforo, y la cantidad requerida de estos nutrientes en los procesos anaeróbicos dependerá de las especies de microorganismos existentes y la composición del sustrato que se degrade. Las experiencias prácticas sugieren que la relación C:N debería ser entre 15-45 y que la relación óptima de macronutrientes C:N:P:S es 300-600:15:5:1 (Al Seadi et al., 2008; Guebitz et al., 2015; Liangwei, 2018; Meegoda et al., 2018).

La relación carbono y nitrógeno (C/N) de un sustrato es comúnmente utilizada para la caracterización de los nutrientes. El estiércol de gallinas tiene una relativamente baja relación C/N debido al alto contenido de nitrógeno amoniacal. Es por ello, que este sustrato es preferentemente co-digerido con residuos ricos en carbono que balanceen esta relación (Wang et al., 2012).

El consumo de C y nitrógeno puede ser afectado por las condiciones operativas tales como la temperatura. Wang et al. (2014) mostró que hay una interacción entre la temperatura y la relación C/N sobre la performance de la digestión anaeróbica del guano co-digerido con estiércol de tambo y paja de arroz. Sus estudios demostraron que el máximo potencial de metano y la inhibición por amonio se redujo cuando la relación fue de C/N= 26,76 en condiciones mesofílicas (35°C) y de C/N= 30,67 en condiciones termofílicas (55°C).

Además de los macronutrientes, la conversión de acetato a metano por las metanogénicas requiere de la presencia de micronutrientes como cobalto, hierro, níquel y sulfuro. El selenio y el tungsteno son elementos trazas adicionales que son requeridos por los sistemas enzimáticos de las metanogénicas (Khanal, 2008). Asimismo, muchos microorganismos requieren pequeñas cantidades de otros micronutrientes como zinc, cobre, sodio, manganeso, magnesio, cloruro, entre otros. La falta de provisión de estos

micronutrientes y elementos trazas puede conducir a una alteración o inhibición del proceso anaeróbico (Al Seadi et al., 2008; Guebitz et al., 2015).

Mezclado

El mezclado es un parámetro importante que afecta la transferencia de masa en digestores anaeróbicos y a la formación, estructura y metabolismo de la población microbiana (Jiang et al., 2016). En efecto el mezclado es esencial para la homogenización en el influente y garantiza la eficiencia de contacto entre el sustrato y la biomasa microbiana. El tipo y la intensidad de la mezcla pueden afectar la performance del proceso y el rendimiento de biogás (Lindmark et al., 2014). Por otro lado, la ausencia o muy baja agitación puede conducir a la formación de costras y una mala distribución de la temperatura interna del digestor (Divya et al., 2015).

Por encima de la intensidad de mezclado óptimo, se pone en riesgo la supervivencia de los microorganismos anaeróbicos. Las *metanosaetas*, principal grupo de microorganismos de formación de los agregados, son las más sensibles al incremento de la intensidad del mezclado (Kundu et al., 2014). Debe existir un equilibrio entre la homogenización y la correcta formación de agregados bacterianos. Una velocidad alta, por encima de los 6 m/h, puede producir la ruptura de los agregados bacterianos y el lavado de las bacterias metanogénicas por ejemplo en un reactor tipo UASB (Tabatabaei and Ghanavati, 2018).

1.6.Toxicidad e Inhibidores del Proceso

Una extensa variedad de residuos orgánicos e inorgánicos pueden causar toxicidad en el proceso anaeróbico. Estos compuestos tóxicos pueden ser introducidos en el proceso desde la alimentación, tales como grasas, aceites, fenoles, paracetamol, cafeína, triclosan, metales pesados y compuestos aromáticos volátiles o bien pueden ser generados durante el proceso tales como amoníaco, ácidos grasos volátiles (VFA) y sulfuro de hidrógeno (Chen et al., 2014; Tabatabaei and Ghanavati, 2018).

La determinación de los valores límites para estos compuestos inhibidores del proceso resulta compleja, debido a que depende de varios factores como ser las condiciones operativas y ambientales del digestor y de la comunidad microbiana presente. Estos compuestos tóxicos pueden reaccionar con otros compuestos presentes en el proceso anaeróbico, modificándose su toxicidad o bien la concentración límite tóxica. Por otro

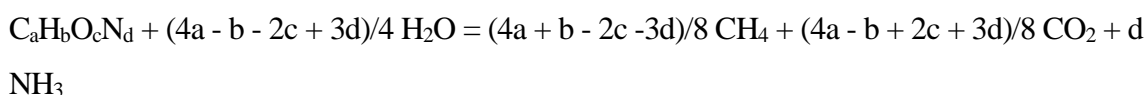
lado, los microorganismos tienen capacidad de adaptarse, dentro de algunos límites, a las nuevas condiciones ambientales generadas por la presencia del compuesto tóxico (Liangwei, 2018).

Los indicadores de toxicidad en un digestor anaeróbico pueden aparecer rápidamente o lentamente dependiendo del tipo de toxicidad y de la concentración del tóxico. Alguno de los indicadores de toxicidad son: desaparición del metano, incremento de la concentración de los AGV, decrecimiento de la alcalinidad y del pH o alteraciones en la comunidad microbiana (Amha et al., 2018).

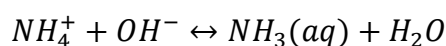
En particular se detallará la toxicidad por amoníaco, debido a que es uno de los inhibidores presentes en el guano de aves ponedoras.

1.6.1. Toxicidad por amoníaco

El nitrógeno amoniacal es producido a través de la degradación de la materia orgánica, principalmente de proteínas y aminoácidos. Si bien este compuesto resulta esencial para el crecimiento de los microorganismos, a altas concentraciones es un inhibidor de la actividad metanogénica (Liangwei, 2018). La cantidad de amonio producida durante la degradación de un sustrato orgánico puede ser cuantificada mediante la siguiente expresión estequiométrica (Akindele, 2016):



En condiciones acuosas, como ocurre en un reactor anaeróbico, el amoníaco o nitrógeno amoniacal total (NAT) existe de dos formas: como ion amonio (NH_4^+) y como amoníaco libre acuoso ($(NH_3)_{aq}$):



La fracción de amoníaco libre es dependiente del pH y de la temperatura, y es esta especie no ionizada, la que produce toxicidad (Dai et al., 2016; Rajagopal et al., 2013; Yenigün and Demirel, 2013). Con el incremento del pH, las cantidades de nitrógeno amoniacal libre (NAL) se incrementan. Con el decrecimiento del pH las cantidades del ion amonio se incrementan. En cuanto a la temperatura, también un incremento de la temperatura aumenta las concentraciones del NAL. Se ha demostrado que la producción del metano

en residuos con alta concentración de amoníaco es más fácilmente inhibida a temperaturas termofílicas que mesofílicas, debido a la toxicidad causada por el NAL (Yenigün and Demirel, 2013).

El límite de concentración de amoníaco tolerable para las bacterias varía extensamente, ya que depende de varios factores involucrados en el proceso. Sin embargo, se ha aceptado que las concentraciones de NAT y NAL superiores a 3-5 g/L y 0,15-0,7 g/L respectivamente pueden inhibir el proceso de la digestión anaeróbica y reducir el rendimiento de metano (Dai et al., 2016; Guebitz et al., 2015; Yenigün and Demirel, 2013).

1.6.2. Mecanismos de toxicidad por el NAL

El amoníaco acuoso es más tóxico para las bacterias metanogénicas que el ion amonio, debido a que es capaz de atravesar la membrana celular, causando un desbalance protónico y/o una deficiencia en potasio. Cuando el amoníaco libre difunde pasivamente dentro de la célula metanogénica, la diferencia del pH intracelular favorece la formación del ion amonio, absorbiendo protones en el proceso. La célula luego debe consumir energía en el balance protónico, usando la bomba de potasio para mantener el pH intracelular. Así la célula incrementa su consumo energético para el mantenimiento, causando potencialmente una inhibición en las reacciones enzimáticas específicas (Chen et al., 2014; Kayhanian, 1999; Zhang et al., 2014). En la Figura 4 se muestra un esquema del mecanismo de inhibición del proceso anaeróbico por amoníaco, propuesto por Kayhanian (1999).

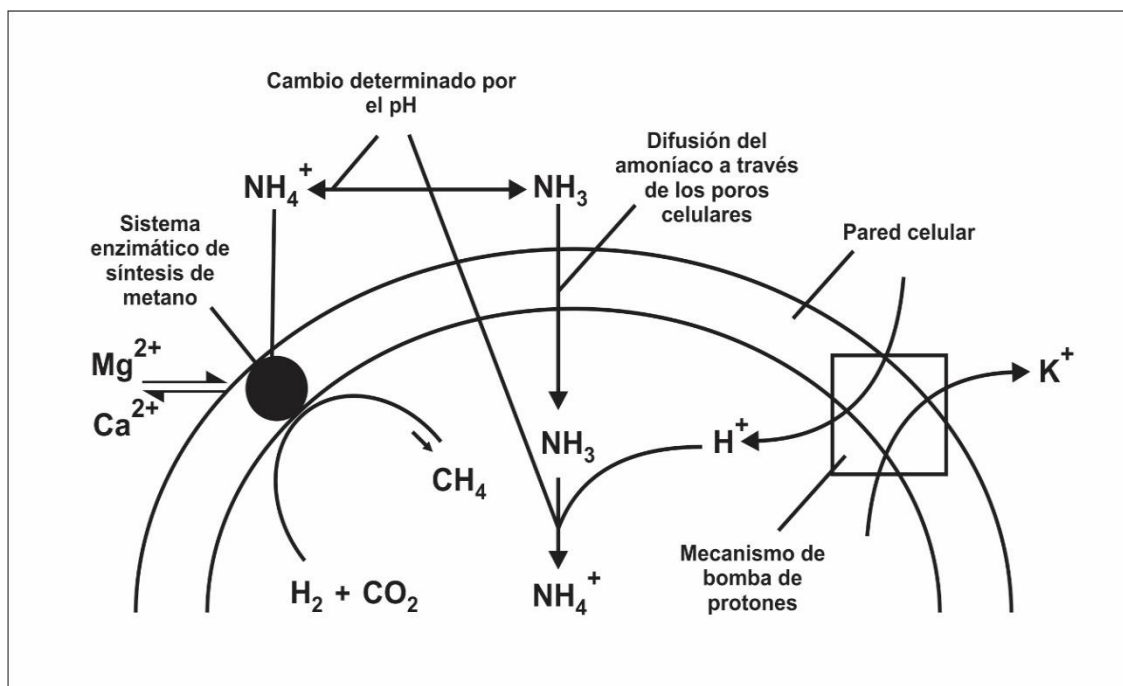
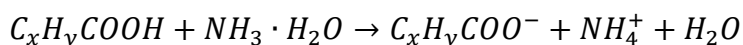
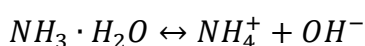
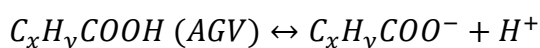


Figura 4. Mecanismo de inhibición por amoníaco en bacteria metanogénica propuesto por Kayhanian (1999).

Muchos estudios han reportado que el amoníaco podría incrementar la capacidad *buffer* del sistema, debido a que los AGV formados durante el proceso de digestión anaeróbica, son neutralizados por el amoníaco (Chen et al., 2014; Wang et al., 2013, 2012; Zhang et al., 2013). Las reacciones bioquímicas entre el amoníaco y los AGV son las siguientes:



El amoníaco puede reaccionar con los AGV (C_xH_yCOOH), evitando su acumulación y consecuentemente su efecto de inhibición, además de equilibrar la concentración de AGV para la producción de metano (Zhang et al., 2014).

1.6.3. Estrategias para controlar la inhibición por nitrógeno amoniacal

Se han propuesto varias soluciones para resolver el problema del amoníaco en los últimos años. Dilución del contenido del reactor con agua, *stripping* por aire, uso de nanopartículas o materiales absorbentes, reducción de la temperatura de operación, co-digestión con residuos con alto contenido de carbono y bioaumentación con bacterias

oxidantes del acetato sintróficas o metanogénicas son algunas de los métodos desarrollados para contrarrestar el efecto de inhibición por amoníaco (Tabatabaei and Ghanavati, 2018; Tian et al., 2018; Yuan and Zhu, 2016). Sin embargo, muchos de estos métodos o estrategias propuestas resultan complejos y de difícil implementación y aplicabilidad. A continuación, se describen algunas de las estrategias más importantes y aquellas que fueron consideradas en esta tesis.

Aclimatación del consorcio microbiano

La aclimatación del consorcio microbiano es la adaptación de los microorganismos a altas concentraciones de amoníaco, produciendo mayor tolerancia al tóxico. Esta estrategia podría ser un método práctico de implementar y con una relación costo-beneficio favorable (Tian et al., 2018). Se ha reportado la adaptación de las bacterias a distintas concentraciones de NAL a escala laboratorio y con alimentación en *batch* (Calli et al., 2005; Tian et al., 2017). Sin embargo existen pocos estudios realizados sobre la adaptación de las metanogénicas a altas concentraciones de amoníaco en reactores continuos (Rajagopal et al., 2013; Tian et al., 2018).

Si bien queda claro que la aclimatación de las bacterias es una estrategia para contrarrestar el efecto de la inhibición por amoníaco, existen controversias sobre el mecanismo de acción. Algunos estudios han demostrado que el proceso de aclimatación a altos niveles de amoníaco causó un cambio en el consorcio microbiano, desde las metanogénicas acetoclásticas a las hidrogenotróficas (Dai et al., 2016; Gao et al., 2015; Werner et al., 2014). Por otro lado, la *metanosarcinaceae* spp. asociada a la vía de las acetoclásticas, ha sido encontrada como predominante a altos niveles de amoníaco (Calli et al., 2005; Y. Li et al., 2017). Se requiere un tiempo apropiado para generar un cultivo aclimatado y el tiempo de adaptación puede incrementarse cuanto más alta sea la concentración de amoníaco. Una adecuada aclimatación de microorganismos puede tomar dos meses o más (Rajagopal et al., 2013).

Control del pH y temperatura

La digestión anaeróbica de residuos ricos en proteínas como los estiércoles de cerdo y aves, puede conducir a valores de pH cercanos a 8, superiores al rango óptimo de desarrollo de las bacterias anaeróbicas, y consecuentemente generando inestabilidad en el proceso. Altos valores de pH causan rápida conversión del amoníaco ionizado a nitrógeno amoniacal libre (NAL). El incremento del NAL puede inhibir a las metanogénicas y como resultado ocurre una acumulación de los AGV, generando un decrecimiento del pH y consecuentemente una caída de la concentración del NAL. La

interacción entre el NAL, AGV y pH puede conducir a un “estado estacionario inhibido”, donde el proceso anaeróbico ocurre en condiciones estables pero con un menor rendimiento de metano (Rajagopal et al., 2013). En efecto, manejar apropiadamente el pH durante el proceso anaeróbico puede reducir la toxicidad por el nitrógeno, recomendándose mantener esta variable en valores cercanos a 6,5-7 (Ho and Ho, 2012; Strik et al., 2006).

La temperatura afecta la tasa de crecimiento microbiano y la concentración del nitrógeno amoniacal libre. Un incremento en la temperatura de un proceso anaeróbico comúnmente incrementa la tasa metabólica de los microorganismos pero además resulta en una mayor concentración del NAL (Chen et al., 2008). Como se explicó anteriormente, varios trabajos han demostrado que las condiciones termofílicas en reactores anaeróbicos con altas concentraciones de nitrógeno son menos estables que los mesofílicos. Asimismo, Masse et al. (2003), describió que los sistemas anaeróbicos psicrófilicos, particularmente alimentados con estiércoles, son mejor adaptados y más estables que los mesofílicos y los termofílicos, debido a que trabajan con menores concentraciones de NAL.

Dilución del contenido de sustrato en el interior del reactor

Comúnmente los residuos sólidos orgánicos como los estiércoles con alta concentración de nitrógeno amoniacal son diluidos hasta el 0.5-3% de sólidos totales (ST). Sin embargo este método resulta poco atractivo ya que se incrementan los costos asociados al consumo de agua y a los mayores volúmenes de residuos que deben ser tratados (Rajagopal et al., 2013 Yuan et al., 2016). La dilución del sustrato con agua es un método efectivo para bajar la carga de nitrógeno. Hejnfelt and Angelidaki (2009) demostraron que efluentes de un matadero de cerdo diluidos al 5% de ST, generaron la mayor producción de metano frente a otras diluciones más concentradas (20% y 50%). Nielsen y Angelidaki (2008), evaluaron tres tipos de matrices (agua, producto digerido y estiércol fresco al 50%) para la dilución de la biomasa de un reactor anaeróbico termofílico alimentado con estiércol vacuno, a efectos de revertir la inhibición por amonio. Los resultados mostraron que se logró la estabilidad del digestor anaeróbico utilizando la dilución como estrategia, siendo la recuperación del proceso más estable cuando la biomasa fue diluida con el producto digerido. Wu et al. (2016) realizó un estudio que utilizó el digerido de una planta de digestión anaeróbica de estiércol de gallina como agua de dilución de este sustrato. Sus resultados fueron diferentes a los de Nielsen y Angelidaki (2008), ya que se observó una acumulación de las concentraciones de amoníaco, de AGV y reducción del rendimiento de biogás. Sin embargo, se logró la estabilización del sistema y del rendimiento de metano

cuando se aplicó *stripping* por aire al digerido antes de ser utilizado como agua de dilución.

Proceso de co-digestión y ajuste de la relación C/N en la alimentación

El término co-digestión aplica al proceso anaeróbico de dos o más sustratos orgánicos de diferentes orígenes. Si la mezcla se realiza en las proporciones adecuadas, el proceso anaeróbico se ve favorecido obteniéndose un mayor rendimiento de metano y biogás.

En la co-digestión los residuos ricos en proteínas pueden proveer una capacidad *buffer* y un extenso rango de nutrientes, mientras que los residuos ricos en contenido de carbono pueden balancear la relación C/N para aquellos sustratos con baja relación C/N, decreciendo así los riesgos asociados a la inhibición por amonio en el proceso anaeróbico (Rajagopal et al., 2013; Yenigün and Demirel, 2013). Esta mejora en la relación C/N en la alimentación, causa un efecto sinérgico (Esposito et al., 2012). Esta estrategia es ampliamente aplicada para controlar el efecto de inhibición por amonio, debido a su relación costo-beneficio positiva y a su fácil implementación. La co-digestión de estiércoles animales con residuos con alto contenido de carbono, mejora la relación C/N y al mismo tiempo incrementa la producción de biogás, esencial para la economía de plantas de tratamiento (Rajagopal et al., 2013). El monitoreo de los niveles de amoníaco en el reactor y el ajuste de la relación C/N deberían ser parte de técnicas operativas diarias en digestores de alta carga.

Agregado de elementos trazas

Ciertos metales como el selenio (Se), Tungsteno (W), Cobalto (Co) y Molibdeno (Mo) han sido reportados como micronutrientes esenciales que requieren las bacterias metanogénicas. En particular, el agregado de estos elementos trazas produce mayor estabilidad en el proceso anaeróbico a altas concentraciones de nitrógeno amoniacal (Rajagopal et al., 2013). Un estudio reciente realizado por Molaey et al. (2018) en reactores semicontínuos alimentados con guano de aves ponedoras, mostró que el suministro de Se es capaz de estimular la producción de metano por la vía de oxidación sintrófica del acetato. Sin el agregado de este elemento traza hubo acumulación de ácido propiónico y acético que causaron una reducción del rendimiento de metano.

Objetivos

Objetivo General

Implementar herramientas metodológicas y estrategias que permitan optimizar el proceso anaeróbico del guano de aves ponedoras, y que impulsen la aplicación de esta tecnología a escala real.

Objetivos específicos

1- Conocer las características intrínsecas del guano de aves ponedoras, identificando sus potencialidades y limitantes para ser utilizado como recurso, y comparando sus características fisicoquímicas y microbiológicas entre los dos principales sistemas de manejos de producción avícola del país.

2- Diseñar equipamiento, ajustar y adaptar la metodología del ensayo de Actividad Metanogénica Específica (AME) para su implementación como una herramienta de diagnóstico del proceso anaeróbico, evaluando la actividad de las bacterias metanogénicas en inóculos de diferentes orígenes.

3-Determinar el potencial energético del guano de aves ponedoras, mediante la implementación del ensayo de Potencial Bioquímico Metanogénico (PBM), evaluando la relación entre el sustrato y el inóculo y su aclimatación al sustrato como estrategias para la optimización del proceso.

4-Evaluar la co-digestión del guano de aves ponedoras utilizando residuos de frutas y verduras y estiércol vacuno como co-sustratos, a fin de mejorar el rendimiento de biogás y metano y reducir la presencia de potenciales inhibidores del proceso anaeróbico.

5- Analizar el proceso anaeróbico del guano de aves ponedoras mono-digerido y co-digerido bajo régimen de alimentación semi-continua, determinando la *performance* y la calidad de los dos productos generados (biogás y digerido).

2. Métodos Analíticos

En este capítulo, se detallan las técnicas analíticas empleadas, fisicoquímicas y microbiológicas, para la caracterización de los sustratos y para el análisis de los experimentos llevados a cabo en esta tesis doctoral.

2.1 pH

El pH en una suspensión acuosa indica la actividad del ion hidrógeno e influye en la disponibilidad de nutrientes esenciales y secundarios, metales pesados, abundancia y actividad microbiológica. La intensidad del carácter ácido o básico de una suspensión acuosa puede medirse por la actividad del ión hidrógeno (H^+), la cual en suspensiones diluidas puede presumirse equivalente a la concentración molar. La actividad del H^+ puede expresarse bajo la forma $pH = -\log [H^+]$.

Para muestras sólidas (sustratos como el guano, residuos frutihortícolas y estiércol vacuno), se adaptó el método (4.11-método electrométrico) descrito por el *Test Methods for the Examination of Composting and Compost* (USDA and USCC, 2001), donde se realiza un extracto de la muestra. El procedimiento fue el siguiente:

1. Pesar el equivalente a 40 g de masa seca y colocarla en el recipiente
2. Agregar al recipiente un volumen de agua destilada necesario para generar una relación muestra: solución de 1:5, o 1:10 (masa: masa) para el caso del guano
3. Tapar y colocar en agitador por 20 minutos a 180 RPM
4. Calibrar el peachímetro
5. Agitar y colocar inmediatamente el electrodo de pH en la suspensión de la muestra
6. Leer una vez que se estabilice la lectura
7. Una vez finalizada la medición, enjuagar el electrodo con abundante agua
8. Conservar la suspensión para determinar la conductividad eléctrica de la muestra

La masa de la muestra húmeda equivalente a 40 g de muestra seca se calculó según:

$$A = 40 \times 100 \div MS$$

Dónde

A= masa de muestra húmeda (g)

MS= materia seca (%)

El volumen de agua destilada necesaria para generar una relación 1:5 (muestra: solución) se calculó según:

$$B = 200 - (A - 40)$$

Dónde

B= volumen de agua (mL)

En el caso de sustratos que presentan elevado contenido de agua, como el guano, se preparó una suspensión 1:10 para asegurar que toda la masa se encuentre totalmente sumergida en el líquido al momento de la agitación. Para lograr una dilución 1:10 se colocan 400 mL de agua en vez de 200 mL.

Los resultados son adimensionales y se expresan como unidades de pH (upH) en relación 1:5 o 1:10 según corresponda, con un solo decimal.

Para muestras líquidas, se siguió el método electrométrico 4500 A descrito en *Métodos Normalizados para el Análisis de Aguas Potables y Residuales* (APHA, 1992).

2.2 Conductividad Eléctrica

La conductividad eléctrica (CE) es una medida del contenido de sales en solución y es una expresión numérica de la capacidad de una solución para transportar una corriente eléctrica. Esta capacidad depende de la cantidad iones y de la temperatura de medición. Para muestras sólidas, se adaptó el método 4.10 descrito por el *Test Methods for the Examination of Composting and Compost* (USDA and USCC, 2001). Se utiliza el mismo extracto de la muestra realizado para medir pH, pero se filtra la suspensión. Luego, se coloca la celda de conductividad en el extracto de la muestra y se lee una vez que se estabilice la lectura. Corroborar que la celda quede completamente sumergida en la suspensión.

Los resultados son expresados en mS/cm, detallando la temperatura de medición y la relación muestra: solución utilizada.

Para muestras líquidas, se siguió el método 2510 B, descrito en *Métodos Normalizados para el Análisis de Aguas Potables y Residuales* (APHA, 1992).

2.2 Humedad, Materia Seca y Sólidos Totales

La humedad es el contenido de agua en la muestra y la materia seca es el material remanente luego de un período de secado. Una alícuota de la muestra húmeda se seca hasta masa constante. La diferencia de masas corresponde al contenido de agua en la muestra. Para muestras sólidas, se siguió el método 03.09 descrito por el *Test Methods*

for the Examination of Composting and Compost (USDA and USCC, 2001). El procedimiento fue el siguiente:

1. Pesar y registrar el peso de la cápsula
2. Pesar 20 g aproximadamente de muestra húmeda en la cápsula. Registrar el peso
3. Colocar en estufa a $70 \pm 5^\circ\text{C}$ hasta masa constante. El secado fue de 48 horas aproximadamente, dependiendo del contenido de humedad y tipo de muestra para lograr masa constante
4. Colocar en un desecador y dejar enfriar a temperatura ambiente
5. Pesar y registrar la masa
6. Conservar las cápsulas en un desecador para luego determinar la materia orgánica

El contenido de humedad (H) y la materia seca (MS) en % en base húmeda (bh) se calculó según:

$$H(\%_{bh}) = \frac{(A - B) \times 100}{A - C}$$

$$MS(\%_{bh}) = 100 - H$$

Dónde

A= masa de la cápsula + la muestra húmeda (g)

B= masa de la cápsula + la muestra seca a 70°C (g)

C= masa de la cápsula (g)

En muestras líquidas, se utiliza el término sólidos totales (ST) para representar el contenido de los residuos del material que quedan en un recipiente luego de la evaporación y secado, eliminándose la humedad de la muestra. Los ST incluyen los sólidos suspendidos totales, o porción de sólidos totales retenida por un filtro, y los sólidos disueltos totales o porción que atraviesa el filtro.

Los ST fueron determinados siguiendo el método 2540 B descrito en *Métodos Normalizados para el Análisis de Aguas Potables y Residuales* (APHA, 1992), según el siguiente procedimiento:

1. Secar las cápsulas de porcelana en estufa a $100 \pm 5^\circ\text{C}$ por 2 horas y colocar en desecador. Registrar la masa
2. Homogeneizar la muestra con agitador magnético
3. Agregar 25 mL de efluente en la cápsula de porcelana
4. Colocar en estufa a $100 \pm 5^\circ\text{C}$ hasta masa constante. El secado fue de 48 horas aproximadamente, dependiendo del contenido de humedad y tipo de muestra para lograr masa constante

5. Colocar en desecador y dejar enfriar a temperatura ambiente
6. Pesar la cápsula con la muestra seca

El contenido de ST se calculó según:

$$ST (\%_{m/v}) = \frac{(A - B) \times 100}{V}$$

Dónde

A= masa de la cápsula + muestra seca a 100 ± 5 °C (g)

B= masa de la cápsula (g)

V= volumen de muestra (mL)

Otra forma de expresar los ST es en g/L, siguiendo el siguiente cálculo:

$$ST (g/L) = \frac{(A - B) \times 1000}{V}$$

Dónde

A= masa de la cápsula + muestra seca a 100 ± 5 °C (g)

B= masa de la cápsula (g)

V= volumen de muestra (mL)

2.3 Materia Orgánica y Sólidos Volátiles

La materia orgánica es el componente predominante en residuos orgánicos. A partir de este valor se puede estimar el contenido del carbono orgánico. La muestra seca se calcina a 550 ± 50 °C. La ceniza es la porción mineral de la muestra. Para muestras sólidas, se realizó el método descrito 05.01 por el *Test Methods for the Examination of Composting and Compost* (USDA and USCC, 2001), según el siguiente procedimiento:

1. Colocar la cápsula que contiene la muestra seca en la mufla
2. Calcinar la muestra a 550 ± 50 °C hasta masa constante. La calcinación fue de 2 horas para lograr masa constante
3. Apagar la mufla y dejar enfriar hasta que la temperatura permita transferir la cápsula a un desecador. Mantener la muestra en el desecador hasta que alcance la temperatura ambiente
4. Pesar y registrar la masa de la cápsula + muestra calcinada

El contenido de materia orgánica (MO) en base seca (bs), se calculó según:

$$MO (\%_{bs}) = \frac{(A - B) \times 100}{(A - C)}$$

Dónde:

A= masa de la cápsula + muestra seca (g)

B= masa de la cápsula + muestra calcinada (g)

C= masa de la cápsula (g)

A partir de la MO, puede determinarse, de una forma indirecta, el contenido de carbono orgánico total (COT) en la muestra, utilizando un factor de conversión:

$$COT (\%_{bs}) = MO_{bs} \div 1,8$$

Dónde, 1,8 es el factor de conversión que asume que el 56% de la materia orgánica de un residuo orgánico está compuesta por carbono (Sadzawka et al, 2005).

En muestras líquidas, se utiliza el término sólidos volátiles (SV) para representar el contenido de materia orgánica. La pérdida de peso por ignición representa los SV. Se realizó el método 2540 E descrito en *Métodos Normalizados para el Análisis de Aguas Potables y Residuales* (APHA, 1992), según el siguiente procedimiento:

1. Colocar la cápsula que contiene la muestra seca a 100°C en la mufla
2. Calcinar la muestra a 550 ± 50 °C hasta masa constante. La calcinación fue de 2 horas para lograr masa constante
3. Apagar la mufla y dejar enfriar hasta que la temperatura permita transferir la cápsula a un desecador. Mantener la muestra en el desecador hasta que alcance la temperatura ambiente
4. Registrar la masa de la cápsula + muestra calcinada

Para calcular el contenido de los SV en base seca (bs) se utilizó la misma fórmula que para MO (%_{bs}).

Otra forma de expresar los SV es en g/L, según:

$$SV (g/L) = \frac{(A - B) \times 1000}{V}$$

Dónde:

A= masa de la cápsula + muestra seca a 100°C (g)

B= masa de la cápsula + muestra incinerada a 550°C (g)

V= volumen de la muestra inicial (mL)

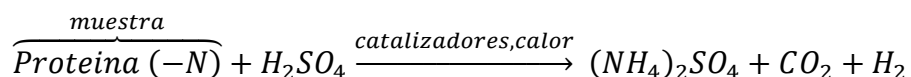
2.4 Nitrógeno Total Kjeldahl

El nitrógeno total Kjeldahl (NTK) es la suma del nitrógeno orgánico más el nitrógeno de amonio ($N-NH_4^+$). Este valor es muy cercano al nitrógeno total, ya que los contenidos de nitratos ($N-NO_3$) son bajos respecto al contenido de nitrógeno orgánico, y en algunos casos despreciables. Desde 1883 en que John Kjeldahl presentó sus trabajos, su método ha ganado una gran aceptación y actualmente es el método más usado para el análisis de proteínas y nitrógeno orgánico.

El procedimiento consiste en digerir las proteínas y otros compuestos orgánicos de la muestra en una mezcla con ácido sulfúrico en presencia de catalizadores. El nitrógeno orgánico total se convierte en sulfato de amonio mediante la digestión. La mezcla resultante se neutraliza con una base y se destila. El destilado se recoge en una solución de ácido bórico. Los aniones de borato así formados, se titulan con HCl valorado para determinar el nitrógeno contenido en la muestra.

El método consta de tres etapas:

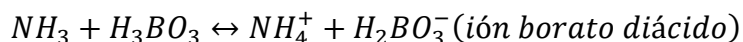
Digestión: se produce la descomposición del nitrógeno que contiene la muestra utilizando una solución de ácido concentrado. Esto se logra hirviendo la muestra con ácido sulfúrico concentrado. El resultado es una solución de sulfato de amonio:



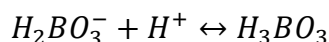
Destilación: en esta etapa se libera amoníaco, el cual es retenido en una solución con una cantidad conocida de ácido bórico. Inicialmente se realiza una destilación con vapor por el método de arrastre de vapor de agua:



El amoníaco formado, es capturado por una solución de ácido bórico, formándose el ion borato diácido:



Titulación: el destilado es titulado con una solución de HCl valorada, para determinar la cantidad de amonio presente en la muestra:



Se utilizó el equipo SELECTA, para la determinación del NTK. Este equipo consta de:

- un bloque metálico calefactor para la digestión (block digest), con una unidad de control para la programación del tiempo y rampa de temperatura (modelo RAT 2), con capacidad para 20 tubos de digestión de 42 mm de diámetro
- un sistema de extracción y neutralización de gases, formado por una unidad “*Scrubber*” que bloquea el paso y neutraliza las condensaciones ácidas, con bomba de recirculación de agua que proporciona caudal de vacío para la aspiración de los gases
- Un destilador por arrastre de vapor semiautomático (PRO-NITRO S)



Figura 1. Equipo Kjeldahl. a) Digestor, *scrubber* y bomba de recirculación; b) Destilador

Se realizó el siguiente procedimiento:

1. **Muestras sólidas:** pesar aproximadamente 1 g de muestra húmeda. Registrar su peso y colocarla en el tubo; **muestras líquidas y semilíquidas (lodos):** tomar un volumen de 5-10 mL. Registrar el volumen. Si la muestra no es pipeteable, puede utilizarse una probeta. En este caso, asegurarse que toda la muestra sea trasvasada al tubo. Puede enjuagarse la probeta con agua trasvasándola en el tubo
2. Pesar 0,2 g de reactivo patrón acetanilida, registrar su peso exacto y colocarlo en otro tubo
3. Disponer otro tubo vacío para el blanco, con 10 mL de agua si se utilizó agua para el enjuague de la probeta
4. Agregar 7 g de sulfato de potasio ($K_2SO_4 \cdot 5H_2O$) y 0,8 g de sulfato de cobre ($CuSO_4$) en cada tubo
5. Agregar 12 mL de H_2SO_4 concentrado en cada tubo
6. Colocar los tubos en el bloque de digestión y digerir a $400^\circ C$ hasta observar que la muestra digerida esté de color verde claro. La digestión programada fue de $200^\circ C$ durante 30 min, $300^\circ C$ durante 30 min y $400^\circ C$ durante 45 min. Dejar enfriar

7. Colocar un erlenmeyer en la alargadera del refrigerante y el tubo con la muestra en el destilador
8. Dosificar 50 ml de ácido bórico (H_3BO_3) al 4%, teniendo precaución de que la alargadera del refrigerante quede sumergida dentro del ácido bórico
9. Dosificar 50 ml de NaOH al 40%
10. Destilar la muestra durante 5 minutos
11. El destilado es recolectado en erlenmeyer
12. Titular con solución HCl valorada, hasta pH 4,65. Se utilizó titulador automático TritoLine 5000

El contenido de nitrógeno total Kjeldahl (NTK) de la muestra sólida se calculó según:

$$NTK (mg/Kg) = \frac{(A - B) \times C \times 14000}{m}$$

Dónde:

A= volumen titulado de la muestra (mL)

B= volumen titulado del blanco (mL)

C= Normalidad de la solución estándar de HCl

m= masa de la muestra húmeda (g)

En muestras líquidas el contenido de NTK se calculó según:

$$NTK (mg/L) = \frac{(A - B) \times C \times 14000}{V}$$

Dónde:

A= volumen titulado de la muestra (mL)

B= volumen titulado del blanco (mL)

C= Normalidad de la solución estándar de HCl

V= volumen de muestra (mL)

2.5 Nitrógeno Amoniacal Total

En una alícuota de un extracto con solución de cloruro de potasio (KCl) de una muestra sólida, se realiza una destilación para obtener nitrógeno amoniacal total (NAT). El procedimiento es el mismo que para la determinación de NTK, pero no se realiza la digestión de la muestra. Para muestras sólidas se realizó el siguiente procedimiento:

1. Pesar 25 g de muestra y colocarlos en un recipiente. Registrar la masa
2. Agregar 75 g de KCl (relación 1:3). Registrar el peso
3. Tapar el recipiente y llevar a agitación a 180 RPM por 20 minutos
4. Centrifugar el extracto a 8000 g durante 15 minutos
5. Tomar 5 ml del sobrenadante y colocarlo en el tubo de destilación
6. Realizar la destilación de la misma forma que se realiza para la determinación del NTK
7. Realizar un blanco con 5 mL de la solución extractante KCl
8. Titular el destilado con la solución HCl valorada

El nitrógeno amoniacal (N-NH₃) en muestra sólida se calculó según:

$$N - NH_3 (mg/Kg) = \frac{(A - B) \times C \times 14000 \times (V_t/V_a)}{m}$$

$$V_t = V_{KCl} + (m - MS)$$

Dónde:

A= volumen titulado en la muestra (mL)

B= volumen titulado del blanco (mL)

C= concentración de la solución estándar de HCl (eq/L)

m= masa de la muestra húmeda (g)

MS= masa seca de la muestra (g)

V_t= volumen total del extracto (mL). En este paso se asume que 1 g de muestra es equivalente a 1 mL de muestra. El término “m – MS”, representa el contenido de humedad de la muestra

V_{KCl}= volumen de la solución extractante KCl (mL)

V_a= volumen del extracto a destilar (mL)

Para muestras líquidas, se tomó una alícuota de la muestra, se centrifugó y con el sobrenadante se realizó el mismo procedimiento descrito que para el extracto de muestras sólidas.

El nitrógeno amoniacal (N-NH₃) en muestra líquida y semilíquida se calculó según:

$$N - NH_3 (mg/L) = \frac{(A - B) \times C \times 14000}{V}$$

Dónde:

A= volumen titulado en la muestra (mL)

B= volumen titulado del blanco (mL)

C= concentración de la solución estándar de HCl (eq/L)

V= volumen de la muestra a destilar (mL)

2.6 Nitrógeno Amoniacal Libre

En soluciones acuosas el amoníaco existe principalmente en dos formas, como ion amonio (NH_4^+) y como amoníaco libre acuoso ($(\text{NH}_3)_{\text{ac}}$). La fracción amoniacal libre (NAL) es dependiente del pH y de la temperatura.

Según Hansen et al. (1998), el NAL puede calcularse mediante la siguiente fórmula:

$$NAL = NAT \times \left(1 + \frac{10^{-pH}}{10^{-\left(0.09018 + \frac{2729,92}{T(K)}\right)}} \right)^{-1}$$

Dónde:

NAL= nitrógeno amoniacal libre (mg/L)

NAT= nitrógeno amoniacal total (mg/L)

T(K)= temperatura en Kelvin

2.7 Fósforo Total

La determinación del fósforo total (PT) consta de dos etapas: la mineralización de la muestra por digestión por microondas y su cuantificación mediante colorimetría por el método del ácido ascórbico. Para la digestión de la muestra se utilizó el equipo digestor por microondas CEM, modelo MARS 5. Una alícuota de la muestra se digiere en ácido concentrado mediante calentamiento por microondas, para transformar el compuesto fosforado orgánico a ortofosfato soluble.

Para muestras sólidas, se adaptó el método descrito por (Peters et al., 2003) y por el método 04.03 descrito en *Test Methods for the Examination of Composting and Compost* (USDA and USCC, 2001). Una alícuota de la muestra se digiere en ácido nítrico concentrado mediante calentamiento por microondas, para transformar el compuesto fosforado orgánico a ortofosfato soluble. El procedimiento fue el siguiente:

1. Pesar 0,1 g de muestra seca y molida. Registrar el peso

2. Colocar la muestra en el tubo de digestión de microondas (modelo HP500 Plus)
3. Agregar cuidadosamente 10 mL de ácido nítrico (HNO₃). Dejar destapado hasta que la reacción vigorosa haya finalizado
4. Llevar a un volumen de 50 mL. Cerrar y conectar el tubo al equipo microondas
5. Digerir la muestra con una rampa de temperatura de 165°C durante de 2 minutos y de 175°C durante 3 minutos.
6. Trasvasar a un matraz de 25 mL a través de un embudo con papel de filtro
7. Enrasar con agua destilada

Esta muestra digerida ya está lista para la cuantificación del PT por el método colorimétrico del ácido ascórbico.

Para muestras líquidas, se utiliza el equipo digestor de microondas pero en este caso, se adiciona a la muestra persulfato de potasio y se digiere con ácido sulfúrico concentrado, adaptándose el método 4500 B descrito en *Métodos Normalizados para el Análisis de Aguas Potables y Residuales* (APHA, 1992). El procedimiento fue el siguiente:

1. Colocar 50 mL de la muestra o una dilución de la misma en los vasos de digestión.
La muestra no debe contener valores superiores a 0,5 g de materia orgánica para evitar sobrepresión en los vasos
2. Añadir 1 ml de H₂SO₄ (cc) y 0,5 g de persulfato de potasio (K₂S₂O₈)
3. Cerrar y conectar el tubo al equipo de microondas
4. Digerir la muestra a una temperatura de 170 ± 5 °C durante 30 min
5. Una vez digerida la muestra, filtrar y conservar en frascos de vidrio

La cuantificación fue determinada por el método 4500 E, método colorimétrico del ácido ascórbico descrito en *Métodos Normalizados para el Análisis de Aguas Potables y Residuales* (APHA, 1992). El molibdato de amonio y el tartrato de antimonio potásico reaccionan en medio ácido con el ortofosfato para formar un heteropoliácido fosfomolibdico que se reduce a azul de molibdeno de color intenso por el ácido ascórbico.

El procedimiento fue el siguiente:

1. Realizar una curva de calibración utilizando una solución patrón de 2,5 mg de P/L (sal fosfato diácido de potasio anhidro, KH₂PO₄)
2. Pipetear 1 a 5 mL de la muestra digerida dependiendo de la concentración estimada de fósforo y colocar en un matraz 50 mL. Este volumen representa la alícuota de la muestra digerida utilizada para el método en los cálculos (letra d)
3. Agregar agua hasta un volumen de 40 mL

4. Agregar 8 mL de reactivo combinado a todos los matraces. El reactivo combinado contiene 50 mL de solución de sulfúrico 5N, 5 mL de solución de tartrato de antimonio-potasio, 15 mL de solución de molibdato amónico y 30 mL de solución de ácido ascórbico
5. Enrasar con agua destilada
6. Luego de 30 minutos leer en espectrofotómetro a 880 nm. Se utilizó un espectrofotómetro visible Marca La Motte, modelo Smart Spectro

El PT en muestras sólidas se calculó en mg/kg en base seca (bs) según:

$$P (mg/Kg_{bs}) = \frac{\frac{(A - b)}{a} \times 50 \times V}{m \times d}$$

y en muestras líquidas se calculó en mg/L según:

$$P (mg/L) = \frac{\frac{(A - b)}{a} \times 50 \times V}{v \times d}$$

Dónde:

A= absorbancia de la muestra coloreada

a= pendiente de la curva de calibración

b= ordenada al origen de la curva de calibración

V= volumen final de la muestra digerida (mL)

d= alícuota de la muestra digerida utilizada para el método colorimétrico (mL)

m= masa seca y molida usada en la digestión (g)

v= volumen de la muestra (mL)

2.8 Determinación de los Cationes Ca, Mg, Mn, K, Na, Zn, Cu, Mo, Fe

Para la determinación de estos cationes, se utilizó la misma muestra digerida por el método de PT para muestras sólidas. Su cuantificación se realizó mediante espectroscopía de absorción atómica (marca Varian model 220 A).

El contenido del catión en mg/kg en base seca (bs) se calculó según:

$$Cación (mg/Kg_{bs}) = \frac{A \times D \times V}{m}$$

Dónde:

A= lectura de la concentración del elemento en la muestra digerida y diluida (mg/L)

D= dilución realizada para la lectura del elemento

V=volumen final de la muestra digerida (mL)

m= masa de muestra molida y seca usada en la digestión (g)

2.9 Demanda Química de Oxígeno

La demanda química de oxígeno (DQO) es una medida del equivalente de oxígeno necesario para oxidar la materia orgánica de una muestra por un oxidante químico fuerte. Una alícuota de la muestra es digerida con ácido sulfúrico (H_2SO_4) y dicromato de potasio ($K_2Cr_2O_7$). En esta reacción, el cromo pasa del estado hexavalente (VI) a trivalente (III) y es catalizada por sulfato de plata (Ag_2SO_4). Para eliminar problemas de interferencias de haluros presentes en la muestra se utiliza sulfato de mercurio ($HgSO_4$).

Para muestras líquidas, se siguió el método colorimétrico por reflujo cerrado 5220 D descrito en *Métodos Normalizados para el Análisis de Aguas Potables y Residuales* (APHA, 1992), según el siguiente procedimiento:

1. Añadir 2,5 mL de muestra en un tubo de 16 mm x100 mm de vidrio pirex con tapa hermética. Para muestras con alta concentración se requirió realizar una dilución de la muestra
2. Agregar 1,5 mL de solución 0,0347 M de $K_2Cr_2O_7$
3. Agregar la solución de sulfato de plata (5,5 g de Ag_2SO_4 /Kg de H_2SO_4) lentamente y sobre las paredes del recipiente. Mezclar suavemente
4. Cerrar los tubos herméticamente y mezclar varias veces con movimientos invertidos
5. Colocar los tubos en el termoreactor a 150°C durante 2 horas. Dejar enfriar
6. Leer la absorbancia a 600 nm
7. Previamente a la determinación de la DQO en las muestras, deberá realizarse una curva de calibración con una solución de ftalato ácido de potasio 1000 mg O_2/L . Realizar el mismo procedimiento descrito

El material de vidrio debe estar libre de materia orgánica por lo que fue necesario lavarlo con solución de H_2SO_4 al 20%.

La DQO se calculó en mg O_2/L según:

$$DQO (mgO_2/L) = \left[\frac{(A - B) - b}{a} \right] \times fd$$

Dónde:

A= absorbancia de la muestra

B= absorbancia del blanco

a= pendiente de la curva de calibración

b= ordenada al origen de la curva de calibración

f_d = factor de dilución= volumen final (mL) /alícuota de la muestra (mL)

En muestras sólidas, se utilizó el método desarrollado por Yadvika et al. (2006), quienes adaptaron el método 5220 B de reflujo abierto descrito en APHA (1992), para muestras con alto contenido de sólidos. El procedimiento fue el siguiente:

1. Colocar 0,1 g de muestra húmeda en un balón de 250 mL. Registrar la masa
2. Agregar 10 ml de agua destilada, 50 ml del reactivo de digestión (0,0347 M de $K_2Cr_2O_7$) y una punta de espátula de $HgSO_4$. Colocar anillos rashing o bolitas de vidrio para una ebullición homogénea
3. Colocar el condensador en el balón y conectarlo a la red para que comience a circular el agua
4. Adicionar 60 ml del reactivo de H_2SO_4 lentamente por la parte superior del condensador
5. Calentar la muestra a $150^\circ C$ durante 2 h
6. Enfriar y lavar el condensador con agua destilada
7. Desconectar el reflujo y diluir la muestra con agua destilada hasta aproximadamente 2 veces su volumen. Enfriar la muestra hasta temperatura ambiente
8. Agregar a la muestra 2 o 3 gotas del indicador ferroína
9. Titular el exceso de $K_2Cr_2O_7$ con solución de sulfato de amonio ferroso 0,5 N (FAS) valorada. El punto de viraje es de coloración verdosa a rojiza-marrón
10. Para el blanco realizar el mismo procedimiento, pero con 10 ml de agua destilada

La DQO de una muestra sólida se calculó en g/Kg según:

$$DQO (g/Kg) = \frac{(A - B) \times C \times 8}{m}$$

Dónde:

A= volumen titulado de la muestra (mL)

B= volumen titulado del blanco (mL)

C= concentración de la solución FAS valorada (eq/L)

m= masa de la muestra (g)

2.10 Demanda Química de Oxígeno Soluble

Para la determinación de la demanda química de oxígeno soluble (DQO_s) en muestras líquidas, se adaptó el método 5220 D de reflujo cerrado descrito en *Métodos Normalizados para el Análisis de Aguas Potables y Residuales* (APHA, 1992). La muestra fue centrifugada a 8000 g durante 15 minutos y luego filtrada por membrana de acetato de celulosa de 0,45 µm de porosidad. La determinación de la DQO_s se realizó en la muestra filtrada, siguiendo el mismo procedimiento y cálculos descritos en la técnica para DQO en muestras líquidas.

2.11 Alcalinidad Parcial y Total

La alcalinidad total (AT) incluye todas las especies carbonatadas presentes y se determina por titulación con un ácido hasta el punto final de pH de 4,3. Sin embargo este parámetro no refleja las condiciones de inestabilidad que pueden ocurrir durante la digestión anaeróbica, ya que un aumento en la concentración de los ácidos grasos volátiles (AGV) causa una disminución en la concentración de bicarbonato, resultando en un valor constante de AT. Por lo tanto, esta alcalinidad ha sido considerada insensible para indicar el proceso de inestabilidad en un reactor anaeróbico.

En cambio, la alcalinidad parcial (AP) es una medida directa de la presencia de bicarbonatos en el medio. Jenkins et al. (1991) y Ripley et al. (1986) han propuesto la titulación de la AP a pH 5,75, en vez de la AT para el control y monitoreo de procesos anaeróbicos. La relación de estas alcalinidades (AP/AT) es utilizado como un indicador de estabilidad del proceso.

Para la determinación de las alcalinidades (AP y AT) se realizó el siguiente procedimiento:

1. Centrifugar la muestra a 8000 g durante 10 min. Tomar el sobrenadante de la muestra para la determinación de la alcalinidad
2. Colocar 25 mL de la muestra en un vaso de precipitado

3. Registrar el pH inicial. Utilizar un agitador para homogenizar la muestra mientras se mide el pH, agitando a una velocidad lenta
4. Titular con solución de ácido sulfúrico (H₂SO₄) 0,2N, hasta alcanzar un pH 5,75. Registrar el volumen gastado en la bureta (V₁). Este valor indica la AP. La concentración del ácido puede variar en función a la concentración de la alcalinidad de la muestra
5. Continuar con la titulación, hasta alcanzar un pH 4,3. Registrar el volumen gastado (V₂). Este valor indica la AT
6. Continuar titulando con ácido hasta pH 3,4. No es necesario registrar este valor
7. Llevar la muestra a ebullición, colocando el vaso de precipitado en tela de amianto o material similar. Colocar dentro del vaso anillos rasching de vidrio, para regular el desprendimiento de burbujas durante la ebullición
8. Colocar el termómetro. Cuando haya alcanzado los 90°C, retirar el termómetro y tapar con un vidrio reloj. Contabilizar 4 minutos de ebullición de la muestra
9. Cumplidos los 4 min de ebullición, colocar rápidamente la muestra en un baño frío (recipiente con hielo y agua) para bajar la temperatura de la muestra hasta temperatura ambiente. La muestra está lista para medir los ácidos grasos volátiles (AGV)

La AP y AT se calculó en mg CaCO₃/L según:

$$AP (mgCaCO_3/L) = \frac{V_1 \times C \times 50000}{V}$$

$$AT (mgCaCO_3/L) = \frac{V_2 \times C \times 50000}{V}$$

Dónde

V₁= volumen titulado a pH 5,75 (mL)

C= concentración de la solución H₂SO₄ valorada (eq/L)

V₂= volumen titulado ml a pH 4,3(mL)

V= volumen de muestra (mL)

La relación de las alcalinidades se denominó *alfa*, según:

$$alfa = \frac{AP (pH 5,75)}{AT (pH 4,3)}$$

Valores *alfa* comprendidos entre 0,7 y 0,9 indican condiciones de estabilidad del proceso anaeróbico. Cuanto más próximo a 0,9 esté, mayor optimización del proceso.

2.12 Ácidos Grasos Volátiles

Para la determinación de los ácidos grasos volátiles (AGV), se utiliza la misma muestra que se utilizó para la determinación de las alcalinidades y se realiza una titulación con una base, según método descrito por Dilallo y Albertson (1961). La relación entre los AGV producidos y la alcalinidad (AGV/AT) es un indicador de la estabilidad del proceso anaeróbico.

Se determinaron los AGV siguiendo el siguiente procedimiento:

1. Tomar la misma muestra utilizada para la determinación de las alcalinidades. Debe estar a temperatura ambiente para comenzar la titulación.
2. Titular con solución de hidróxido de sodio (NaOH) 0,1 N valorada hasta alcanzar pH 4. Registrar el volumen gastado (V_3).
3. Continuar titulando hasta pH 7 y registrar el volumen gastado (V_4).

Mediante este método propuesto se alcanza a titular el 60% de los AGV entre los dos pHs titulados.

Los AGV se calcularon en mg de ácido acético (mgAc) por litro, según:

$$AGV \text{ mgAc/L} = \frac{(V_4 - V_3) \times C \times 60000}{V}$$

Dónde

V_3 = volumen titulado a pH 4 (mL)

C= concentración de la solución NaOH valorada (eq/L)

V_4 = volumen titulado ml a pH 7(mL)

V= volumen de muestra (mL)

La relación entre los AGV y la AT (AGV/AT) es un indicador utilizado para el monitoreo del proceso, donde:

$$AGV/AT < 0,3 - 0,4$$

indica condiciones estables del proceso.

2.13 Sólidos Suspendidos Totales y Volátiles

Para la determinación de los sólidos suspendidos totales (SST) y volátiles (SSV) en muestras líquidas se utilizó el método 2540 D y 2540 E respectivamente, descrito en *Métodos Normalizados para el Análisis de Aguas Potables y Residuales* (APHA, 1992). Una alícuota de la muestra (5-10 mL) es filtrada por un filtro de fibra de vidrio de 47 mm de diámetro, y el residuo retenido en el mismo se seca a $100 \pm 5^\circ\text{C}$ hasta masa constante. El aumento de peso del filtro representa los SST en la muestra.

Los SST se calcularon según:

$$SST (g/L) = \frac{(A - B) \times 1000}{V}$$

Dónde:

A= masa del filtro + muestra seca a $100 \pm 5^\circ\text{C}$ (g)

B= masa del filtro (g)

V= volumen de muestra (mL)

Luego el filtro con la muestra seca, se incinera a una temperatura de $550 \pm 50^\circ\text{C}$ hasta peso constante. La pérdida de peso representa los SSV, según:

$$SSV (g/L) = \frac{(A - B) \times 1000}{V}$$

Dónde:

A= masa del filtro + muestra seca a $100 \pm 5^\circ\text{C}$ (g)

B= masa del filtro + muestra incinerada a 550°C (g)

V= volumen de muestra (mL)

Para muestras con alto contenido de sólidos como los lodos utilizados para los experimentos se utilizó el método de centrifugación acorde a Queenan et al. (1996).

El procedimiento consiste en tomar un volumen de muestra (40 mL) y centrifugarla a 8000 g durante 15 min. El sobrenadante se descarta y debe quedar traslúcido. De lo contrario, descartarlo, agregar agua destilada y volver a centrifugar. El sólido retenido en el tubo se trasvasa a una cápsula de porcelana previamente pesada, asegurándose de trasvasar toda la masa de la muestra sólida. Luego la muestra se seca a 100°C , siguiendo

el mismo protocolo descrito anteriormente. Para la determinación de los SSV la muestra seca se incinera a 550 °C y se sigue el mismo procedimiento descrito anteriormente.

2.14 Sulfato

Para la determinación de sulfato (SO_4^{2-}) en muestras sólidas se utilizó el mismo extracto utilizado para la determinación de pH (relación 1:5), se centrifugó y luego se filtró por membrana de nitrato de celulosa con 0,45 μm de porosidad. En muestras líquidas no fue necesario realizar este procedimiento. En la muestra filtrada y líquida se determinó la concentración de sulfato por el método turbidimétrico 4500 E descrito en *Métodos Normalizados para el Análisis de Aguas Potables y Residuales* (APHA, 1992). El ion sulfato precipita en un medio de ácido acético con cloruro de bario (BaCl_2) de modo que forma cristales de sulfato de bario (BaSO_4). Se mide la absorbancia de la suspensión de BaSO_4 con un espectrofotómetro y se determina su concentración por comparación de la lectura con una curva de calibración. El procedimiento fue el siguiente:

1. Tomar 50,0 mL de muestra o una dilución de la muestra con un matraz. Colocarla en un *erlenmeyer* de 100 mL
2. Agregar 10,0 mL de una solución tampón, formada por: 30 g cloruro de magnesio, 5 g de acetato de sodio, 1 g de nitrato potásico y 20 mL de ácido acético en 1 L de solución
3. Mezclar con agitador magnético a velocidad constante
4. Mientras se agita agregar una cucharadita de espátula de BaCl_2 y empezar el recuento de tiempo inmediatamente
5. Agitar durante 1 minuto
6. Trasvasar la muestra a la cubeta del espectrofotómetro
7. Esperar 5 minutos y leer absorbancia a 420 nm
8. Corregir el color y turbidez de la muestra, realizando el mismo procedimiento, pero sin el agregado del BaCl_2
9. Previamente a la determinación de la SO_4^{2-} en las muestras, deberá realizarse una curva de calibración con una solución 10 mg/L de SO_4^{2-} . Realizar el mismo procedimiento descrito

La concentración de SO_4^{2-} se calculó según:

$$\text{SO}_4^- (\text{mg/g}) = \left[\frac{(A - B) - b}{a} \right] \times fd \times \frac{V}{m \times 1000}$$

Dónde:

A = absorbancia de la muestra

B= absorbancia del blanco, o muestra corregida por turbidez y color

a= pendiente de la curva de calibración

b= ordenada al origen de la curva de calibración

fd= factor de dilución= volumen final (mL) /alícuota de la muestra (mL)

V= volumen final del extracto

m= masa húmeda utilizada en el extracto (g)

2.15 Composición del Biogás

El contenido de CH₄ y CO₂ en el biogás fue determinado por cromatografía de gases con equipo Hewlett Packard 5890 GC System, siguiendo la norma ASTM D 1945-14 (2014). Se utilizó la columna de tamiz molecular con malla 80/100 empacada en tubo de acero inoxidable y granulometría 13 X y una columna de Porapak N malla 80/100 empacada en un tubo de acero inoxidable. Como gas de transporte se utilizó Helio grado cromatográfico 99.998% de pureza a un caudal de 80 mL/min. La temperatura del horno de columnas fue de 90°C, la del inyector de 130°C, la del detector de 250°C y donde se aloja las válvulas y el lazo de muestra de 130°C. El detector utilizado es un monofilamento de conductividad térmica (TCD). El tiempo total de análisis es de unos 6 minutos. El gas patrón utilizado para la calibración está compuesto por 47,4 % metano, 8,60% de nitrógeno, 35,00% de dióxido de carbono, 2,00% de oxígeno, 2,99% de hidrógeno y 4,01% de monóxido de carbono, con nivel de confianza del 95% (cilindro N° 155032, grupo Linde Gas S.A).

2.16 Métodos Microbiológicos y Parasitológicos

2.16.1 Coliformes Totales, fecales y *Escherichia coli*

El grupo coliforme constituye un grupo de bacterias heterogéneo, que la mayoría de las especies habitan en el tracto intestinal. Las coliformes se dividen en dos grupos: coliformes totales y coliformes fecales. Las coliformes totales fermentan la lactosa con producción de gas en un lapso máximo de 48 h a 35 °C ±1 °C mientras que las coliformes fecales en un lapso máximo de 48 h a 44,5 °C ±1 °C. La especie predominante de las

coliformes fecales es la *E. coli*. Este grupo es utilizado como indicador de contaminación fecal, ya que debido a su alta capacidad de supervivencia y multiplicación fuera del intestino puede encontrarse en aguas y alimentos. Cuanto mayor sea el número de coliformes fecales, mayor probabilidad de estar frente a una contaminación por materia fecal.

Determinación de coliformes totales por el método del número más probable (NMP).

Para la determinación de coliformes totales en muestras líquidas se utilizó el método descrito en *Métodos Normalizados para el Análisis de Aguas Potables y Residuales* (APHA, 1992) y para muestras sólidas se adaptó la metodología descrita en *Test Methods for the Examination of Composting and Compost* (USDA and USCC, 2001). Esta metodología se fundamenta en la capacidad de este grupo microbiano de fermentar lactosa, utilizando un medio de cultivo que contenga sales biliares. Esta determinación consta de dos fases, la fase presuntiva y la fase confirmativa. En la fase presuntiva, el medio de cultivo que se utiliza es el caldo lauril sulfato de sodio el cual permite la recuperación de los microorganismos dañados que se encuentran presentes en la muestra y que sean capaces de utilizar a la lactosa como fuente de carbono. Para la fase confirmativa de coliformes totales, se siembra una alícuota de la muestra de aquellos tubos positivos de la fase presuntiva, en caldo lactosado bilis verde brillante. En este medio de cultivo, la peptona aporta los nutrientes necesarios para el adecuado desarrollo bacteriano, la bilis y el verde brillante son los agentes selectivos que inhiben el desarrollo de bacterias Gram Positivas y Gram Negativas a excepción de las coliformes, y la lactosa es el hidrato de carbono fermentable. Para la fase confirmativa de coliformes fecales, se siembra una alícuota de la muestra de aquellos tubos positivos de la fase presuntiva en caldo E.C. (compuesto principalmente por tripteina, lactosa y sales) y se incuba a una temperatura de $44,5 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ por un lapso de 24 a 48 horas. Para la búsqueda de *E. coli*, se toma una alícuota de la muestra de aquellos tubos positivos con medio E.C. Se la siembra por agotamiento de ansa en placas de *Petri* con medio E.M.B agar (compuesto principalmente por peptona, lactosa y sacarosa) con esosina y azul de metileno, que es un medio selectivo y diferencial.

A continuación, se resume el procedimiento para la determinación por el NMP de coliformes totales, fecales y *E. coli*:

1. Colocar en un *erlenmeyer* 10 mL de muestra o 10 g de muestra en el caso de muestras sólidas y agregar 90 mL de solución *buffer* de KH_2PO_4 (32g/L,

neutralizada a pH 7,0) previamente esterilizada. Agitar por 20 minutos y dejar reposar 5 minutos

2. Preparar 3 diluciones seriadas hasta 10^{-3} , en tubos de ensayo con 10 mL de volumen final
3. Sembrar con dos o tres ansadas de cada dilución seriada por triplicado en tubos que contienen 10 mL de lauril sulfato como medio presuntivo y una campana de Durham
4. Incubar a 35°C por 48 h
5. Realizar la primera lectura, observando una variación del color o turbidez del medio de cultivo y generación de gas dentro de la campana, para considerarlo como resultado positivo. Contabilizar y registrar los tubos positivos y negativos
6. Reservar los tubos que dieron positivos para la determinación de coliformes totales y fecales por la fase confirmativa.
7. De los tubos que dieron positivos, sembrar con dos o tres ansadas los tubos que contienen 10 mL de verde brillante y los otros con 10 mL de EC. Cada tubo contiene además una campana de Durham. Se tapan los tubos para generar condiciones anaeróbicas
8. Los tubos con verde brillante se incuban a 35°C (determinación de coliformes totales) y los tubos con EC se incuban a 44°C (determinación de coliformes fecales) por 48 h
9. Realizar la lectura, considerando positivos aquellos tubos con cambio de color y producción de gas dentro de la campana de Durham. Contabilizar y registrar los tubos positivos y negativos para determinar el NMP
10. Los tubos que dieron positivos en coliformes fecales se utilizan para la determinación de *E. coli*. Se siembra una alícuota del medio de cada tubo positivo, en una placa de *Petri* con medio E.M.B agar (con eosina y azul de metileno) y se incuba a $35 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ por 24 a 48 h
11. Realizar la lectura. El crecimiento de *E. coli* se detecta por presencia de coloración verde metálico brillante. Contabilizar y registrar los tubos positivos y negativos de todas las diluciones
12. Luego por comparación con una tabla de NMP, según procedimiento 9221 B de *Métodos Normalizados para el Análisis de Aguas Potables y Residuales* (APHA, 1992), se calcula el NMP de cada muestra.

Determinación de coliformes fecales y *E. coli*, por placas Rida®Count

Las placas Rida®Count, son placas comerciales que permiten de una forma práctica y sencilla, la detección y diferenciación de bacterias, utilizando medios selectivos inmersos en las placas. Para la determinación de *E. coli*/coliformes fecales, se utilizó las placas con medio de cultivo Agar Modificado (Violeta Rojo Bilis) con X-Gal. El cristal violeta y las sales biliares inhiben el crecimiento de bacterias Gram Positivas. La fermentación de la lactosa genera la acidificación del medio que se observa por el color del indicador de pH X-Gal (azul pálido / verde pálido) para bacterias Coliformes (actividad de galactosidasa) y S-Gluc (azul oscuro / violeta) para *E. coli* (actividad de glucuronidasa).

Se coloca 1 mL de la dilución de muestra en una placa y se incuba a 35° C por 48 hs. Transcurrido el período de incubación se cuentan las colonias formadas en cada placa. Las colonias de coliformes fecales y *E. coli* se identifican por una coloración celeste y violeta, respectivamente.

2.16.2 *Salmonella* spp.

Determinación de *Salmonella* spp. por el método APHA (1992)

La *Salmonella* es un patógeno zoonótico, por lo cual su monitoreo es un parámetro de importancia en aguas y alimentos. Para la determinación de *Salmonella* spp. se utilizó el método descrito por APHA (1992). Se tomó una suspensión de la muestra en un medio selectivo de enriquecimiento (caldo selenito cistina) y se incubó a 35 ± 2 °C por 18h. Transcurridas las 18 horas, se sembró cada uno de los tubos del medio de enriquecimiento en placas de Petri con medio Agar *Salmonella/Shigella*, incubándose a 35 ± 2 °C durante 24 horas. Las colonias de *Salmonella* spp. se detectan transparentes, con un halo negro alrededor o en el centro, coloración debida a la producción de sulfuro de hierro. En aquellas muestras que dieron positivo se realizan las pruebas bioquímicas confirmatorias de la especie. Las pruebas utilizadas fueron el agar hierro-tres- azúcares (TSI), el medio SIMy Agar Lisina Hierro (LIA). Si hay formación de colonias en estos medios, entonces hay presencia de *Salmonella*.

Determinación de *Salmonella* por placas Rida®Count

Las placas RIDA® COUNT *Salmonella*/Enterobacteriaceae se utilizan para la detección de Enterobacterias totales con la opción de diferenciar *Salmonella*. Para su determinación, se utilizó las placas medio de cultivo VRB (Violeta Rojo Bilis) modificado conteniendo $X\alpha$ – Gal y Salmon – β – Gal. El principio se basa en que las sales biliares inhiben a las bacterias Gram Positivas. El sustrato $X\alpha$ – Gal se reduce por la α – galactosidasa, enzima

específica de *Salmonella*. El sustrato Salmon – β – Gal se reduce por la β – galactosidasa, producida por la mayoría de las Enterobacterias pero que *Salmonella* no es capaz de sintetizar.

Se coloca 1 mL de la dilución de muestra en una placa y se incuba a 35° C por 48 h. Transcurrido el período de incubación se cuentan las colonias formadas en cada placa. Las colonias que aparecen azules son *Salmonella* y las violetas, púrpura ó índigo son Enterobacterias. Para hacer el recuento de Enterobacterias totales, se deben contar todas las colonias, tanto las azules como las violetas, púrpura ó índigo.

2.16.3 Parasitología

La determinación de huevos de nematodos gastrointestinales (NGI) se realizó mediante una técnica de recuperación de huevos según técnica modificada de McMaster, descrita por Roberts and O'sullivan (1950). El procedimiento consiste en pasar un volumen de muestra en una columna de tamices (500, 200, 80 y 60 meshes de abajo hacia arriba). Se lava el tamiz superior utilizando una manguera especial para filtrado y luego del lavado se retira el tamiz de la columna. Se realiza este mismo procedimiento para cada tamiz. En el tamiz de 500 meshes queda un sedimento pastoso oscuro que es el que se analiza en el microscopio. Para ello, se trasvasa el sedimento a un vaso de precipitado con el lavado de una solución hipertónica de cloruro de sodio (3 lavados de 50 mL). En agitación, se toma una muestra del vaso de precipitado y se colocan 2 mL en cada celdilla de la cámara de recuento Mc Master. Se lee en microscopio 40X (objetivo 4X) y se cuentan los huevos que tienen un aspecto normal.

3. De residuo a recurso: composición del guano

3.1 Introducción

La producción animal ha evolucionado hacia sistemas donde el animal es concentrado en un espacio reducido, permitiendo tener un mayor número de animales por superficie. Estos sistemas de producción intensificados o de confinamiento requieren una mayor cantidad de recursos para lograr una alta producción. Los avances en cuanto a la crianza del animal, el mejoramiento genético, las innovaciones de mecanización y el uso de formulados y aditivos en la alimentación del animal mejoran la productividad en los sistemas intensificados (Hribar, 2010). Asimismo, estos sistemas conducen a la generación de grandes volúmenes de excretas del animal (Hu et al., 2017). En Argentina, están registradas 43,1 millones de gallinas en granjas comerciales que excretan diariamente entre 0,08-0,10 kg/animal. En relación a estos datos, se generan en promedio 1.300.000 Tn de guano/año.

Si bien hay una gran variedad de manejo en las granjas, en general se pueden distinguir tres grandes grupos de sistemas de establecimientos (F.A.O., 2008): jaulas en batería (*battery cage*), sistemas de granero (*barn system*) y sistemas de libre movimiento (*free range*). Las jaulas en batería son los sistemas más utilizados a nivel mundial para la producción de huevos (F.A.O., 2008; Mench et al., 2011). En países como Argentina, Brasil, India y México casi la totalidad de las granjas comerciales usan este sistema (International Egg Commission, 2010). En este sistema, las jaulas están ubicadas en forma piramidal y puede haber entre 2 a 3 hileras en altura. La principal ventaja que presentan las jaulas en batería es que las gallinas y sus huevos están separadas de las excretas, decreciendo así el riesgo de transmisión de enfermedades por contaminación patogénica y parasitológica. Además, se ha demostrado que este sistema es económicamente eficiente porque permite la automatización de la alimentación, del agua y de la recolección de huevos y mejora la habilidad para controlar las variables ambientales de importancia para la salud del animal y el desarrollo de la producción (Mench et al., 2011).

Particularmente, en Argentina el sistema de jaulas en batería puede ser manejado en forma convencional o automatizada. En los sistemas convencionales de batería (SC), su estructura piramidal hace que las excretas de las gallinas sean depositadas en el piso, acumulándose debajo de las jaulas formando pilas (Figura 1 a). El guano en este tipo de sistemas es extraído manualmente 1 o 2 veces al año, y generalmente se realiza cuando

hay recambio de aves. En este tipo de sistemas, habitualmente se agrega cal al guano para el secado y minimizar la proliferación de moscas. La alimentación y la recolección se realizan mediante canaletas ubicadas en cada hilera de jaulas y la ventilación mediante apertura de cortinas. En los sistemas de jaulas en batería automatizados, las excretas son depositadas en cintas transportadoras que finalizan en una fosa. El guano es extraído de la fosa en forma mecánica de 2 a 4 veces por semana. Las condiciones ambientales en estos galpones, como la iluminación, temperatura y ventilación son controladas y reguladas y posee sistemas mecánicos de recolección de huevo y de alimentación (Figura 1 b).



Figura 1. Sistema de jaulas en batería en granjas avícolas. a) Avícola con sistema convencional (SC); b) Avícola con sistema automatizado (SA).

La composición del guano varía extensamente entre países, dentro de un país, e incluso dentro de una misma región. Los diferentes sistemas de producción utilizados, formas de manejo dentro de los establecimientos, las distintas dietas del animal, las distintas líneas genéticas y las condiciones ambientales son algunos de los factores que generan una gran variabilidad en las características del guano.

Para analizar las distintas alternativas de tratamiento, de manejo y utilización se requiere conocer las características del guano y evaluar sus potencialidades y limitantes en cada caso. Sin embargo, Argentina no cuenta con una caracterización integral del guano, y menos aún con información sobre la variabilidad de su composición bajo los distintos sistemas de manejo del guano.

El guano es ampliamente utilizado como enmienda orgánica, dadas sus características favorables por el alto contenido de nutrientes. Si bien en Argentina ésta es la alternativa más difundida entre los productores avícolas y agrícolas, su uso se realiza sin conocer su

composición ni a través de un plan de manejo de nutrientes que considere un balance de éstos entre lo que aporta el guano y lo que requiere el cultivo (Secretaría de Agroindustria, 2018). Por otro lado, se ha demostrado que el guano puede contener microorganismos patógenos de alta resistencia y otros constituyentes químicos como metales pesados, hormonas, antibióticos y drogas de uso veterinario que representan un riesgo para la salud humana y para el ambiente por la posibilidad de contaminar suelos y aguas (Hu et al., 2017). Sumado a esto, los grandes volúmenes que se generan y el requerimiento de grandes superficies para su aplicación hacen necesario buscar alternativas de tratamiento que valoricen este residuo y que minimicen los riesgos ambientales.

3.2 Objetivo

En relación a lo expuesto, se planteó como primera etapa de esta tesis el objetivo específico:

1. Conocer las características intrínsecas del guano de aves ponedoras, identificando sus potencialidades y limitantes para ser utilizado como recurso, y comparando sus características fisicoquímicas y microbiológicas entre los dos principales sistemas de manejos de producción avícola del país.

3.3 Materiales y Métodos

Muestreo y diseño experimental

Se muestrearon 7 avícolas de sistema de producción en jaulas en batería: 4 avícolas con sistema automatizado (SA) y 3 avícolas con sistema convencional (SC). Se realizaron tres tiempos de muestreos: noviembre 2013, marzo 2014 y agosto 2014. Todos los galpones muestreados tenían gallinas en etapa de postura, y alimentadas con alimento balanceado con complejos vitamínicos.

Las granjas avícolas muestreadas se encontraron en la localidad de Brandsen, Ituzaingó, Campana, Marcos Paz y Los Cardales, localidades pertenecientes a la provincia de Buenos Aires que es la principal zona de producción de huevos. La disposición final del guano es esparcimiento y riego en el mismo predio o venta a horticultores para todas las avícolas muestreadas. Solo una trata al guano por compostaje.

Para la recolección del guano en los sistemas SA y SC se siguió los procedimientos de recolección del guano descritos por (Maisonnave et al., 2015).

En los galpones convencionales el guano permanece varios meses almacenado, formándose pilas debajo de las jaulas y a lo largo del galpón. En este caso, se utilizó una pala para “calar” la pila en un punto aproximadamente a media altura de la misma, introduciéndola inclinada hacia abajo (Figura 2 a). Se tomaron sub-muestras en diferentes puntos de la fila de guano formada a lo largo del galpón (Figura 2 b), siguiéndose el mismo procedimiento hasta alcanzar entre 10 a 15 sub-muestras.

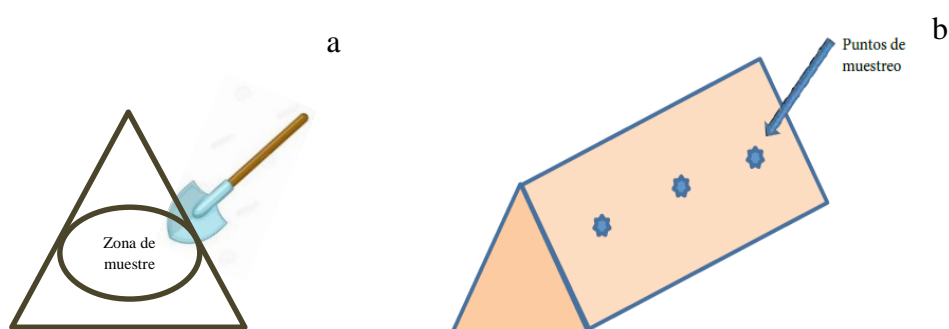


Figura2. Método del muestreo en galpones convencionales. a) zona muestreo (calado de la pila). b) muestreo de la pila a lo largo del galpón. Imágenes extraídas de Maisonnave et al. (2015).

En los galpones automatizados, el guano es extraído mediante una cinta transportadora, finalizando su recorrido en una fosa. En este caso, las muestras fueron recolectadas en el extremo de la cinta transportadora, antes de caer en la fosa, tomando a intervalos regulares hasta alcanzar entre 10 a 15 sub-muestras (Figura 3 a).



Figura 3. a) Recolección del guano en la cinta transportadora de un SA; b) Guano recolectado y descarte de las partículas no consideradas para la caracterización; c) Homogenización y fraccionamiento del guano.

El guano recolectado en cada galpón, tanto en el SC como en el SA, se almacenó en una bolsa de polipropileno y se cerró inmediatamente para ser transportado al laboratorio. En aquellas granjas que tenían más de dos galpones (en etapa de postura y bajo la misma alimentación) se muestrearon 3 galpones como máximo, realizándose el mismo procedimiento de muestreo.

El guano recolectado en cada granja, se mezcló utilizando bandejas plásticas hasta lograr la mayor homogeneidad en la muestra. Algunas partículas sólidas fueron descartadas previamente como plumas, piedras, agregados de cal y cascaras de huevos rotos (Figura 3 b). Se fraccionó cada muestra por triplicado utilizando la metodología estandarizada del cuarteo descrita por USDA and USCC (2001) (Figura 3 c) para los análisis técnicos. Todas las muestras fueron conservadas a 4°C hasta su análisis.

Se consideró como unidad experimental cada establecimiento avícola muestreado: 3 avícolas con SC y 4 avícolas en SA (7 unidades experimentales). Los tres tiempos de muestreo fueron considerados réplicas de cada unidad experimental (21 muestras totales, n= 9 con SC, n=12 con SA).

Determinaciones analíticas

Se determinaron las siguientes variables: pH, conductividad eléctrica (CE), sólidos totales (ST), sólidos volátiles (SV), nitrógeno amoniacal (N-NH₃), nitrógeno total por Kjeldahl (NTK), cationes y metales totales (Ca, Na, K, Mg, Mn, Fe, Cu y Zn), fósforo total (PT), demanda química de oxígeno (DQO), y sulfato (SO₄²⁻). La metodología utilizada en cada caso, fue descrita en el capítulo de “métodos analíticos” de esta tesis.

Además, se cuantificó la concentración de *E. coli* y coliformes totales en las avícolas de ambos sistemas SC y SA en el muestreo 2 (marzo 2014). Para ello se realizó una dilución de la muestra 1:10 con agua destilada, y se siguió la metodología descrita en el capítulo de “métodos analíticos” de esta tesis. Se determinaron como presencia o ausencia los patógenos *P. aeruginosa*, *Citrobacter* spp., *P. mirabilis* y los parásitos ácaros, *Eimeria* spp. (oocitos), *Strongyloides* spp. (larvas y huevos) y *Ascaridia* spp./*Heterakis* spp. en las muestras del último muestreo (agosto 2014) y *Salmonella*, spp. en los tres muestreos. Se calculó la prevalencia de cada parásito como el número de muestras positivas sobre el número de muestras totales analizadas para el SA y SC. La identificación de organismos y de huevos de parásitos, se realizó de acuerdo al método de concentración por flotación con centrifugación en una solución de *sheather sugar*, acorde a la metodología descrita por Beltrán et al. (2003). Las diferentes formas de los parásitos fueron identificadas por microscopía 10X y 40X (MITIC, model DMB1-223).

Análisis estadístico

La comparación entre sistemas (SA y SC) se realizó para los promedios de cada variable, considerándose diferencias significativas para valores de $p < 0,05$. Los promedios de las variables fueron analizados por t-test y por el test no paramétrico Mann-Whitney cuando no fue satisfactorio la normalidad (D'Agostino and Pearson) y homocedácea (F test). El análisis estadístico fue realizado utilizando el programa GraphPad Prism®, version 5.1.

3.4 Resultados y Discusión

3.4.1 Composición del guano

Los valores promedios obtenidos para cada variable analizada en el guano del SA y del SC son mostrados en la Tabla 1. Además, se incluyeron valores reportados por otros autores.

Tabla 1. Composición fisicoquímica del guano en SC y SA. Los valores son expresados en base seca (promedio \pm error estándar). Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre ambos sistemas SA y SC.

Variable	Unidad	SC	SA	Valores mínimos y máximos reportados
pH		7,7 \pm 0,0 ^a	7,4 \pm 0,0 ^b	6,4-8,8 ^(2,3,5,9,10,11,12)
CE	mS/cm	10,1 \pm 0,5 ^b	12,1 \pm 0,5 ^a	5,7-21,8 ^(2,5,11,12)
ST	%	41,6 \pm 2,3 ^a	28,6 \pm 0,7 ^b	22-41 ^(1,4,8,11)
SV	%	45,4 \pm 2,5 ^b	65,5 \pm 0,8 ^a	54-75 ^(3,4,8,9,11)
C:N		20,5 \pm 0,9 ^b	25,3 \pm 0,9 ^a	4-16 ^(2,3,5,8,10,11,12)
NTK	mg/g	36,0 \pm 1,0 ^b	47,0 \pm 1,4 ^a	21-87 ^(1,2,3,4,5,6,9,8,10,12)
N-NH ₃	mg/g	8,0 \pm 0,9 ^b	14,3 \pm 0,9 ^a	6-27 ^(1,8,10,12)
DQO	mg/g	849,7 \pm 35,4 ^b	921,5 \pm 41,5 ^a	812 ⁽⁴⁾
PT	mg/g	17,1 \pm 1,0 ^a	13,5 \pm 0,7 ^b	6-23 ^(1,2,4,5,6,9,10,12)
SO ₄ ²⁻	mg/g	2,9 \pm 0,3 ^a	2,0 \pm 0,2 ^b	-
Ca _T	mg/g	94,4 \pm 4,0 ^a	80,1 \pm 4,5 ^a	19-113 ^(4,5,6,9,12)
Na _T	mg/g	17,7 \pm 1,3 ^a	17,7 \pm 1,4 ^a	2-4 ^(4,9,12)
K _T	mg/g	34,4 \pm 1,2 ^a	30,3 \pm 1,0 ^b	15-38 ^(1,4,5,6,9,12)
Mg _T	mg/g	7,8 \pm 0,3 ^a	6,8 \pm 0,2 ^b	4-8 ^(4,6,9,5,12)
Mn _T	μg/g	800,3 \pm 43,5 ^a	663,2 \pm 19,3 ^b	200-956 ^(5,6,9,7,12)
Fe _T	μg/g	1084,0 \pm 75,6 ^a	822,7 \pm 36,2 ^b	770-1530 ^(4,9,12)

Cur	$\mu\text{g/g}$	$32,3 \pm 4,5^a$	$28,3 \pm 3,8^a$	54-748 ^(4,6,7,9,12)
Znr	$\mu\text{g/g}$	$395,8 \pm 19,4^a$	$412,9 \pm 25,0^a$	200-718 ^(4,5,6,7,9,12)

Referencias. (1) Burton and Turner, 2003; (2) Ogunwande and Osunade, 2011; (3) Ogunwande et al., 2008; (4) Borowski and Weatherley, 2013; (5) Quiroga et al., 2010; (6) Bolan et al., 2010; (7) Bolan et al., 2004; (8) Abouelenien et al., 2009; (9) Inhat and Fernandes, 1996; (10) Kelleher et al., 2002 (11) Rizzo et al., 2013; (12) Wiedemann et al., 2008.

Características generales

El valor de pH es alcalino en ambos sistemas, siendo superior en el guano del SC. Valores similares fueron reportados por otros autores (Tabla 1). Para un proceso anaeróbico, se recomienda que el pH de un sustrato o carga de ingreso sea cercano a la neutralidad. El rango de pH óptimo para las bacterias metanogénicas es entre 6,5-7,5. Esta variable deberá ser controlada al ingreso del reactor, principalmente si se trata el guano del SC, donde el pH es superior a 7,5.

La CE fue elevada en ambos sistemas, siendo superior en el guano del SA. La CE es una estimación del contenido de sales disueltas en medio acuoso. El mayor valor de la CE en el SA podría deberse a la mayor concentración de amonio. Se conoce que la aplicación frecuente de dosis de efluentes o residuos crudos (sin tratamientos), como los estiércoles de animales, con valores superiores a 4 mS/cm pueden causar salinización en el suelo y/o un deterioro en las plantas y cultivos (Burton and Turner, 2003; Marron, 2015; Zhou et al., 2005). En digestión anaeróbica se sugiere una conductividad que no supere los 25-30 mS/cm para evitar un desequilibrio del sistema (Tabatabaei and Ghanavati, 2018). Ciertos iones como Na, Ca, Mg y K que están vinculados a la CE, a altas concentraciones podrían generar toxicidad en un proceso anaeróbico.

Contenido de humedad y materia orgánica

El contenido de materia seca (como ST) fue superior en el SC. La pérdida de humedad en el guano del SC podría deberse a los largos períodos de almacenamiento en el SC y por el agregado de cal. Contrariamente, el guano del SA es más fresco, donde se mantiene la humedad y sus características intrínsecas. El contenido de humedad está asociado directamente con el manejo del estiércol en el establecimiento, afectando al manipuleo, transporte, tratamiento y disposición final del guano. Los mayores niveles de humedad generan un mayor volumen y peso del guano, incrementando así los costos asociados al manipuleo y transporte de este material (Wiedemann et al., 2008).

La mayoría de las plantas de biogás, trabajan en digestión húmeda, con un contenido menor al 20% de ST. El contenido de humedad en el guano es un factor determinante

para conocer el contenido de agua a agregar en la carga de alimentación y mantener así el % ST interno de trabajo que requiere la digestión anaeróbica húmeda. Así, cuanto mayor humedad posea el guano, menor cantidad de agua se agregará en la carga de alimentación y consecuentemente menores costos asociados al tratamiento.

El contenido de materia orgánica y carbono en la muestra fueron determinados a través del contenido de SV y la DQO. El carbono presente en el guano de ambos sistemas, proviene de aquellos componentes de la dieta no digeridos por el animal y representa el contenido principal del estiércol después de la humedad (Wiedemann et al., 2008). Ambas variables (SV y DQO) fueron significativamente mayores en el guano del SA. Esto es debido a la mayor conservación de la materia orgánica. Por el contrario, en el guano del SC la materia orgánica sufre un proceso de degradación en el tiempo, perdiéndose el contenido de carbono y materia orgánica. Durante el almacenamiento, cantidades significativas de carbono se pierden a la atmósfera como dióxido de carbono y metano (Burton and Turner, 2003; Wiedemann et al., 2008). En consecuencia, el guano de un SC podría producir un mayor impacto ambiental que el guano del SA, debido a la liberación continua de los principales gases de efecto invernadero.

El carbono es un aditivo valioso en el suelo, capaz de proporcionar una mayor estructura y mejorar su actividad biológica por el aporte adicional de sustrato para la biota (Albuquerque et al., 2012; Kelleher et al., 2002). Asimismo, un sustrato rico en carbono es una fuente potencial de energía generada mediante el proceso biológico anaeróbico, por lo que se espera que el guano del SA genere una mayor producción de metano y biogás que el guano del SC.

Contenido de nutrientes esenciales (N, P y K)

El contenido de nitrógeno es elevado en el guano de ambos sistemas, siendo significativamente superior en el SA, tanto como NTK como N-NH₃. El guano es uno de los estiércoles que mayores concentraciones de nitrógeno orgánico posee debido a la presencia de altos niveles de proteínas y aminoácidos (He and Zhang, 2014). Los niveles de nitrógeno pueden variar dependiendo de la dieta del animal y de las condiciones de manejo del estiércol (Sindhøj and Rodhe, 2013; Wiedemann et al., 2008). El nitrógeno ingerido por el animal, es excretado primeramente como ácido úrico, el cual es rápidamente convertido en nitrógeno amoniacal y liberado como gas. El N-NH₃ en el guano se acumula rápidamente luego de la excreción y queda en la fracción líquida del estiércol como el ion amonio. Cuando el estiércol se seca bajo la influencia de condiciones ambientales hay una parte del amonio que se pierde como gas y una parte puede ser

transformada como nitrato por microorganismos, proceso llamado nitrificación (Li et al., 2012; Maltais-Landry et al., 2018). Esto podría explicar los menores niveles de nitrógeno encontrados en el guano del SC, donde los períodos de almacenamiento extensos producen pérdidas del nitrógeno como gas NH_3 y por escorrentía como nitrato. Por otro lado, el pH superior a 7, favorece la formación de NH_3 y las pérdidas por volatilización (Li et al., 2012). El mayor valor de pH en el guano del SC probablemente condujo a mayores pérdidas de NH_3 por volatilización. Un estudio realizado por Liang et al. (2005) demostró que el guano removido diariamente puede producir un 74% menos emisiones de NH_3 que el guano removido semanalmente.

Durante la digestión anaeróbica del guano, las concentraciones del N- NH_3 se incrementan considerablemente. Si bien el ion amonio es un nutriente esencial para el desarrollo de los microorganismos, altas concentraciones de la forma no disociada (NH_3 acuoso) generan toxicidad para las bacterias metanogénicas y el proceso anaeróbico puede verse inhibido. Bajo este concepto, el guano del SA podría tener mayor potencial de inhibición del proceso anaeróbico. La minimización de los niveles de N- NH_3 será de gran importancia durante el proceso anaeróbico de este material.

Los niveles del P_T y K_T fueron significativamente superiores en el guano del SC. Se reporta un amplio rango de valores de P que va desde 6 a 23 mg P/g de peso seco (Tabla 1), debido a que la cantidad de P en el estiércol depende de varios factores como edad del animal, estado de crecimiento, dieta y condiciones de almacenamiento (He and Zhang, 2014). Aproximadamente el 80% del P y el 90% del K que son ingeridos a través de la alimentación, son excretados en el estiércol y en la orina del animal principalmente en la forma inorgánica (Burton and Turner, 2003; He and Zhang, 2014). En este trabajo se encontró resultados similares a los reportados por Wiedemann et al. (2008), donde las mayores concentraciones del P se encontraron en el guano con largos tiempos de residencia en el establecimiento, en comparación con el guano que es extraído por cintas transportadoras con mayor periodicidad. En cuanto al K, este autor también encontró una mayor concentración de este elemento en el guano de este sistema.

Contenido de nutrientes secundarios y potenciales contaminantes

La concentración de los elementos Mg_T , Mn_T y Fe_T y el ión SO_4^{-2} fue superior en el guano del SC. No se encontraron diferencias significativas entre el guano del SC y del SA para los elementos Ca_T , Na_T , Cu_T y Zn_T . La composición del guano de ambos sistemas es rica en macro y micronutrientes. En particular, se observaron valores altos de Na_T comparado con otros valores reportados (Tabla 1). El Na se encuentra en el formulado de la dieta del

animal, y ayuda al crecimiento y la performance de las aves. Un exceso de Na en la dieta del animal puede provocar problemas de peso, mortalidad y baja calidad de los huevos (Baloš Živkov et al., 2016; Quan and Benjakul, 2019).

Un trabajo realizado sobre las características fisicoquímicas del guano de granjas ponedoras ubicadas en las principales zonas de la provincia de Buenos Aires también reportó que los elementos Ca, Na, Cu y Zn no mostraron diferencias significativas entre el guano extraído manualmente y por sistema automatizado (Secretaria de agroindustria, 2018).

El estiércol de ambos sistemas presentó cantidades apreciables de los nutrientes esenciales (N, K, y P), de los nutrientes secundarios (Ca, Mg, S) y elementos trazas (Cu, Zn, Mn, Fe). La presencia de Mn, Fe, Cu y Zn en el estiércol provienen principalmente de la dieta del animal, ya que son agregados como aditivos para reducir enfermedades, como promotores de crecimiento y para incrementar la producción de huevos (Bloem et al., 2017; Bolan et al., 2004). Así, una gran proporción de estos elementos trazas son excretados en las heces y orina y la concentración en el estiércol dependerá principalmente de la concentración en la dieta del animal. Más del 90% del Cu agregado en la dieta del animal es excretado. Por otro lado, estos metales se unen fuertemente a la materia orgánica y tienden a acumularse (Bolan et al., 2004).

El aporte de estos nutrientes y elementos trazas por el estiércol estimulan el crecimiento de microorganismos anaeróbicos y están involucrados como co-factores en reacciones enzimáticas. Sin embargo, ciertos cationes como Ca, Mg, Na y Mn, pueden causar efectos inhibitorios a determinadas dosis. La concentración óptima para las metanogénicas es reportada entre los 100-200 mg/L para el Na, 200 mg/L para el Ca y 720 mg/L para el Mg, mientras que puede ocurrir inhibición para concentraciones de estas sales superiores a 1500 mg/L (Schnurer and Jarvis, 2010)

Los metales Cu, Ni, Zn y Fe son considerados metales pesados debido al impacto que generan en el ambiente y su potencial contaminación. Aunque estos metales generalmente son necesarios a concentraciones trazas como aditivos que incrementan las actividades enzimáticas de las bacterias metanogénicas, en moderada a excesiva concentraciones pueden causar toxicidad en reactores anaeróbicos (Guebitz et al., 2015; Mao et al., 2015; Tabatabaei and Ghanavati, 2018).

El ión sulfato es un aceptor de electrones que impacta adversamente en la actividad de las bacterias formadoras de metano. El efecto del sulfato en un proceso anaeróbico está fuertemente unido al contenido de DQO en el medio (Khanal, 2008; Schnurer and Jarvis,

2010). El sulfato es reducido a sulfuro de hidrógeno (H₂S) por las bacterias sulfato-reductoras. Si bien el H₂S es la principal fuente de azufre y micronutriente esencial de las bacterias formadoras de metano, la presencia de altas concentraciones de este compuesto puede favorecer el desarrollo de las bacterias sulfato-reductoras que compiten con las metanogénicas por el sustrato (acetato, hidrógeno y CO₂). En este caso, la formación del sulfuro de hidrógeno se ve favorecida frente a la formación del metano. La relación másica teórica DQO/SO₄²⁻ para lograr una completa remoción de la materia orgánica es 0,67 (Khanal, 2008). En general, un valor de relación DQO/SO₄²⁻ inferior y superior a 0,67, favorece la sulfurogénesis y metanogénesis, respectivamente. Sin embargo, los valores reportados en la literatura sobre esta relación pueden variar considerablemente (Dar et al., 2008; Lu et al., 2016; Nurandani et al., 2018). La relación DQO/SO₄²⁻ en el guano es cercana a 300 en promedio en ambos sistemas, por lo que se espera que esta concentración de sulfato no afecte la metanogénesis.

3.4.2 Análisis microbiológico y parasitológico

En la Tabla 2 se muestra los valores promedios, máximos y mínimos de microorganismos patógenos.

Tabla 2. Valores promedio, máximos y mínimos de microorganismos en el guano del SC (n= 3) y SA (n= 4) obtenidos en el muestreo 2.

	Valor (UFC/g)	SC	SA
<i>E. coli</i>	Promedio	1,3x10 ⁷	7,5x10 ⁸
	Min-Max	1,6x10 ⁶ -3,4 x10 ⁷	1,1x10 ⁶ -1,7x10 ⁹
Coliformes	Promedio	1,3x10 ⁸	4,3x10 ⁸
Totales	Min-Max	1,3x10 ⁶ -3,5x10 ⁸	1,8x10 ⁴ -9,5x10 ⁸

Referencias. UFC= unidades formadoras de colonias.

Se observó una tendencia hacia menores concentraciones de coliformes totales y *E. coli* en el guano del SC. Las condiciones ambientales en el establecimiento, los períodos más prolongados de almacenamiento o bien las condiciones de manejo del guano podrían ser la causa de la disminución de la concentración de estos patógenos. Por otro lado, las concentraciones de estos microorganismos son altas en el guano de ambos sistemas, encontrándose su presencia en el total de las muestras analizadas para el SC (100%) y en el 75% de las avícolas del SA (solo en uno de los establecimientos no se encontraron estos microorganismos). Los valores encontrados en este trabajo son similares a los reportados por Borowski and Weatherley (2013) con concentraciones de 10⁶ de *E. coli* y Terzich et

al. (2000) con concentraciones de *E. coli* entre 10^5 and 10^{10} UFC/g en el guano de aves ponedoras.

En la Figura 4 se muestra la prevalencia de los microorganismos patógenos *Citrobacter* spp, *Salmonella* spp, *Proteus mirabilis* y *Pseudomonas aeruginosa* en el guano del SC y SA. Todos estos microorganismos patogénicos causan efecto en la salud humana. La especie *Citrobacter* es aeróbica y la *E. coli* facultativa anaeróbica, ambas son enterobacterias pertenecientes al grupo de las bacterias coliformes fecales. *Proteus mirabilis* y *Salmonella* spp, son ambas enterobacterias facultativas anaeróbicas. *P. aeruginosa* es un patógeno aeróbico, de la familia de las pseudomonas, oportunista humano que puede afectar a plantas y animales también

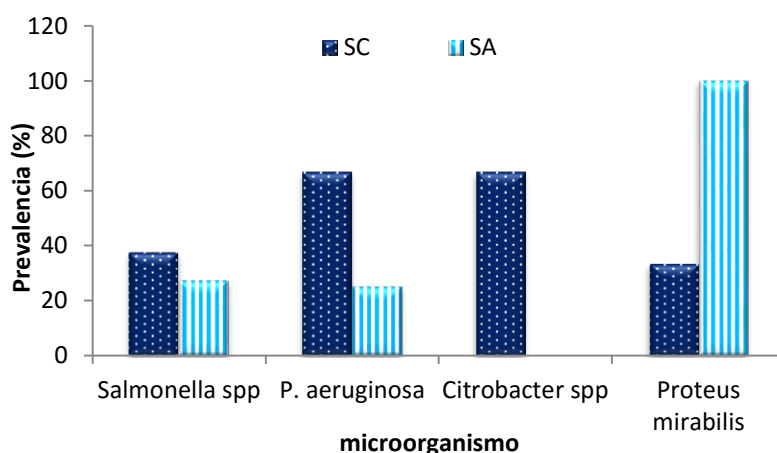


Figura 4. Prevalencia de microorganismos patógenicos en las avícolas del SC y del SA. *P. aeruginosa*, *Citrobacter* spp. y *Proteus mirabilis* fueron analizadas en el último muestreo (n= 3 para SC y n= 4 para SA). *Salmonella* spp fue analizada en los tres muestreos (n= 9 para SC y n= 12 para SA).

Citrobacter y *P. aeruginosa* se encontraron en un alto porcentaje (> 66%) en el guano del SC. En particular, en el guano del SA no se encontró presencia de *Citrobacter* en ninguna de las muestras analizadas. La presencia y la supervivencia a lo largo del tiempo en el guano del SC, podría deberse a las condiciones ambientales dadas en el SC donde se favorece el desarrollo de estos microorganismos aeróbicos.

Proteus mirabilis se encontró en el 100% de las muestras analizadas del guano del SA y en menor proporción, con un 33% en el guano del SC. La *Salmonella* se encontró en el guano de ambos sistemas, con mayor frecuencia en las muestras del SC con un 33% comparado con las muestras del SA con un 25%. Soria et al. (2017) realizaron un estudio sobre diferentes técnicas de detección de *Salmonella* en diferentes muestras de granjas

comerciales de ponedoras en Argentina. La presencia de *Salmonella* fue de un 33% (10/30 granjas) en el total de las muestras de guano analizadas, valores similares a los encontrados en este trabajo.

El almacenamiento del guano por largos períodos y las condiciones ambientales en el establecimiento de un SC pueden favorecer la supervivencia y desarrollo de microorganismos patogénicos como *P. euraginoso*, *Salmonella* y *Citrobacter*. Contrariamente, estos factores y condiciones pueden disminuir la prevalencia de otros microorganismos patogénicos como *Proteus mirabilis*.

El análisis microbiológico realizado en este trabajo muestra solo una tendencia sobre la presencia de los microorganismos patogénicos en el guano y que pueden trasladarse a las aguas, sobrevivir en el suelo y afectar a la salud humana. Es necesario tomar cuidados especiales de higiene para el manipuleo, transporte y manejo de este residuo, para toda persona que esté en contacto con este material. En concordancia con una de las conclusiones del trabajo realizado por Soria et al. (2017), deberían reforzarse las medidas de bioseguridad e higienización en las granjas avícolas de la Argentina para evitar la transmisión de ciertos patógenos zoonóticos como la *Salmonella* que impactan en la salud humana y en la producción.

Los microorganismos patógenos pueden persistir por largos períodos en los estiércoles de animales. Existen estudios que indican que la *Salmonella* spp y la *E. coli* O157 pueden sobrevivir hasta 120 días en el guano de ponedoras y hasta 56 días en estiércol vacuno, respectivamente (Burton and Turner, 2003). Asimismo, estos patógenos son capaces de sobrevivir por largos períodos en el suelo. Un estudio realizado por Hruby et al. (2018) demostró que en parcelas con alta tasa de aplicación de guano, la *Salmonella* spp persistió hasta 42 días después de la aplicación. Islam et al. (2004) evaluaron la supervivencia de la *E. coli* O157:H7 y mostraron que este patógeno persistió 54 y 217 días en suelos cultivados con lechuga y perejil, respectivamente. Varios factores influyen en la supervivencia de los microorganismos tales como la temperatura, tipo de suelo, humedad, disponibilidad de nutrientes, exposición a la radiación UV, como así también depende de las interacciones con las plantas y raíces de las plantas, predadores protozoarios y las comunidades de microorganismos nativos (Burton and Turner, 2003; Hruby et al., 2018). La presencia de microorganismos patogénicos en el sustrato de un proceso anaeróbico puede afectar la calidad del producto digerido y limitar su aplicación como biofertilizante. La *E. coli*, *Proteus mirabilis* y *Salmonella* son facultativas anaeróbicas, consecuentemente podrían sobrevivir bajo las condiciones ambientales de un proceso

anaeróbico. Sin embargo, la digestión anaeróbica a temperaturas mesofílicas y termofílicas favorece la reducción de ciertos microorganismos patogénicos. El tiempo de reducción decimal (llamado valor D) para la *Salmonella* es de unos pocos minutos a temperaturas termofílicas y de unos pocos días a temperaturas mesofílica (Gübitz et al., 2015). Si bien la temperatura es la principal fuente de inactivación de microorganismos patógenos, otros factores ambientales pueden influir fuertemente como ser la competencia de la microbiota y la liberación de nitrógeno amoniacal (Bloem et al., 2017; Martens and Böhm, 2009).

En la Figura 5 se muestra la prevalencia de los parásitos: *Eimeria* spp (como oocitos), ácaros, *Strongyloides* spp (como huevos y larvas) y *Ascaridia* spp/*Heterakis* spp en el guano del SC y SA.

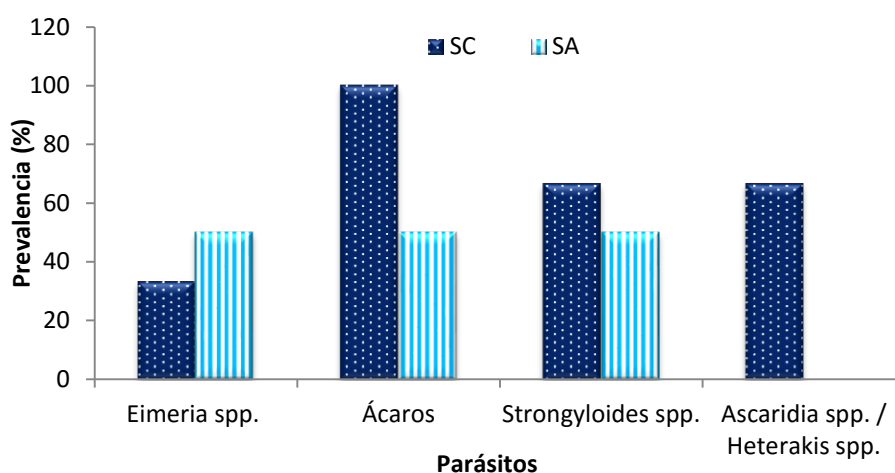


Figura 5. Prevalencia de parásitos en las muestras de guano del SC (n= 3) y SA (n= 4).

Los ácaros, *Strongyloides* spp. (huevos y larvas) y *Ascaridia* spp/*Heterakis* spp, se encontraron con mayor prevalencia en el guano del SC. En particular, no hubo presencia de *Ascaridia* spp/*Heterakis* spp en el total de las muestras analizadas del SA. Las condiciones de menor humedad del guano, el almacenamiento y las condiciones ambientales de los establecimientos en el SC son beneficiosos para la persistencia de exo y endo parásitos como ácaros, *Ascaridia* spp/*Heterakis* spp y huevos de *Strongyloides*. Sin embargo, en el caso de oocitos de *Eimeria* spp hubo una menor prevalencia en el guano SC con respecto al guano fresco del SA.

Los parásitos no pueden persistir ni multiplicarse independientemente del huésped. Sin embargo, los huevos, quistes y oocitos son altamente resistentes a las condiciones ambientales extremas y pueden en algunos casos sobrevivir por varios años fuera del

huésped (Bloem et al., 2017). *Eimeria* spp tiene prevalencia y resistencia alta en el guano de ponedoras y debido a que inducen enfermedades en el animal (coccidiosis), su control es muy importante en las granjas (Burton and Turner, 2003; Cooper et al., 2013). Los helmintos *Ascaridia* y *Heterakis* son peligrosos debido a que también son altamente resistentes, aunque según Strauch (1991) y Burton and Turner (2003), son menos frecuente que *Eimeria* spp. Sin embargo, en este estudio pudo encontrarse una mayor prevalencia de *Ascaridia* y *Heterakis* (67%) que *Eimeria* (33%) en el guano del SC. Según Strauch (1991), la contaminación por parásitos acorde a la prevalencia y sus propiedades innatas de resistencia y supervivencia potenciales, pueden ser modificadas por las condiciones en las que son almacenados. En efecto, en este trabajo se observó que las condiciones de almacenamiento y acumulación del guano es un factor determinante en la frecuencia de aparición, donde en un guano fresco no se observó *Ascaridia* spp/*Heterakis* spp, y *Eimeria* spp. tuvo una frecuencia del 44%. En el guano fresco (SA), la prevalencia de *Eimeria* spp fue mayor que *Ascaridia* spp/*Heterakis* spp.

Si bien no hay riesgo de infección por estos parásitos en humanos, presentan potenciales riesgos de transmisión dentro del establecimiento, donde los pisos, aire, comida y agua pueden ser contaminados y afectar a la salud animal (Mekuria and Bayessa, 2017). Asimismo, los huevos de ciertos parásitos como *Ascaridia galli* pueden actuar como un vector de la *Salmonella* entérica (Eigaard et al., 2006; Thamsborg et al., 1999). Un reciente estudio indicó que la presencia de *Ascaridia* spp y *Heterakis* está vinculada con una alta tasa de mortalidad en los establecimientos de gallinas ponedoras (Hinrichsen et al., 2016).

3.5 Resumen de Resultados y Conclusiones

La comparación entre las características fisicoquímicas, microbiológicas y parasitológicas del guano bajo dos sistemas diferentes de manejo, demostró que:

- El guano del SC presentó menor contenido de humedad, de materia orgánica, carbono y de compuestos nitrogenados como así también mayor contenido de P_T, K_T, Mg_T, Mn_T, Fe_T y el ión SO₄⁻² y valores más altos de pH.
- Hubo una tendencia hacia la mayor presencia de microorganismos patogénicos (*Citrobacter*, *Salmonella* y *P. euraginoso*) y parásitos (ácaros, *Strongyloides* y

Ascaridia spp/Heterakis spp) en el guano del SC. Sin embargo, se requieren mayores estudios, con mayor número de muestras analizadas para determinar si estas prevalencias son significativas.

Estas diferencias fisicoquímicas, microbiológicas y parasitológicas encontradas podrían estar ligadas al tiempo de almacenamiento del guano y a las condiciones ambientales del establecimiento como la humedad, temperatura y sistema de ventilación, entre otros factores. El almacenamiento prolongado del guano y la influencia de las condiciones ambientales en el SC, producen un efecto de concentración/acumulación de ciertos cationes y metales, como así también mayor prevalencia de ciertos microorganismos patogénicos y parásitos. Asimismo, ocurre un proceso de degradación durante el almacenamiento del guano que genera un residuo con menos carbono (menos energía), liberándose gases de efecto invernadero (metano, CO₂, NO_x) al ambiente. Si bien el guano del SA presentó mayor contenido de compuestos nitrogenados, los resultados sugieren que las mejores condiciones para el tratamiento del guano por digestión anaeróbica estarían dadas en el guano fresco, sin almacenamiento.

El guano es un sustrato apropiado para la digestión anaeróbica debido principalmente a su composición rica en materia orgánica, nutrientes esenciales (N, P, K), nutrientes secundarios (Ca, Mg, S) y elementos trazas (Cu, Zn, Fe, Mn) que favorecen el crecimiento y desarrollo de bacterias anaeróbicas. Sin embargo, las altas concentraciones de N-NH₃, Na y Zn, y el pH alcalino podrían resultar limitantes para el desarrollo óptimo del proceso. Además, la presencia de microorganismos patogénicos podría afectar el proceso anaeróbico y generar un producto digerido riesgoso para su utilización por contaminación bacteriana. Especiales controles deberían realizarse para asegurar la higienización de este producto digerido (biofertilizante), ya que ciertos patógenos como *Salmonella*, *E. coli* y *Proteus Mirabilis* son facultativas anaeróbicas y podrían sobrevivir en el ambiente de la digestión anaeróbica.

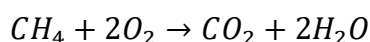
***4. Ensayo de actividad
metanogénica específica:
potencialidades del inóculo***

4.1 Introducción

La digestión anaeróbica es llevada a cabo por diferentes grupos de microorganismos que conducen una secuencia de procesos metabólicos. En esta interacción compleja de los microorganismos anaeróbicos, las metanogénicas son las más sensibles a los cambios ambientales y operacionales del proceso. Por eso, el monitoreo de los microorganismos metanogénicos es importante para determinar la capacidad de la biomasa anaeróbica en el tratamiento de los residuos y efluentes (Souto et al., 2010). La medición de la tasa máxima de producción de metano por la biomasa anaeróbica ha sido una herramienta útil para monitorear la actividad de los microorganismos anaeróbicos, y puede ser cuantificada mediante el ensayo de Actividad Metanogénica Específica (AME). El ensayo AME, mide la máxima capacidad de un lodo (inóculo) para convertir un sustrato de referencia en metano, llevado a cabo bajo condiciones controladas de laboratorio y donde la disponibilidad de sustrato no es un factor limitante (Hussain and Dubey, 2017; Souto et al., 2010). Se calcula como la máxima pendiente de la curva de la producción acumulada de metano en el tiempo:

$$AME \left(\frac{gDQO}{gSSV \cdot d} \right) = \frac{r \left(\frac{gDQO}{d} \right)}{V \times SSV}$$

Donde r es la velocidad de producción de metano ($gDQO/d$), V es el volumen de metano (en L) y SSV es la concentración de lodo ($gSSV/L$). La AME es expresada como $gDQO/gSSV \cdot d$, y generalmente, se estandariza en condiciones normales de presión y temperatura (CNPT, a 1 atm y 273K). La relación estequiométrica de la oxidación del CH_4 está dada por la siguiente ecuación:



Es decir, que 1 mol de CH_4 equivale a 2 moles de O_2 o 64 gramos de DQO. Como un mol de cualquier gas en CNTP ocupa un volumen de 22,4 L, entonces 1 g de DQO equivalen a 0,350 L de metano formado (Hussain and Dubey, 2017).

El ensayo de AME, es ampliamente utilizado como parámetro de control y monitoreo del tratamiento anaeróbico. Además de medir la eficiencia, este ensayo es usado para evaluar la actividad del lodo durante diferentes etapas de operación de un reactor anaeróbico.

Durante la etapa de inoculación y arranque, la medición de la AME permite conocer la evolución del proceso anaeróbico y determinar la máxima carga orgánica posible a ser aplicada. También es utilizado para definir la mínima biomasa que debe ser mantenida dentro del reactor para una determinada carga orgánica (Hussain and Dubey, 2017; Souto et al., 2010).

El monitoreo de la actividad metanogénica es además importante para evaluar el comportamiento del lodo bajo los efectos de potenciales inhibidores o compuestos tóxicos. Un cambio en la actividad del lodo determina una inhibición o acumulación de compuestos orgánicos de baja o nula biodegradabilidad. Varios trabajos se han llevado a cabo para evaluar la inhibición o toxicidad de un lodo por compuestos como oxígeno, nitrógeno amoniacal, detergentes no-iónicos, cloruro de hierro, sulfato y sulfuros, contaminantes orgánicos, entre otros mediante la aplicación de este ensayo (Ozbyram et al., 2015; Souto et al., 2010; Symsaris et al., 2015; Yap et al., 2018).

Otras de las aplicaciones del ensayo de AME incluye la determinación de la composición microbiológica de lodos usando sustratos específicos. Si bien los microorganismos son difíciles de aislar e identificar, el ensayo AME muestra ser una solución práctica para verificar los grupos microbianos bajo condiciones particulares. Varios investigadores han trabajado sobre la identificación de grupos microbiológicos específicos (acidogénicos, acetogénicos, metanogénicos) en función a la utilización de un sustrato en particular (Ozbyram et al., 2015; Regueiro et al., 2012; Tale et al., 2011; Valcke and Verstraete, 2013).

El ensayo de potencial bioquímico metanogénico (PBM) mide la velocidad y el potencial de conversión de compuestos orgánicos (residuos, efluentes) a metano. La realización de este tipo de ensayo requiere de la utilización de una biomasa anaeróbica activa que permita maximizar la biodegradabilidad anaeróbica del sustrato de interés. Por ello, es necesaria la determinación y cuantificación de la AME del inóculo, previamente a la realización del ensayo de PBM. Algunos autores determinan el volumen de inóculo a utilizar en el ensayo de PBM en relación a su actividad, demostrando así la importancia de su cuantificación previa (Angelidaki et al., 2009).

A pesar de que es realmente reconocida la aplicabilidad y la importancia del ensayo de AME, no existe un protocolo estandarizado para su ejecución. La falta de consenso tanto en el procedimiento como en la metodología analítica dificulta la comparación entre los resultados. A continuación, se muestra una revisión bibliográfica de los factores

involucrados, los métodos utilizados y ciertas consideraciones a tener en cuenta, según la comunidad científica internacional, para la determinación de la AME.

1. Tipo y concentración de sustrato

En principio, el sustrato deberá ser aquel que soporte la actividad metabólica de los microorganismos metanogénicos. La mayor parte del metano producido proviene de la metabolización del acetato por las bacterias metanogénicas acetoclásticas (vía acetoclástica). El 30% restante de la formación del metano es producido por los microorganismos hidrogenotróficos (vía hidrogenotrófica) a partir de la reducción del CO₂. Es por ello que, para la realización del ensayo de AME se utilizan comúnmente sales de acetato o ácido acético como fuente de carbono. En este caso, el cálculo de la AME es subestimado, ya que se limita a la formación de metano solo por la vía acetoclástica. Para considerar la formación del metano a través de las dos vías (acetoclástica e hidrogenotrófica), se utiliza una mezcla de ácidos orgánicos volátiles, comúnmente constituida por acetato, propionato y butirato. En este caso, el ensayo evalúa no sólo la actividad de los microorganismos metanogénicos, sino también la capacidad sintrófica del sistema, es decir la actividad de los microorganismos responsables de convertir el propionato y butirato en acetato.

Considerando que los sustratos son complejos en una planta anaeróbica de tratamiento, algunos investigadores consideran más apropiado utilizar glucosa como fuente de carbono. La glucosa es metabolizada por los microorganismos fermentativos (acidogénicos), sintróficos (acetogénicos) y productores de metano (metanogénicos), permitiendo evaluar la actividad del consorcio anaeróbico en su totalidad. Si el ensayo AME realizado con glucosa como sustrato muestra una disminución en la producción de metano, puede realizarse un nuevo ensayo de AME utilizando una mezcla de AGV o acetato, para detectar cuáles son los grupos de microorganismos que están limitando el proceso anaeróbico (Aquino et al., 2007).

En cuanto a la concentración del sustrato, ésta deberá encontrarse en exceso y con los nutrientes necesarios para el desarrollo de los microorganismos. La concentración de referencia que utilizan varios investigadores es 2-2,5 g/L de acetato (Astals et al., 2015; Hussain and Dubey, 2017). En cuanto a los otros sustratos comúnmente utilizados, para la mezcla de AGV se recomienda concentraciones de 2 g/L de ácido acético, 0,5 g/L de ácido propiónico y 0,5 g/L de ácido butírico y para la glucosa una concentración de 1 g/L (Angelidaki et al., 2009).

2. Concentración del inóculo y relación Sustrato/Inóculo (S/I)

La concentración del inóculo debe ser mayor que la concentración de sustrato (en términos de sólidos volátiles), para así cumplir con el modelo cinético de orden cero (Angelidaki et al., 2009; Hussain and Dubey, 2017).

La relación entre el sustrato y el inóculo (S/I) es uno de los parámetros más importantes que afectan los resultados de este ensayo (Angelidaki et al., 2009; Souto et al., 2010). En efecto, para asegurar el máximo valor AME, es recomendable investigar para cada lodo cual es la mejor relación S/I. Souto et al. (2010) mostró en su trabajo que los valores máximos de AME fueron encontrados cuando la relación S/I estuvo entre 0,125 y 0,750 gDQO/gSSV, siendo esta variable de mayor influencia sobre el ensayo AME. Cho et al. (2005) encontró que la mejor relación S/I fue entre 0,3 y 0,6 gDQO/gSSV usando 3 g/L de acetato.

En cuanto a la concentración de inóculo, algunos autores recomiendan un rango óptimo entre 2 y 5 g SSV/L de lodo cuando el ensayo se lleva a cabo en agitación y con acetato como sustrato. Si el ensayo se conduce sin agitación, la concentración de lodo debe ser alrededor de 2 gSSV/L para reducir los problemas de difusión del sustrato (Aquino et al., 2007; Cho et al., 2005; Rocha et al., 2001). En nuestro laboratorio se llevó a cabo un trabajo donde se estudiaron dos relaciones de S/I en un lodo disperso, con concentraciones de 7,6 y 4g SSV/L y utilizando acetato como sustrato. Los resultados mostraron que el valor más alto de AME (0,08 gDQO/gSSV.d) fue obtenido con la relación S/I de 0,5 gDQO/gSSV y con una concentración de 4 gSSV/L (Beily, 2015).

Se han reportado varias concentraciones de inóculos para el desarrollo de este ensayo. Lo importante es conocer la cantidad de biomasa utilizada, para que se pueda calcular y expresar el valor AME como g de DQO por cada gramo de biomasa (en SSV).

Otro aspecto importante que se debe tener en cuenta es el crecimiento de la biomasa durante el ensayo, que interfiere directamente en la determinación del valor de AME, ya que la concentración de SSV se mide al principio y no al final del ensayo. Para minimizar este problema, se deben utilizar concentraciones relativamente altas de lodo y bajas concentraciones de sustrato (baja relación S/I). Una alternativa sería hacer el análisis de SSV tanto al principio y al final del ensayo, y utilizar el valor promedio para calcular la AME. La determinación de los SSV al inicio y al final permitirá identificar si hubo predominante crecimiento de la biomasa durante la prueba.

3. Medio nutritivo

Para asegurar las condiciones óptimas de desarrollo de los microorganismos es necesario el agregado de nutrientes. Aunque no existe una estandarización sobre el medio nutritivo para el desarrollo del ensayo, éste debe contener macronutrientes como N-NH_4^+ , P-PO_3^- , Mg^{2+} y Ca^{2+} , micronutrientes como Fe (II), Mn (II), Ni (II), Co (II), B3 (III), Cu (II), Mo (V) y Zn (II), soluciones *buffer* como los carbonatos y fosfatos y un agente reductor como lo es el sulfuro de sodio. También puede incluirse en el medio nutritivo complejos vitamínicos (biotina, ácido fólico, riboflavina, tiamina, nicotinida) y resarzurina como agente indicador de óxido-reducción. Para determinado tipo de lodos, como los lodos cloacales, puede evitarse la utilización de medio nutritivo, debido a que intrínsecamente estos lodos tienen nutrientes (Aquino et al., 2007).

4. Fase gaseosa (*headspace*)

El volumen de espacio de cabeza, llamado *headspace*, es el espacio en el reactor ocupado por la fase gaseosa. Este parámetro puede influir en la durabilidad del ensayo cuando se utiliza el método manométrico para la determinación del volumen de biogás y metano. Comúnmente se utilizan volúmenes pequeños, entre 10 y 20% para que el desarrollo del ensayo sea corto (3-5 días). Souto et al. (2010) estudió tres diferentes *headspace*: 10%, 30% y 50%, y observó que la fase “*lag*” (o período de aclimatación del lodo) fue menor cuando el volumen de la fase líquida fue mayor (10% de *headspace*). Si bien el volumen de la fase gaseosa no debería interferir en el valor de la AME, ya que se calcula por unidad de biomasa en el reactor (gSSV), este investigador encontró una mayor AME cuando el *headspace* fue menor. Esto probablemente esté asociado a una mayor cantidad de biomasa agregada al sistema, aumentando la representatividad del lodo y producción de metano y reduciendo así los errores asociados a su cuantificación.

Por otro lado, es importante ajustar esta variable principalmente cuando se utiliza el método manométrico, debido a que si la presión generada por el biogás en el *headspace* es alta, puede haber una alta solubilidad del metano en el líquido y subestimarse así la producción de metano en el ensayo de AME (Hartley and Lant, 2006).

5. Pre-aclimatación del lodo

El lodo debe ser “desgasificado”, pre-incubándolo a la misma temperatura que se realizará el ensayo y con el medio nutritivo. Esto permite eliminar la materia orgánica biodegradable residual que pudiera existir en el lodo. La desgasificación debe realizarse hasta que la producción de metano no sea significativa. Generalmente, esto ocurre entre 2 a 5 días de incubación. Para lodos que son alimentados con alta concentración de grasas

y aceites, puede requerirse períodos más prolongados de incubación para eliminar la DQO residual (Angelidaki et al., 2009).

6. Blanco

En el desarrollo de este ensayo es común incluir un blanco para evaluar la producción de metano residual debido al decaimiento endógeno (Aquino et al., 2007). El blanco consiste en exponer al inóculo sin el agregado de sustrato bajo las mismas condiciones que se desarrollará el ensayo. La producción de metano generada en la fase endógena deber ser restada de la producción de metano generada por el inóculo con el sustrato. Sin embargo, la fase endógena generada por el inóculo con el sustrato es mucho menor a la generada por el blanco. La actividad metabólica del blanco (inóculo sin alimentación) puede ser muy distinta a aquella generada en el inóculo con sustrato. Esto genera cierta incertidumbre si es correcto suponer que esta fase del blanco es igual a la del inóculo con sustrato. La fase endógena puede eliminarse realizando la pre-incubación del lodo hasta el cese de la producción de metano (Aquino et al., 2007).

7. Mezclado y temperatura

El mezclado facilita el contacto entre los microorganismos y el sustrato, previniendo así la acumulación de metabolitos intermedios en el medio (como los son los AGV) y garantizando las condiciones de homogeneidad en el sistema. La agitación puede realizarse en forma continua o intermitente, y según el tipo de sistema de agitación utilizado puede ser manual, orbital o axial. Souto et al. (2010) estudiaron la influencia del tipo de agitación y demostró que la agitación manual intermitente tuvo similares rendimientos (AME) comparado con el mezclado orbital continuo, y que la agitación axial debería ser evitada cuando se utilizan volúmenes pequeños de frascos para evitar la ruptura de los agregados microbianos (flóculos). En cuanto a la intensidad de mezclado, cuando ésta es baja se puede limitar la transferencia de masa y cuando es alta puede romper los agregados microbianos, reflejándose en una disminución del valor de la AME. Comúnmente, se utiliza una velocidad rotacional de 200 rpm para el desarrollo de este ensayo. Souto et al. (2010) no encontraron diferencias entre los valores AME cuando se utilizaron las velocidades de rotación de 200 rpm y 360 rpm para las agitaciones en sistema orbital y manual. Sin embargo, los valores de AME fueron más bajos cuando la agitación fue axial y a 360 rpm. Cho et al. (2005) evaluó la intensidad de mezclado a 100 rpm, 200 rpm, 400 rpm y 700 rpm. Los resultados mostraron que a 100 y 200 rpm el lodo granular no se vio afectado, pero a 400 y 700 rpm los valores de AME fueron menores, debido probablemente a un deterioro en los flóculos.

Con respecto a la temperatura, comúnmente el ensayo AME se realiza a 30-35°C, debido a que el desarrollo de los microorganismos metanogénicos se ve favorecido bajo condiciones mesofílicas. Kayranli and Ugurlu (2012) estudiaron la influencia de la temperatura en la AME. En su trabajo mostraron que la AME y la remoción de sustrato decrecen cuanto menor es la temperatura. Souto et al. (2010), también estudiaron la influencia de la temperatura en el desarrollo del ensayo AME, y demostraron que a mayores temperaturas el período de aclimatación (fase “lag”) es más corto. A 35°C la producción de metano fue inmediata, mientras que a 30°C y 20°C, la fase lag fue de 1 y 3 días, respectivamente.

8. Método de medición del biogás y metano

La bibliografía reporta diferentes metodologías e instrumentos que permiten cuantificar el volumen de metano y biogás generado para el desarrollo de este ensayo. En general, según la forma de medición, pueden clasificarse en métodos manométricos o volumétricos. La elección del método define el diseño del sistema de reactor a utilizar.

El método manométrico se basa en la medición de la presión ejercida por el volumen de biogás acumulado en el *headspace* del reactor. La medición de la presión se realiza acoplado al reactor a un sensor (membrana transductora de presión) que detecta la presión ejercida y la traduce en unidades de presión (bar, atm). Dependiendo del sistema de reactor, la presión medida puede ser debida a la mezcla de gases (biogás) o debida solamente al metano.

El registro diario de la presión medida por el transductor de presión, permite determinar la tasa diaria de producción de metano o biogás. Debe considerarse que el valor de la AME requiere la medición del metano y por lo tanto demanda un análisis cromatográfico posterior a la medición de presión generada por el biogás para cuantificar el volumen de metano. Una vez medida la presión, se toma una muestra gaseosa y se inyecta en el cromatógrafo gaseoso con detector FID o TCD. El volumen de metano producido es obtenido multiplicando el volumen contenido en el *headspace* por el % de CH₄ determinado por cromatografía gaseosa.

Algunos sistemas de reactores, acoplan en el *headspace* un sistema adsorbedor de CO₂, el cual utiliza una base como ser NaOH o LiOH en estado sólido (perlas, polvo). De esta forma, la presión medida por el transductor de presión representa el volumen de metano acumulado en el *headspace* del reactor. Este procedimiento asume que el CO₂ y el CH₄ son los principales constituyentes del biogás formado durante el ensayo de AME (Aquino et al., 2007).

El método manométrico tiene como ventaja que el medidor de presión puede acoplarse a una computadora y monitorear el proceso instantáneamente. Si bien esto permite la automatización del proceso, la adquisición de estos equipos automáticos y su mantenimiento son costosos (Aquino et al., 2007). En el mercado son conocidos como respirómetros, siendo el Oxitop® uno de ellos.

El método volumétrico comúnmente utilizado es la medición del volumen de biogás o metano por desplazamiento. La medición del volumen y composición del biogás puede realizarse conectando al reactor una jeringa (que no ofrezca resistencia al desplazamiento). La medida del desplazamiento del émbolo de la jeringa es igual al volumen de biogás generado en el *headspace* del reactor. El volumen recolectado en la jeringa, se analiza cromatográficamente para la determinación del metano (Aquino et al., 2007).

Una forma más directa para medir el volumen de metano es haciendo “lavar” el biogás por una solución de álcali (NaOH al 15-30%) para que adsorba el contenido de CO₂. La medición del volumen de metano (obtenido luego de pasar el biogás por una solución de álcali) puede determinarse por dos formas:

- El uso de una jeringa, donde el desplazamiento del émbolo de la jeringa es igual al volumen de metano. Al momento de la medición, se conecta al frasco de NaOH una aguja de la jeringa (esmerilada), causando la despresurización del sistema. Como el gas entra en el frasco de NaOH por debajo del nivel de la solución, se garantiza que el gas medido en la jeringa esmerilada sea predominantemente metano.
- El uso de frasco Mariotte, donde el volumen de solución álcali desplazada por el biogás lavado es igual al volumen de metano. En este caso la despresurización del sistema ocurre por desplazamiento de la solución álcali.

Si bien existen diferentes configuraciones de equipos, en la Figura 1 se muestra el sistema comúnmente utilizado mediante las dos formas de medir el volumen de metano.

Los primeros trabajos del ensayo AME utilizan este principio (método de desplazamiento) para la medición del metano (James et al., 1990; Owen et al., 1979).

Esta técnica sencilla y de bajo costo para su implementación en el laboratorio, presenta la ventaja de evitar el uso de un cromatógrafo de gases. Sin embargo, la desventaja que presenta es que existe posibilidad de fugas del biogás mediante el sistema de conexión y medición (aguja, mangueras). Debe considerarse el uso de jeringas esmeriladas y

mangueras impermeables para gases a fin de asegurar la hermeticidad del sistema y las condiciones anaeróbicas.

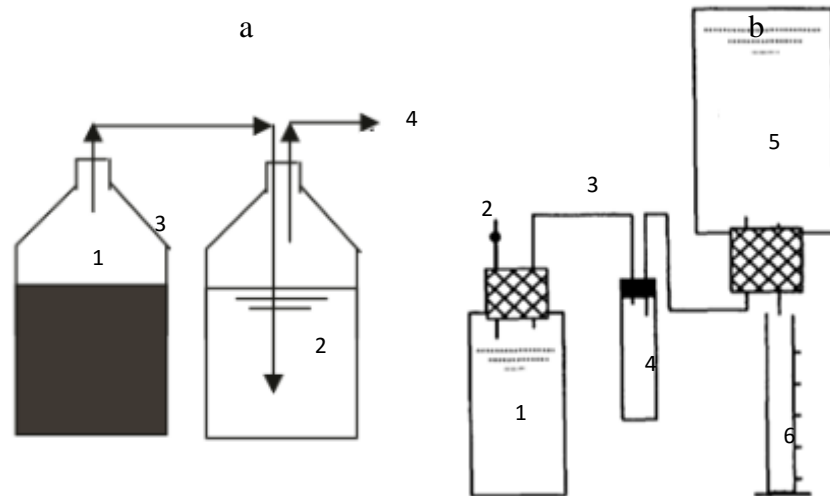


Figura 1. Medición del volumen de biogás y metano por el método volumétrico. **a)** mediante el uso de jeringa. Referencias: 1= reactor, 2= frasco con solución alcalina; 3= circulación del biogás; 4= medición del gas metano con una jeringa. **b)** mediante el uso de frasco Mariotte. Referencias: 1= reactor, 2= punto de muestreo; 3= circulación del biogás; 4= frasco de seguridad; 5= frasco Mariotte; 6= Probeta graduada.

9. Interpretación de los datos

El volumen de metano medido en el tiempo, es graficado como volumen acumulado de metano en función del tiempo de incubación. La mayoría de los investigadores, finalizan el ensayo cuando la producción acumulada de metano sale de la fase exponencial y entra en la fase estacionaria. En este caso hay que verificar si la producción acumulada de metano al final de la fase exponencial alcanzó el mínimo del 50% de la producción teórica.

Resumen y comentarios generales

El ensayo de AME es una de las herramientas más utilizadas como control de plantas de biogás, ya que permite determinar de una forma relativamente sencilla y rápida la actividad de las bacterias anaeróbicas. Los distintos protocolos varían en las condiciones y los procedimientos adoptados (tipo y concentración de sustrato, velocidad y tipo de agitación, temperatura, concentración de lodo, relación sustrato/inóculo, tipo y concentración de nutrientes) y la metodología utilizada para cuantificar el biogás y el metano producido (método volumétrico, método manométrico, por cromatografía gaseosa, por sensor). Debido a que no existe un protocolo estandarizado, será necesario generar la metodología de trabajo para la determinación de la AME en esta tesis, fijando las variables en relación a los antecedentes científicos y generando un modelo de reactores

que aseguren la hermeticidad del sistema, la reproducibilidad y fiabilidad de los resultados.

4.2 Objetivo

En relación a lo expuesto, se plantea en este capítulo de la tesis el siguiente objetivo específico:

2- Diseñar equipamiento, ajustar y adaptar la metodología del ensayo de Actividad Metanogénica Específica (AME) para su implementación como una herramienta de diagnóstico del proceso anaeróbico, evaluando la actividad de las bacterias metanogénicas en inóculos de diferentes orígenes

4.3 Materiales y Métodos

Diseño de los reactores

Se diseñó primeramente un sistema que permitiera medir el biogás y metano por el método de desplazamiento, metodología ampliamente utilizada para el desarrollo de este ensayo.

Cada reactor fue conectado a una botella invertida que contenía una solución alcalina (NaOH al 40%). El volumen desplazado fue recolectado por una probeta graduada. Como sistema de calefacción se utilizó un baño termostatzado con resistencias eléctricas a 35°C. La agitación se realizó con un agitador orbital, a 100 rpm durante 30 minutos dos veces al día.

Este método no resultó seguro, ya que hubo poca reproducibilidad en los resultados y en algunos casos se observó retroceso del líquido. Al tener varias conexiones existe alta probabilidad de fugas (Figura 2).



Figura 2. Primer diseño de sistema de reactores. a) botella con solución alcalina; b) trampa de agua; c) probeta para recolección del volumen desplazado; d) baño termostático e) agitador.

Se diseñó un segundo modelo de reactor, considerando el método manométrico para la determinación del volumen de biogás y el análisis cromatográfico para la determinación del CH_4 .

Se adaptó el diseño de reactor realizado por el grupo BIOPROA, de la Facultad de Ingeniería, Universidad de la República del Uruguay (Uruguay), el cual utiliza una llave de tres vías, que es conectada en el centro de la tapa del reactor mediante el uso de una jeringa (Figura 3).



Figura 3. Segundo diseño de reactores. Método manométrico-llave de tres vías.

La apertura de una de las salidas de la llave de tres vías, permite medir el volumen de biogás mediante la conexión con un transductor de presión. La otra salida contiene un septum en el extremo superior, permitiendo tomar la muestra del gas con una jeringa. El volumen de gas muestreado se inyecta en el cromatógrafo de gases para la cuantificación del CH_4 producido.

En busca de mejorar este sistema de reactor, y bajo el concepto de minimizar conexiones, asegurar la hermeticidad del sistema durante todo el ensayo, encontrar un diseño de fácil aplicación y conexión directa al cromatógrafo de gases, se diseñó un tercer modelo de sistema de reactor que es el finalmente utilizado en los ensayos de AME.

Este tercer modelo de reactor fue construido con botella de vidrio borosilicato transparente (Marca schott Duran) que contiene inercia química entre el medio y el vidrio, de 560 mL de capacidad y resistente a altas temperaturas (hasta 135 °C) y presiones (hasta 1,5 bar). La originalidad de este modelo de reactor, es el diseño de la tapa y la válvula de salida para la medición del gas. Cada tapa de reactor fue construida con material polipropileno, con un *o-ring* interno para favorecer el cierre hermético. La tapa posee en el centro una llave de acero inoxidable con válvula esférica de ¼ pulgadas, acoplada a un conector neumático con *o-ring* interno. La cuantificación del biogás se realiza conectando una manguera neumática del mismo diámetro a un transductor de presión y conectando el otro extremo de la manguera al conector neumático ubicado en el centro de la tapa del reactor. La válvula se abre y el biogás acumulado en el *headspace* es medido mediante el transductor de presión. Se cierra la válvula para conservar el biogás acumulado en el *headspace* y determinar posteriormente su composición por cromatografía gaseosa (Figura 4). Luego de la medición, el reactor es despresurizado hasta alcanzar la presión atmosférica en su interior, se cierra la válvula y el reactor queda listo para la próxima medición.

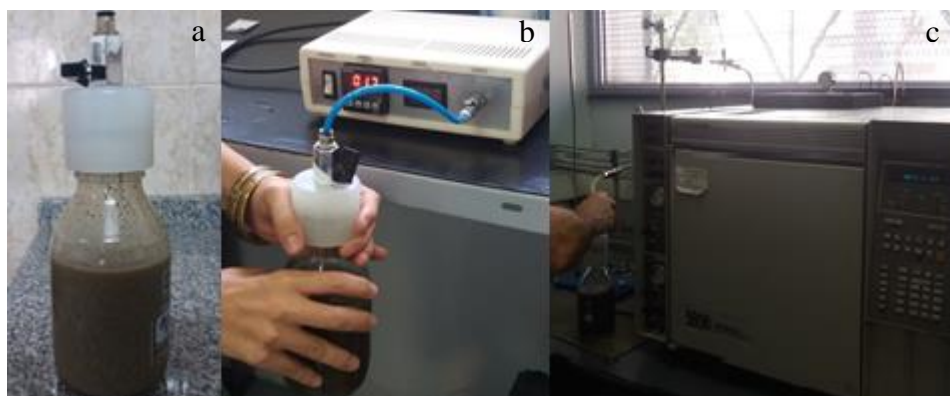


Figura 4. Sistema de reactor utilizado para los ensayos de AME; a) Reactor con tapa rotomoldeada de polipropileno y llave esférica; b) apertura de la válvula y medición del biogás por transductor de presión; c) medición del CH₄ por cromatografía, utilizando muestreador de gases.

Para trabajar en condiciones mesofílicas, se utilizó como sistema de calefacción un baño termostático. El calentamiento del agua fue logrado utilizando dos resistencias eléctricas de 300 W y reguladas a 35°C. En cuanto al mezclado no fue posible incluir

ningún sistema de mezclado mecánico. La agitación se realizó manual, durante 1 minuto dos veces al día. En la Figura 5, se muestra un esquema del sistema de reactores utilizado en los ensayos de AME.

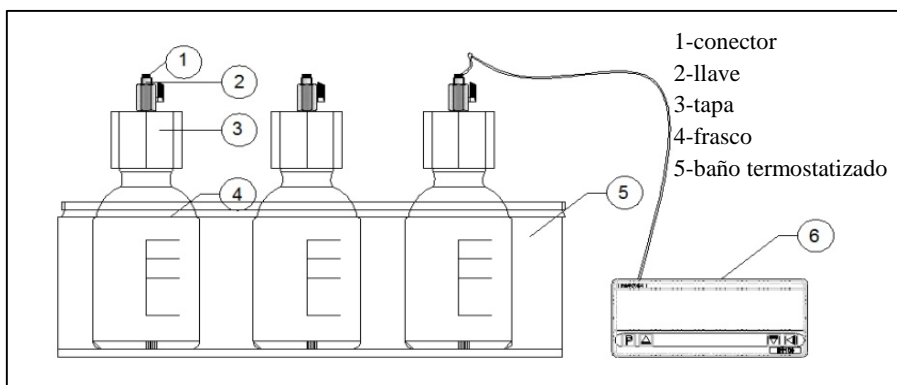


Figura 5. Esquema del sistema de reactor utilizado para los ensayos de AME.

Procedimiento y condiciones del ensayo

Como se mencionó en la sección introducción, no existe un protocolo estandarizado para este tipo de ensayo. Es por ello que las variables fueron ajustadas considerando lo reportado en la bibliografía y los conocimientos adquiridos en la capacitación realizada sobre este tipo de ensayo en la Facultad de Ingeniería de la Universidad de la República del Uruguay- grupo BIOPROA (Uruguay). En la Tabla 1 se resumen las condiciones generales del ensayo y en la Tabla 2 el medio nutritivo utilizado, compuesto por 4 soluciones de macronutrientes y una solución de micronutrientes.

Tabla 1. Condiciones generales del ensayo AME

Parámetros	Valor
Tipo y concentración de sustrato	Acetato de sodio, 2 gDQO/L
Concentración de inóculo y relación S/I	4 gSSV/L, S/I= 0,5 gDQO/gSSV
Medio nutritivo	Si (ver Tabla 2)
V total del reactor	560 mL
V efectivo	448 mL
Headspace	20%; V= 112 mL
Pre-aclimatación del lodo	Previamente al ensayo, las muestras de lodo fueron incubadas a 35°C en un reactor de 2 L, con la llave abierta, durante 4 días.
Blanco	Sin el agregado de acetato, por duplicado
Mezclado y temperatura	Agitación manual durante 1 minuto 2 veces al día; temperatura a 35°C

Tabla 2. Solución stock de macro y micronutrientes

Macro-nutrientes	Concentración (g/L)	Micro-nutrientes	Concentración (g/L)
Sc 1= NH ₄ Cl	17	FeCl ₂ . 4H ₂ O	2,0
Sc 2= K ₂ HPO ₄	3,70	H ₃ BO ₃	0,05
Sc 3= MgSO ₄	0,56	ZnSO ₄ .H ₂ O	0,07
Sc4= CaCl ₂ .2H ₂ O	0,80	CuCl ₂ .2H ₂ O	0,04
		MnCl ₂ .4H ₂ O	0,05
		(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂ .4H ₂ O	0,05
		CoCl ₂ .6H ₂ O	0,05
		NiCl ₂ . 6H ₂ O	0,09
		EDTA	0,50
		HCl 36%	1 mL/L
		Na ₂ SeO ₃	0,07
		Resazurina	0,50

Se calculó el volumen necesario de medio nutritivo para diluir el lodo hasta alcanzar 4 gSSV/L. El medio nutritivo se preparó con 10 mL de cada solución de macronutrientes (Sc1, Sc2, Sc3 y Sc4) y 1 mL de solución de micronutrientes por cada L de solución.

El volumen de lodo y de acetato de sodio se ajustaron a pH 7 con solución NaOH 6 N o solución 0,5 N HCl, según corresponda. Se agregó el volumen de lodo neutralizado a cada reactor y luego se agregó un volumen de solución de acetato de sodio (57 mL) de tal manera de obtener una concentración de 2gDQO/L dentro del reactor (solución madre de 20 g/L= 15,6 gDQO/L).

Se registró el pH final de cada sistema (el lodo con el agregado de acetato) y se cerró inmediatamente. Luego, se barrió el O₂ presente en el reactor con una corriente de gas N₂ (25 psi de salida) hasta alcanzar una presión manométrica de 1 bar en su interior (es decir 1 bar por encima de la presión atmosférica). El reactor presurizado fue sumergido en agua para comprobar la ausencia de pérdidas de gas. Asegurada la hermeticidad, se despresuriza hasta presión atmosférica y se repitió 3 veces este procedimiento. Cada sistema se realizó por triplicado y el blanco por duplicado, bajo las mismas condiciones que el sistema.

Lodos

Se recolectaron muestras de lodos provenientes de reactores anaeróbicos en funcionamiento continuo, alimentados con distintos sustratos: residuos cítricos (RC), efluentes de cerdo co-digerido con forraje de sorgo y trigo (PF), guano de aves ponedoras (G1 y G2), efluentes lácteos (IL) y efluentes cerveceros (PC1, PC2 y PC3). Las muestras

de lodos fueron caracterizadas inicialmente y luego almacenadas a 4°C hasta su uso. En la Tabla 3 se detalla una descripción del sitio de muestreo del lodo.

Tabla 3. Características del sitio de muestreo de los lodos

LODO RC	
Tipo de sustrato	Residuos cítricos (RC)
Descripción del sistema de tratamiento	Dos lagunas anaeróbicas cubiertas, con recuperación y valorización del biogás, y sistema de tratamiento del digerido por 8 lagunas aerobias.
Ubicación	Citrícola en Pcia. de Tucumán
Punto de muestreo del lodo	Primera laguna anaeróbica
Dimensionamiento del reactor	Escala Industrial; volumen del reactor de 40000 m ³
T de trabajo (°C)	Temperatura ambiente (T anual media= 19°C)
LODO PF	
Tipo de sustrato	Efluente porcino, co-digerido con residuos de forrajes (PF) de sorgo y maíz (relación 3:1)
Descripción del sistema de tratamiento	Planta anaeróbica con cuatro reactores de tipo mezcla completa, dos primarios de 3600 m ³ y dos secundarios de 2900 m ³ para el tratamiento de efluentes porcinos (establecimiento de 1500 madres), con recuperación y valorización del biogás
Ubicación	San Luis
Punto de muestreo del lodo	2do reactor secundario
Dimensionamiento del reactor/planta	Escala Industrial
T de trabajo (°C)	35
LODO G1	
Tipo de sustrato	Guano de aves ponedoras (G)
Descripción del sistema de tratamiento	Reactor anaeróbico piloto de 20 L de capacidad, tipo mezcla completa, con agitación manual mecánica (2 veces x día); alimentación 3 veces al día
Ubicación	INTA-IMYZA-Lab de transformación de residuos, Castelar, Pcia. De Buenos Aires
Punto de muestreo del lodo	Salida del reactor, tomando la muestra en agitación
Dimensionamiento del reactor	Escala piloto
T de trabajo (°C)	35
LODO G2	
Tipo de sustrato	Guano de aves ponedoras (G)
Descripción del sistema de tratamiento	Reactor anaeróbico piloto de 25 L, tipo mezcla completa con sistema de agitación

	automático a 100 rpm (30 min cada 2h); alimentación 3 veces al día
Ubicación	INTA-IMYZA-Lab de transformación de residuos, Castelar, Pcia. De Buenos Aires
Punto de muestreo del lodo	Salida del reactor, tomando la muestra en agitación
Dimensionamiento del reactor	Escala piloto
T de trabajo (°C)	35
LODO IL	
Tipo de sustrato	Efluente de la industria láctea (IL)
Descripción del sistema de tratamiento	Sistema de lagunas en serie, 3 anaeróbicas y 3 facultativas
Ubicación	General Rodriguez, Pcia. De Buenos Aires.
Punto de muestreo del lodo	Primera laguna anaeróbica, con muestreador de lodos.
Dimensionamiento del reactor	Escala industrial
T de trabajo (°C)	Temperatura ambiente (T anual media= 16°C)
LODO PC1	
Tipo de sustrato	Efluentes de la producción de cerveza (PC)
Descripción del sistema de tratamiento	Tres reactores anaeróbicos, de tipo IC ("Internal Circulation") para el tratamiento de los efluentes cerveceros
Ubicación	Zárate, Pcia. de Buenos Aires
Punto de muestreo del lodo	Primer reactor IC
Dimensionamiento del reactor	Escala industrial
T de trabajo (°C)	35
LODO PC2	
Tipo de sustrato	Efluentes de la producción de cerveza (PC)
Descripción del sistema de tratamiento	Tres reactores anaeróbicos, de tipo IC ("Internal Circulation") para el tratamiento de los efluentes cerveceros
Ubicación	Zárate, Pcia. de Buenos Aires
Punto de muestreo del lodo	Segundo reactor IC
Dimensionamiento del reactor	Escala industrial
T de trabajo (°C)	35
LODO PC3	
Tipo de sustrato	Efluente de la producción de cerveza (PC)
Descripción del sistema de tratamiento	Un reactor tipo UASB de 1200 m ³ para el tratamiento de los efluentes cerveceros
Ubicación	Pcia. de Santa Fé
Punto de muestreo del lodo	Toma de muestra del reactor UASB
Dimensionamiento del reactor	Escala industrial
T de trabajo (°C)	35

Determinaciones analíticas

Se analizaron las variables pH, SST, SSV y carbono orgánico total (TOC), según métodos descritos en el capítulo 1 “métodos analíticos” de esta tesis, en los lodos y en las muestras iniciales y finales de cada sistema. Para la determinación del TOC se filtró la muestra con membrana de nitrocelulosa 0,45 μm . Se utilizó el equipo analizador Shimadzu (modelo TOC-L), el cual se basa en la oxidación catalítica a 680 °C donde todo el carbono orgánico presente en la muestra se oxida a CO_2 . Este CO_2 es medido mediante un detector de infrarrojos no dispersivo (NDIR). La muestra se acidifica previamente en el equipo con ácido clorhídrico y se burbujea aire analítico libre de CO_2 para eliminar el carbono inorgánico.

El volumen de biogás se determinó mediante la presión generada en el *headspace* del reactor, utilizándose un transductor de presión (0-2,5 bares). La determinación del CH_4 y CO_2 se realizó por cromatografía gaseosa, según metodología descrita en el capítulo “métodos analíticos de esta tesis. Una vez medido el volumen de biogás y CH_4 , el reactor es despresurizado hasta alcanzar la presión atmosférica, quedando listo para una próxima acumulación de biogás y metano en el *headspace*.

El análisis estadístico fue realizado por el programa INFOSTAT Versión 2014. Los valores de la AME fueron comparados entre los diferentes lodos mediante el test ANOVA de una vía ordinaria, utilizando el *test* de Tuckey. Cuando no fue satisfactoria la normalidad y homocedácea se utilizó el test no paramétrico Kruskal-Wallis. Los promedios de las variables al inicio y al final para cada lodo fueron analizados por el t-test y por el test no paramétrico Mann-Whitney, cuando no cumplían los supuestos de normalidad y homocedácea. Se consideró un nivel de significancia del 5% en todos los casos (nivel de confianza del 95%). Se calculó, el coeficiente de varianza y desvío estándar en los valores de AME para cada lodo.

Cálculos

El gas en el *headspace* es básicamente ocupado por tres gases: N_2 , CO_2 y CH_4 . El nitrógeno es el resultado del barrido para garantizar una atmósfera anaeróbica, mientras que el resto de los gases (CO_2 , CH_4) representan la degradación anaeróbica del sustrato. Por lo tanto, la diferencia de presión es el volumen de biogás generado, donde el contenido de N_2 queda excluido de los cálculos. El volumen de biogás ($V_{\text{biogás}}$) fue calculado acorde a la Ley de los Gases Ideales y corregido a condiciones estándares de presión y temperatura (CNPT a 273 K y 1 atm) mediante la siguiente fórmula:

$$V_{\text{biogas}}(\text{mL}) = \frac{(P_{CE} + P_m) \times V_h \times T_{CE}}{P_{CE} \times (273 + T_i)}$$

Dónde:

P_{CE} = presión en condiciones estándares (1,013 bar)

P_m = presión medida por el transductor (bar)

V_h = volumen en el *headspace* (mL)

T_i = temperatura de incubación (°C)

T_{CE} = temperatura en condiciones estándares (K)

El volumen de CH₄ producido (V_{CH_4}), se calculó multiplicando el volumen de biogás por el % de CH₄ obtenido por cromatografía gaseosa y normalizado.

La AME de cada lodo, se calculó mediante la siguiente fórmula:

$$AME \left(\frac{\text{gDQO}}{\text{gSSV} \cdot \text{d}} \right) = \frac{r \left(\frac{\text{gDQO}}{\text{d}} \right)}{V \times \text{SSV}}$$

Dónde:

r = la máxima pendiente de la curva de producción acumulada de metano en el tiempo y representa la velocidad de producción de metano por día (mLCH₄/d). Para expresarla en gDQO/d, debe dividirse la velocidad (mLCH₄/d) por 350 (considerando que 1gDQO= 350 mL de CH₄, en CNPT)

V = volumen efectivo del reactor (mL)

SSV = biomasa agregada al inicio del ensayo (gSSV)

4.4 Resultados y Discusión

La caracterización fisicoquímica de los ocho lodos que se utilizaron para el ensayo se muestra en la Tabla 4.

En general, los lodos presentaron valores básicos de pH, exceptuando los lodos de cervecería PC2 y PC3, con valores neutros. El rango óptimo para las metanogénicas oscila entre 6,5 y 8,2 (Jun et al., 2009; Tabatabaei and Ghanavati, 2018). Por ello, fue necesario ajustar el pH a neutro en los lodos al inicio del ensayo para favorecer la actividad y desarrollo de las metanogénicas, generando las condiciones óptimas y controladas en el ensayo.

La concentración de SSV representa la biomasa en el lodo. Pudo observarse una alta variabilidad de la concentración de biomasa entre los distintos lodos. Estas diferencias podrían deberse a que los lodos provienen de distintos tipos de sistemas anaeróbicos

(lagunas, UASB, reactores de mezcla completa) y de diferente naturaleza u origen, donde las condiciones de operación y las materias primas pueden influir en la formación y características de la biomasa.

Tabla 4. Caracterización fisicoquímica de los lodos (promedio \pm desvío estándar)

Lodo	Sustrato	pH	SSV (g/L)	TOC (mg/L)
RC	Residuos cítricos	6,9 \pm 0,1	23,4 \pm 0,5	1100 \pm 120
PF	E. porcino y forraje	7,9 \pm 0,0	10,5 \pm 0,7	409,4 \pm 0,5
G1	Guano	8,3 \pm 0,0	15,9 \pm 0,7	275,9 \pm 0,4
G2	Guano	7,5 \pm 0,0	8,6 \pm 0,3	698,9 \pm 14,4
IL	E. lácteo	7,7 \pm 0,0	8,5 \pm 0,5	53,3 \pm 0,0
PC1	E. cervecero	7,8 \pm 0,1	57,9 \pm 1,8	1017
PC2	E. cervecero	7,0 \pm 0,0	49,1 \pm 0,8	243,4
PC3	E. cervecero	7,1 \pm 0,0	46,6 \pm 4,4	287,6

Referencias. RC: residuos cítricos; PF: efluente porcino+forraje; G1 y G2: guano de dos reactores diferentes; IL: efluente de la industria láctea; PC1, PC2 y PC3: Efluente de la producción de cerveza de diferentes reactores.

La mayor concentración de SSV fue observada en los lodos de la producción cervecera (PC). La formación de gránulos compactos en los lodos de tipo granular, es capaz de concentrar mayor cantidad de biomasa (Lettinga et al., 1983; Liu et al., 2009; Regueiro et al., 2012). Los lodos provenientes de lagunas anaeróbicas y alimentado con sustratos orgánicos complejos (IL, G1 y G2) presentaron la menor concentración de biomasa.

Al final del ensayo se determinaron las variables pH, concentración de SSV y el porcentaje de remoción de TOC (%R TOC) en todos los sistemas evaluados. Los resultados son mostrados en la Tabla 5.

Tabla 5. Remoción del TOC (%R), pH y concentración de SSV obtenidos en cada sistema al final del ensayo (promedio \pm desvío estándar).

	pH	SSV (g/L)	TOC (% R)
RC	7,4 \pm 0,1	4,49 \pm 0,12	77,4
PF	7,4 \pm 0,0	2,99 \pm 0,23	61,8
IL	7,8 \pm 0,1	4,1 \pm 0,24	91,5
G1	7,4 \pm 0,1	4,12 \pm 0,24	89,0
PC1	7,7 \pm 0,0	5,02 \pm 2,41	93,3
PC2	7,9 \pm 0,1	4,60 \pm 1,42	94,9
PC3	7,8 \pm 0,0	5,21 \pm 0,74	94,5
G2	7,7 \pm 0,0	1,47 \pm 0,20	52,7

Referencias. RC: residuos cítricos; PF: efluente porcino + forraje; G1 y G2: guano de dos reactores diferentes; IL: efluente de la industria láctea; PC1, PC2 y PC3: Efluente de la producción de cerveza de diferentes reactores.

En cuanto al pH, ninguno de los sistemas evaluados mostró valores de pH ácidos, indicando que no hubo acidificación durante el desarrollo del proceso. Contrariamente, el pH se incrementó con respecto al valor inicial (pH neutro) en todos los casos. La tendencia es que el pH se incremente debido al proceso degradativo anaeróbico, donde el ácido es consumido y las bacterias metanogénicas forman los *buffers* carbonato/bicarbonatos, y amoníaco/amonio (Al Seadi et al., 2013; Bernal, et al., 2016). La concentración inicial de SSV en todos los sistemas evaluados fue de 4 gSSV/L, siendo el valor promedio experimental de $3,85 \pm 1,10$ gSSV/L. Los valores de SSV no mostraron diferencias significativas entre el inicio y el final del ensayo para todos los sistemas evaluados, con excepción de G2. Este último, mostró diferencias significativas ($p < 0,05$) entre el inicio y el final del ensayo ($3,97 \pm 0,14$ gSSV/L Vs $1,47 \pm 0,20$ gSSV/L). Esta caída de los SSV reflejó una disminución de la biomasa, mostrando el comienzo de la fase endogénica. James et al. (1990), también observó una leve disminución de la biomasa en sus 5 experiencias realizadas de AME.

La conversión de la materia orgánica en CH_4 se reflejó en la disminución del TOC al final del ensayo. Los mayores % R de TOC fueron observados en los sistemas con lodos de cervecería (PC1, PC2 y PC3), obteniéndose valores superiores al 93%. La elevada degradación del sustrato evidenció una alta actividad de estos lodos.

En la Figura 6 a se muestra la curva de producción de metano acumulada para los distintos sistemas y en la figura 6 b la AME obtenida para los diferentes lodos.

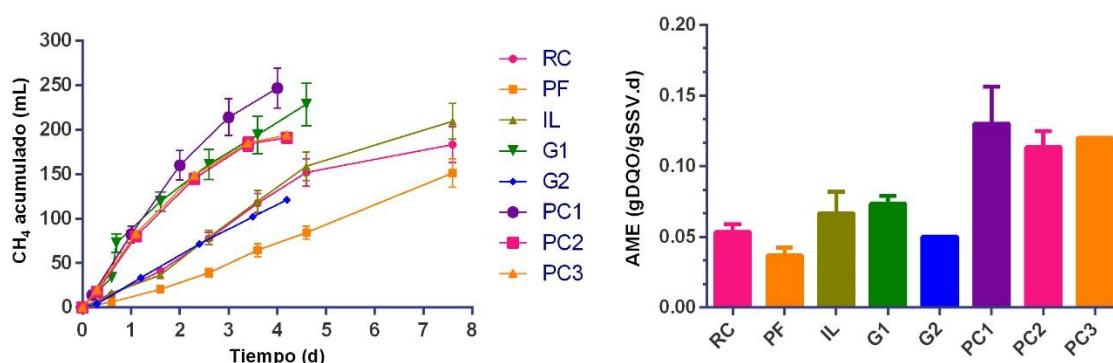


Figura 6. Producción de metano y la AME en los 8 lodos evaluados. a) Producción de metano acumulada en el tiempo; b) La AME expresada en gDQO/gSSV.d para cada tratamiento

Los sistemas con los lodos de cervecería (PC1, PC2 y PC3), mostraron la mayor velocidad de producción (mayor pendiente) en el primer y segundo día del ensayo. Por otro lado,

los sistemas con los lodos IL y PF presentaron una mayor fase *lag*, donde la mayor velocidad de producción se produjo entre los días 2 y 5 (Figura 6 a). Estas diferencias en el tiempo de respuesta a la degradación del sustrato, podrían deberse a las distintas características del lodo.

Se calculó la AME, expresada como gDQO/gSSV.d , con los valores de la máxima pendiente obtenida (Figura 6 b). Los coeficientes de varianza (CV) en los valores AME fueron bajos, siendo de 7,9% para G1, 0% para G2, 14,3% para IL, 4,9% para PC1, 6,0% para PC2, 0% para PC3, 0% para PF y 15,6% para RC. Los bajos valores obtenidos de CV reflejaron la buena reproducibilidad del ensayo.

Los máximos valores de AME fueron encontrados en PC1, PC2 y PC3 siendo 0,13, 0,11 y 0,12 gDQO/gSSV.d respectivamente. Varios trabajos han demostrado que existe una relación directa entre la formación de gránulos y la actividad. Los lodos granulares de mayor densidad y tamaño presentan mayor actividad de la biomasa que otros lodos no granulares (Jijai et al., 2014; Lettinga et al., 1983). Xiangwen et al. (2008) utilizaron un reactor piloto discontinuo secuenciado (ASBR) para el tratamiento de las aguas residuales de cervecería. El reactor fue inoculado con un lodo floculento proveniente de un reactor UASB, donde la AME (acetato como sustrato) fue de 0,108 gDQO/gSSV.d durante la etapa de arranque del reactor. Luego de 60 días de operación, la AME fue de 0,721 gDQO/gSSV.d , asociando este valor alto a la granulación del lodo. Fang et al. (1994) comparó la AME y la microestructura granular para tres tipos de lodos provenientes de reactores UASB. El lodo de cervecería presentó el mayor valor de AME con 0,49 gDQO/gSSV.d , utilizándose acetato como sustrato. Parra-Orobio et al. (2018), evaluó la actividad de un lodo granular, floculento y sus mezclas en diferentes proporciones. El lodo granular fue el de mayor actividad, incrementándose la actividad de las mezclas cuanto mayor era el porcentaje de lodo granular en la mezcla. El lodo granular favoreció la actividad biológica y la capacidad de transformación de sustrato a metano, debido a sus características físicas (alta concentración de sólidos totales y volátiles que indican una mayor carga y actividad de microorganismos) y a sus propiedades de aglomeración en partículas densas (gránulos).

Un trabajo realizado por Regueiro et al. (2012), determinó la AME en lodos de diferentes orígenes, y encontró que el lodo de cervecería (de reactor UASB) tuvo la mayor actividad y la mayor población de arqueas.

Los resultados obtenidos en este trabajo, concuerdan con los encontrados por estos autores, donde los lodos de cervecería y de tipo granular, generalmente son los que

presentan mayor actividad. Los valores no deben ser comparados, ya que existen múltiples factores que afectan el resultado. La metodología, métodos analíticos y las condiciones ambientales utilizadas pueden diferir entre los autores y el protocolo utilizado en este trabajo. Asimismo, existen otras variables como edad del lodo, densitometría y tamaño granular que impactan en la actividad de la biomasa para un mismo tipo de lodo (en este caso lodos de cervecería). Por otro lado, la máxima velocidad de producción (pendiente de la recta) y consecuentemente la AME podría estar subestimada en este tipo de lodos (PC1, PC2 y PC3), debido a la falta de mediciones de metano durante las primeras horas del ensayo. En general, los lodos granulares o floculentos presentan la mayor actividad durante las primeras 4-10 horas del ensayo (Cho et al., 2005).

Los menores valores de AME fueron 0,04 gDQO/gSSV.d para PF y 0,05 gDQO/gSSV.d para G2. Los lodos PF y G2 fueron recolectados a los 7 y 9 meses de funcionamiento del reactor, respectivamente. Estos valores bajos de actividad podrían estar asociados a que ambos lodos son jóvenes, encontrándose en la etapa de adaptación al sustrato. Por otro lado, PF y G2 provienen de reactores alimentados con sustratos complejos, ricos en nitrógeno (efluente porcino y guano de aves ponedoras respectivamente). Los compuestos nitrogenados podrían inhibir el proceso de digestión anaeróbica (Guebitz et al., 2015; Tabatabaei and Ghanavati, 2018; Yenigün and Demirel, 2013), por lo que el menor valor de AME en estos lodos podría deberse a una leve inhibición del proceso. Regueiro et al., (2012), también encontró un valor bajo de AME en el lodo de codigestión residuos de mataderos con cerdo y glicerina (reactor piloto), asociando esto a las altas concentraciones de nitrógeno amoniacal encontradas. Wandera et al. (2018), realizó un análisis de la *performance* de 5 plantas anaeróbicas en funcionamiento. El análisis del AME en el lodo proveniente de una planta de tratamiento de guano, mostró el valor más bajo de todos los analizados (0,035 gDQO/gSSV.d) asociando esto a las altas concentraciones de amonio.

Por otro lado, la comparación de la AME entre los lodos alimentados con guano, mostró que G1 fue significativamente superior que G2 ($p < 0,05$). Si bien estos lodos provienen de reactores donde el diseño (mezcla completa, reactor piloto), las condiciones de operación, manejo y alimentación son similares, la edad del lodo fue diferente (2 años y 9 meses para G1 y G2, respectivamente), sugiriendo que la mayor actividad encontrada en G1, podría deberse a una mayor adaptación del inóculo a este sustrato.

4.5 Conclusiones

- La buena reproducibilidad entre las réplicas demostró que se trabajó con un diseño de reactores hermético y con un sistema de medición del volumen y calidad del biogás preciso, cumpliendo así con el objetivo de desarrollar un modelo de reactores que aseguren las condiciones anaeróbicas, la reproducibilidad y fiabilidad de los resultados obtenidos. Sin embargo, para la optimización del ensayo de AME, sería recomendable aumentar el número de muestreos de volumen y calidad de biogás durante las primeras horas del ensayo, principalmente cuando se quiera determinar la AME en lodos de tipo granular o floculento. Esto podría evitar una subestimación de la máxima pendiente encontrada en la curva de la producción de metano en el tiempo.
- Se adaptó, ajustó y protocolizó metodología, implementando el mismo procedimiento en inóculos de diferentes orígenes para la determinación de la AME.
- La máxima AME fue encontrada en los lodos de cervecería, con una rápida velocidad de degradación y eficiente remoción del sustrato. Consecuentemente, se seleccionará este tipo de lodo para realizar los ensayos de biodegradabilidad anaeróbica del guano de aves ponedoras.

El ajuste metodológico y la protocolización de este ensayo permitió generar una herramienta de diagnóstico del proceso de digestión anaeróbica que podrá ser implementada como control y monitoreo en plantas de biogás.

5. Ensayo de potencial bioquímico metanogénico: relación entre el sustrato y el inóculo para su optimización

5.1. Introducción

5.1.1. Ensayo de potencial bioquímico metanogénico (PBM)

La valorización del biogás como fuente de energía alternativa es una de las principales razones por la cual la digestión anaeróbica es una de las tecnologías más implementadas durante los últimos años para el tratamiento de los residuos orgánicos. El incremento de la implementación de esta tecnología, conlleva y demanda la necesidad de conocer cuánta energía es capaz de generar un determinado residuo de interés antes de su implementación a escala real. Así, el primer paso para definir la posibilidad de emplear un residuo orgánico como recurso para la digestión anaeróbica es conocer sus características intrínsecas y su biodegradabilidad anaeróbica.

La biodegradabilidad anaeróbica es comúnmente evaluada mediante un ensayo llamado potencial bioquímico metanogénico (PBM). Este ensayo permite determinar la máxima cantidad de metano producido por gramo de biomasa y la cinética de producción, bajo condiciones controladas de laboratorio en reactores en *batch* (Lesteur et al., 2010). El PBM se calcula como la máxima cantidad de metano acumulada en el período ensayado, dividida por la cantidad de masa de sustrato agregada, expresado comúnmente como mL de CH₄/gDQO o gSV.

La velocidad de carga volumétrica y el tiempo de retención hidráulico son algunos de los parámetros operativos que son interpretados a través de un ensayo de PBM, los cuales serán utilizados para diseñar y operar reactores anaeróbicos a escala real. Este tipo de ensayo se lleva a cabo como factibilidad técnica y económica a priori de la implementación de plantas de biogás, permitiendo estimar el balance energético, condiciones operativas, el tamaño de los reactores y otros equipamientos (Holliger et al., 2016). Dentro de sus múltiples aplicaciones, el ensayo de PBM comúnmente se utiliza para: a- Determinar la biodegradabilidad anaeróbica y la máxima producción de metano (o potencial energético) de residuos orgánicos; b- Evaluar el efecto de la co-digestión de diferentes sustratos y definir la relación sustrato-co-sustrato óptima; c- Determinar la cinética de degradación, que mediante el uso de diferentes modelos matemáticos, permite predecir el funcionamiento de digestores a escala real; d- Determinar variables de diseño y parámetros operativos para el escalamiento (*scaling up*); e- Evaluar sustancias inhibitorias del proceso anaeróbico (Tabatabaei and Ghanavati, 2018).

El ensayo consiste en incubar una pequeña cantidad de residuo (sustrato) con un inóculo anaeróbico y medir el volumen de biogás y metano generado en el tiempo. La primera

propuesta metodológica fue desarrollada por Owen et al. (1979) y desde entonces fue una metodología ampliamente utilizada, incrementándose su aplicabilidad con los años. En la actualidad existe un gran número de trabajos en la comunidad científica que han desarrollado y adoptado este ensayo para determinar el potencial metanogénico de diferentes sustratos. A pesar de que una gran masa de datos ha sido generada, la comparación entre los datos de biodegradabilidad reportados resulta difícil. Esto es debido a la gran variabilidad de equipamiento, y a los diferentes protocolos y condiciones ambientales que son utilizados. Existen protocolos estandarizados de ensayos de biodegradabilidad anaeróbica para compuestos químicos, plásticos y sustratos orgánicos complejos como los son los residuos sólidos (normas ISO 15985 (2004), ASTM D 5511 (1994), VDI 4630 (2016), DIN 38414 TL8 (1985), entre otros), que difieren todos ellos principalmente en el diseño experimental. La relación sustrato/inóculo (S/I), concentración y tipo de inóculo, volumen de *headspace*, nutrientes, sistema de detección del metano, análisis y reporte de los resultados, son algunos de los factores que varían entre los diferentes ensayos (Angelidaki et al., 2009; Holliger et al., 2016).

A continuación, se presenta una revisión sobre los factores y condiciones que afectan al desarrollo de este ensayo y que deben ser considerados para unificar protocolos y procedimientos.

1. Sustrato

En principio deben conocerse las características del residuo interés. En particular, se utilizan los parámetros ST, SV y DQO para determinar el contenido de materia orgánica de la muestra, y es recomendable medir el contenido de compuestos nitrogenados ya que son potenciales inhibidores del sistema. Otro análisis que se utiliza para la caracterización es la determinación de la composición elemental del residuo: contenido de carbono (C), oxígeno (O), hidrógeno (H), nitrógeno (N) y azufre (S). Esta información puede ser utilizada para estimar el potencial bioquímico metanogénico teórico (Angelidaki et al., 2011).

El tratamiento biológico de residuos sólidos orgánicos es altamente complejo. La productividad metanogénica depende de la naturaleza del residuo, donde carbohidratos, proteínas o grasas tienen diferente potencial metanogénico (Tabatabaei and Ghanavati, 2018). Otra característica importante es el contenido de lignina, celulosa y hemicelulosa, debido a que estos compuestos son de baja biodegradabilidad anaeróbica y no contribuyen al potencial metanogénico del residuo. Buffiere et al. (2006) reportó que existe una clara

relación entre la biodegradabilidad y la composición del residuo, la cual decreció con el incremento del contenido ligno-celulítico del residuo.

El tamaño de la partícula es otra variable a tener en cuenta ya que afecta la cinética y la velocidad de producción del biogás, debido a que influye en el contacto de los microorganismos con el área superficial específica del residuo. Si bien esta variable no afecta directamente a la máxima producción de biogás o metano, es importante asegurar un tamaño de partícula pequeño para una mayor homogeneidad del sustrato y una mayor reproducibilidad del PBM (Angelidaki et al., 2009). Además, los compuestos complejos con alta masa molecular, necesitan ser hidrolizados para una mayor accesibilidad. El ataque enzimático en la etapa hidrolítica se ve favorecido cuanto mayor área superficial tenga la partícula (Lesteur et al., 2010).

La concentración de sustrato es uno de los parámetros más importantes para el diseño de un ensayo de PBM. Sin embargo, existen pocos estudios acerca de la influencia de este parámetro. Algunos ensayos de PBM establecen una concentración de sustrato entre 2-10% de ST en el reactor *batch* para asegurar una adecuada transferencia de masa (Raposo et al., 2012; V.D.I 4630, 2006). Sin embargo, existen pocos estudios enfocados en el efecto de la concentración de sustrato. Generalmente los estudios se refieren a encontrar la óptima relación entre el sustrato y el inóculo (S/I).

2. Inóculo

El inóculo debe ser aquel que asegure la presencia de las bacterias metanogénicas en un tiempo superior a 40 días. Para ello, previamente deberá medirse la actividad del inóculo (medida generalmente como actividad metanogénica específica, AME) que se utilizará durante el ensayo de PBM. Se considera una actividad aceptable para un ensayo de PBM utilizando acetato como sustrato patrón entre 0,1 y 0,3 gDQO/gSSV.d para lodos granulares. Si se utilizan lodos de tipo floculento o dispersos, la actividad es más baja (Angelidaki et al., 2009; Holliger et al., 2016).

El inóculo debe ser utilizado lo antes posible luego del muestreo para evitar alterar sus propiedades. Se recomienda almacenar el inóculo a la misma temperatura que se realizará el ensayo o a temperatura ambiente (20-25°C) por períodos cortos, no superiores a 5 días. Se sugiere evitar la conservación a temperaturas bajas (4°C) y, en caso que no pueda evitarse, el período de almacenamiento no debería ser mayor a un mes (Holliger et al., 2016).

La naturaleza (origen) y la concentración del inóculo son los factores que más difieren en la protocolización de los ensayos de PBM. Normalmente, cuanto mayor sea la

concentración del inóculo, mayor será la conversión anaeróbica del sustrato y más rápido finalizará el ensayo de PBM. Existen diversas concentraciones de inóculo e incluso diferentes formas de expresión reportadas. Puede encontrarse como porcentaje de volumen con rango desde 10 a 80%, como % de SV con valores entre 2-3% en lodos de estiércoles y hasta 10% en lodos granulares, como gSV/L con rango desde 2,1 a 37,2 gSV/L (Raposo et al., 2011) y como gSSV/L con rango desde 2 a 8 gSSV/L (Rozzi and Remigi, 2004).

La relación entre el sustrato y el inóculo es uno de los parámetros más importantes en el ensayo de PBM. A pesar de ello, muchos investigadores no reportan este valor en el diseño experimental. La relación sustrato (como DQO)/ microorganismos (como SSV) es la relación universal que se utiliza en el diseño de plantas de tratamiento de efluentes (Tchobanoglous et al., 2003). Comúnmente, la cantidad de sustrato se expresa como gSV cuando se utiliza residuos sólidos complejos, porque técnicamente es más fácil esta determinación que la DQO. En cuanto al inóculo, si bien la forma de expresión correcta es como gSSV, generalmente también se expresa como gSV. Esto genera incertidumbre cuando se quiere comparar los valores reportados, ya que pueden reportarse diferentes formas de expresión (gSV/gSV, gSV/gSSV, gSV/gDQO) e incluso esta relación puede utilizarse en el orden inverso como inóculo/sustrato (I/S).

3. Variables operativas

Las variables operativas como pre-incubación, temperatura, agitación, pH y nutrientes también afectan el ensayo de biodegradabilidad. En el capítulo sobre el ensayo de AME, se describió sobre la importancia de definir las condiciones óptimas para estas variables, ya que influyen sobre la actividad de las bacterias anaeróbicas y su velocidad de degradación. Para un ensayo de PBM, rigen las mismas condiciones óptimas definidas en el ensayo de AME, y por lo tanto no serán nuevamente detalladas en esta sección.

Al igual que en el ensayo de AME, deberá incluirse un blanco para evaluar la producción de metano residual debido al decaimiento de la fase endógena. El blanco consiste en incubar el inóculo sin el agregado de sustrato, bajo las mismas condiciones que se desarrollará el ensayo de PBM. La producción de metano generada en la fase endógena deber ser restada de la producción de metano generada por el inóculo con el sustrato.

Se recomienda incluir un control positivo en el ensayo de PBM. El control se utiliza para evaluar la respuesta del inóculo a un sustrato patrón y también para validar el método de medición del biogás, siendo la celulosa y la gelatina los estándares comúnmente utilizados (Angelidaki et al., 2009).

4. Diseño experimental

El sistema de reactores y de medición del metano y biogás puede ser el mismo que el utilizado para el ensayo de AME. Se sugiere utilizar tres réplicas por tratamiento, dependiendo de la complejidad (homogeneidad) del sustrato y la reproducibilidad del ensayo. El ensayo de PBM es llevado a cabo en reactores que aseguren la hermeticidad del sistema durante todo el período del ensayo.

Al igual que en el ensayo de AME, la producción de metano puede ser medida por diferentes técnicas (volumétricas, manométricas y cromatografía gaseosa). En el método manométrico, la presión generada en el *headspace* permite calcular el volumen de biogás generado, donde el metano puede ser identificado y cuantificado por cromatografía gaseosa. En el método volumétrico, el biogás atraviesa una solución alcalina para capturar el CO₂ y luego el volumen desplazado representa el volumen de metano generado.

En cuanto al volumen del *headspace*, está asociado a la durabilidad del ensayo y a la frecuencia de muestreo del gas, cuando se utiliza el método manométrico. Generalmente, se utiliza un *headspace* mayor que en el ensayo de AME. Se reportan diferentes volúmenes de *headspace* e incluso, muchos autores no definen esta variable en su diseño experimental (Raposo et al., 2012).

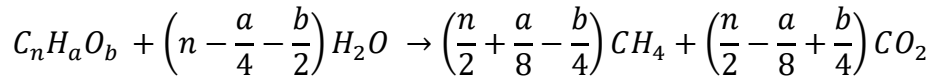
La medición del biogás y metano se realiza periódicamente, para luego evaluar su evolución en el tiempo. La duración del ensayo no está fijada, ya que dependerá principalmente de la biodegradabilidad del sustrato. Sin embargo, comúnmente se reportan ensayos que van desde 30 a 60 días. La degradación completa de la materia orgánica biodegradable se lleva a cabo en aproximadamente 30 días y para compuestos de lenta degradación puede prolongarse hasta 50 días (Raposo et al., 2012; Tabatabaei and Ghanavati, 2018). El test debería finalizar cuando la producción de metano diaria durante tres días consecutivos es menor al 1% del volumen total de metano acumulado. (Holliger et al., 2016; V.D.I, 2006).

En cuanto a la frecuencia de muestreo, se recomienda medir diariamente durante la primera semana, principalmente si se desea conocer la cinética de producción. Luego, puede medirse una vez por semana. Asimismo, la frecuencia dependerá de la presión generada en el *headspace*, en el caso que se utilice el método manométrico. La presión en el reactor no debe superar los 3 bares para evitar la disolución del CO₂ y accidentes por explosión (Holliger et al., 2016).

5. Interpretación de los datos

El PBM comúnmente se expresa como mLCH₄/gDQO o gSV del sustrato agregado. Comúnmente, el volumen de metano producido es expresado en condiciones normales de presión y temperatura (1,013 bar y 273,15 K; Strömberg et al., 2014) para así facilitar la comparación de los resultados con lo reportado por la bibliografía. Además, al igual que en el ensayo de AME, debe restarse la producción de metano del inóculo (blanco) a la producción de metano de la muestra.

A través de este ensayo puede estimarse la biodegradabilidad anaeróbica del residuo, ya que el PBM, implica la degradación de la materia orgánica dada por microorganismos bajo condiciones anaeróbicas. Cuando la producción de biogás y metano es alta, menos materia orgánica remanente queda por degradar, con lo cual indica una alta biodegradabilidad anaeróbica (Lesteur et al., 2010). Existen varias formas propuestas para relacionar el PBM con la biodegradabilidad. Algunos consideran el índice de biodegradabilidad, como la remoción de materia orgánica (calculada a través de la remoción de SV). Otros lo relacionan con el PBM teórico, a través de la siguiente ecuación dada por Buswell and Neave (Tabatabaei and Ghanavati, 2018):



Esta ecuación es derivada del balance de la conversión total de la materia orgánica a CH₄ y CO₂ con H₂O como única fuente externa, bajo condiciones anaeróbicas. El PBM está dado por la siguiente expresión:

$$PBM_t = \frac{\left(\frac{n}{2} + \frac{a}{8} - \frac{b}{4}\right) 22,4}{12n + a + 16b}$$

Dónde, el PBM_t es el potencial bioquímico metanogénico teórico en condiciones estándares. Esta fórmula es aplicable cuando la composición elemental del residuo o la muestra es conocida. Una alternativa para obtener una estimación del PBM_t si no se conoce la composición elemental, es propuesta por Angelidaki and Sanders, (2004) (Tabatabaei and Ghanavati, 2018). A través del PBM de lípido, proteína, carbohidrato, acetato y propionato (en CNPT) estableció la siguiente expresión para el cálculo del PBM de un residuo:

$$PBM_t \left(\frac{LCH_4}{gSV}\right) = 0,415 \text{ carbohidratos} + 0,0496 \text{ proteínas} + 1,014 \text{ lípidos} \\ + 0,373 \text{ acetato} + 0,530 \text{ propionato}$$

Conocido el valor del PBM teórico del residuo, el índice de biodegradabilidad (IB) puede ser calculado como la relación del PBM experimental (PBM_e) y el PBM_t :

$$IB (\%) = \frac{PBM_e \times 100}{PBM_t}$$

Otros autores estiman el índice de biodegradabilidad en relación a los gramos de DQO que teóricamente son convertidos a metano, bajo condiciones estándares, según la siguiente expresión (Lesteur et al., 2010):

$$IB(\%) = \frac{PBM_e \times 100}{350 \times DQO_m}$$

Dónde, el PBM_e es el potencial bioquímico metanogénico experimental expresado como mL CH_4 /gSV, DQO_m es la demanda química de oxígeno inicial de la muestra como gDQO/gSV, y 350 es el factor de conversión, que considera que 1 g de DQO= 350 mL de CH_4 . Este IB, calculado a partir de un valor teórico, es una estimación y su valor no es exacto, ya que no considera que parte de la materia orgánica es consumida (y no transformada a CH_4) por las bacterias anaeróbicas para su crecimiento y desarrollo.

En el Diagrama 1 se resume los factores y condiciones que influyen y que deberán ser considerados para protocolizar el ensayo de PBM.

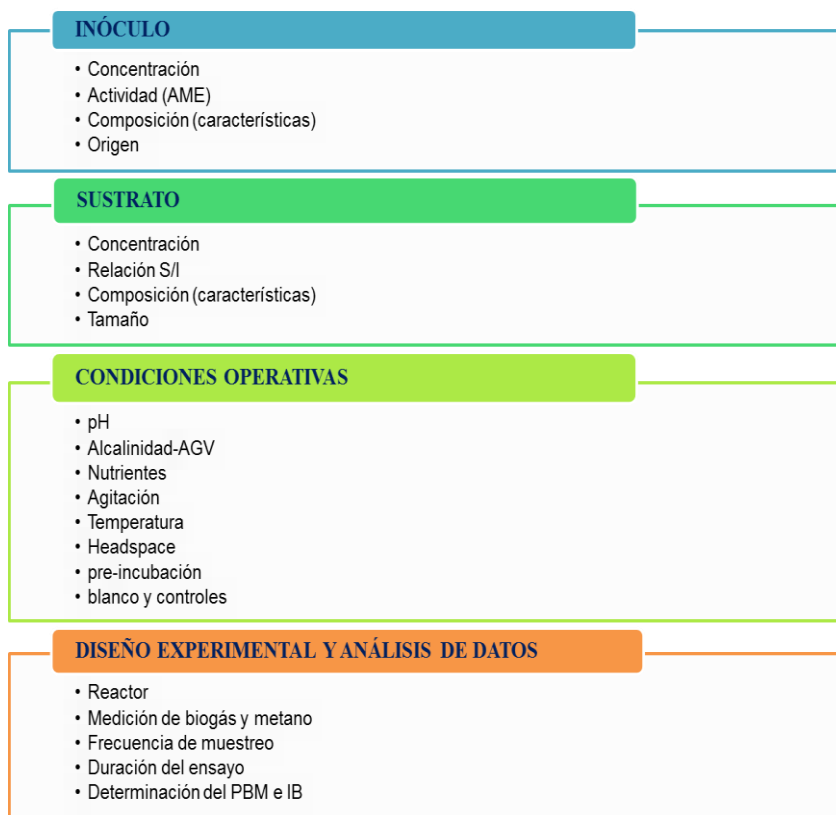


Diagrama 1. Variables que afectan el desarrollo del proceso anaeróbico en un ensayo de PBM y que son necesarias definir y protocolizar.

5.1.2. Influencia de la naturaleza (origen) del inóculo y su relación con el sustrato

Como se mencionó anteriormente los resultados de un ensayo de PBM pueden ser afectados por diversos factores. Algunos de ellos ya están estandarizados, y se conoce cuáles son los valores recomendados (temperatura, agitación). Sin embargo, la cantidad de sustrato y su relación con la concentración de inóculo resultan ser complejas de estandarizar y deben ser evaluadas para cada caso en particular.

La mineralización de un residuo sólido a través del proceso de digestión anaeróbica requiere de la acción coordinada de diferentes grupos de bacterias, como así también de prevenir la acumulación de metabolitos intermediarios y productos que son potencialmente inhibidores del proceso (AGV y nitrógeno amoniacal). En efecto, existe un balance entre los microorganismos y el sustrato, que asegura la eficiente biodegradabilidad anaeróbica. Si la carga de sustrato es demasiado baja, los microorganismos exhibirán una baja actividad metabólica y consecuentemente baja producción de biogás. Si la carga de sustrato es demasiado alta, la medición del biogás será más confiable pero podría resultar en una inhibición de la producción de biogás por acumulación de potenciales inhibidores (Angelidaki and Sanders, 2004; Raposo et al., 2011). Por eso, uno de los parámetros claves es encontrar la mejor relación entre el sustrato y el inóculo que mantenga el equilibrio en el sistema.

Si bien es evidente la importancia entre la concentración de sustrato y los microorganismos, existen controversias acerca de la influencia de la relación S/I sobre el ensayo de PBM. Teóricamente, el rendimiento de metano no debería ser afectado por esta relación, ya que solo influye en la cinética del proceso (Lesteur et al., 2010). Sin embargo, se ha demostrado que esta relación puede afectar tanto la tasa como el grado de degradación anaeróbica (Holliger et al., 2016; Raposo et al., 2011).

Comúnmente, se utilizan las relaciones I/S entre 1 y 4 (como gSV/gSV), recomendándose una mayor cantidad de materia orgánica de inóculo que de sustrato para minimizar los posibles problemas de inhibición o acidificación en el sistema (Holliger et al., 2016). Esta relación no debería estandarizarse, ya que depende del tipo de sustrato y de las características del inóculo. Deberá evaluarse cada caso en particular, dado que cada sustrato tiene una relación óptima de sustrato: inóculo, considerando su potencial producción de AGV y capacidad de amortiguamiento (Lesteur et al., 2010). Para sustratos

desconocidos o que se sospecha una inhibición del proceso, se recomienda utilizar entre 3 a 4 relaciones de I/S diferentes (Holliger et al., 2016).

La incubación previa del inóculo con el sustrato conduce a la inducción de vías metabólicas para la degradación, a un incremento de la afinidad por el sustrato y además a un incremento en la cantidad de microorganismos degradadores específicos de ese sustrato. Si bien la idea de adaptación/aclimatación es extensamente aceptada en la comunidad científica, existen pocos antecedentes en el uso de inóculos adaptados, utilizándose comúnmente inóculos no adaptados en el ensayo de PBM (Raposo et al., 2011).

Así las características del inóculo y la naturaleza u origen del mismo, pueden influir en los resultados de este tipo de ensayo. Inóculos de diferentes orígenes, podrían conducir a diferentes biodegradabilidades y rendimientos de metano para una misma concentración de sustrato, debido a las diferentes composiciones de la comunidad microbiana. Gu et al. (2014) encontraron diferencias en cuanto a la biodegradabilidad de la paja de arroz con el uso de diferentes inóculos, atribuyendo esto a las diferencias en la composición de nutrientes y en las actividades enzimáticas.

Los lodos provenientes de plantas de tratamiento de aguas residuales, y digeridos provenientes de plantas de tratamiento agrícolas principalmente estiércoles como materia prima, son los frecuentemente elegidos para realizar los ensayos de PBM (Angelidaki et al., 2011; Holliger et al., 2016). Los lodos provenientes de plantas de tratamiento de aguas residuales, son los prioritariamente utilizados debido a que es un lodo de fácil disponibilidad, con diversidad microbiana y debido a su actividad metanogénica (Raposo et al., 2012). También suelen utilizarse lodos de plantas de tratamiento de bioresiduos (Raposo et al., 2011) y lodos granulares provenientes de plantas de tratamiento de cervecería (Koch et al., 2017).

Resumen y comentarios generales

El ensayo de potencial bioquímico metanogénico es una herramienta ampliamente utilizada a nivel mundial como estudio de pre-factibilidad técnica antes de montar una planta de biogás, ya que permite cuantificar la máxima producción de metano para un determinado residuo de interés, bajo condiciones controladas de laboratorio. A pesar de su importancia, existe una amplia variabilidad metodológica, que genera incertidumbres y complejiza la comparación e interpretación de los resultados. La relación S/I es una de las variables más importantes y que no puede estandarizarse ya que depende del tipo de

sustrato y de las características del inóculo. Si se sospecha la presencia de inhibidores en el sustrato se recomienda probar diferentes relaciones S/I para asegurarse de encontrar el máximo potencial metanogénico alcanzado.

Por otro lado, el guano es un sustrato rico en materia orgánica que puede ser transformada en metano, pero las altas concentraciones de amoníaco podrían inhibir el proceso. La aclimatación del inóculo al sustrato es una de las estrategias ampliamente utilizadas para optimizar la digestión anaeróbica y contrarrestar los efectos de inhibición. El ensayo de PBM llevado a cabo con un inóculo aclimatado permitirá estimar el máximo rendimiento de metano que podrá alcanzarse en una planta de biogás, aproximado así a las condiciones de manejo en una escala real que utiliza inóculo aclimatado como estrategia para tratar el guano de aves ponedoras.

5.2. Objetivo

Bajo estos conceptos, en esta sección de la tesis se trabajó en el objetivo específico:

3-Determinar el potencial energético del guano de aves ponedoras, mediante la implementación del ensayo de Potencial Bioquímico Metanogénico (PBM), evaluando la relación entre el sustrato y el inóculo y su aclimatación al sustrato como estrategias para la optimización del proceso.

5.3. Materiales y Métodos

Reactores

Se modificó la tapa del reactor utilizado para los ensayos de AME, adicionando un tomador de muestra del medio líquido para monitorear las variables físicoquímicas durante el período ensayado. Este dispositivo muestreador, localizado en el centro de la tapa, consiste en un tubo de polipropileno de 1 cm y 0,5 cm de diámetro externo e interno respectivamente y 16 cm de largo, que está siempre por debajo del volumen del líquido para que cumpla su función. En uno de los costados, se colocó la válvula de salida para muestrear el gas generado en el *headspace*. En ambos orificios de la tapa, se utilizó como

conexión y cierre del sistema una válvula esférica de ¼ pulgadas, de material acero inoxidable, acoplada a un conector neumático con *o-ring* interno. El líquido fue muestreado mediante el acople de una jeringa de 25 mL a la manguera neumática conectada en el centro del reactor. En la Figura 1 se muestra, el diseño del nuevo sistema de reactor, con el muestreador de líquido.

La metodología utilizada para la medición del biogás y metano fue la misma que la utilizada para el ensayo AME (mediante un transductor de presión y por cromatografía gaseosa).



Figura 1. Nuevo diseño de reactor con muestreador de la fase líquida. a) Reactor anaeróbico, 1: válvula esférica conectada al muestreador; 2: válvula esférica conectada al *headspace*; 3: tubo muestreador; b) reactor anaeróbico conectado a la jeringa para muestrear la fase líquida.

Procedimiento y condiciones del ensayo

Las variables iniciales de operación se establecieron en función a lo reportado en la bibliografía y a los conocimientos adquiridos en la capacitación realizada sobre este tipo de ensayo en la Facultad de Ingeniería de la Universidad de la República del Uruguay-grupo BIOPROA (Uruguay). En la Tabla 1 se resume las condiciones generales del ensayo.

La mezcla del lodo con el sustrato se ajustó a pH 7 con solución 0,5 N HCl antes de llegar al volumen final de trabajo y se registró el pH inicial en cada reactor. Se cerró inmediatamente y se barrió el O₂ presente en el reactor con una corriente de gas N₂ (25 psi de salida) hasta alcanzar una presión manométrica de 1 bar en su interior (es decir, una presión de 1 bar por encima de la presión atmosférica). El reactor presurizado fue sumergido en agua para comprobar la ausencia de pérdidas de gas. Asegurada la hermeticidad, se despresuriza hasta presión atmosférica y se repitió 3 veces este

procedimiento. Cada tratamiento se realizó por triplicado y el blanco por duplicado, bajo las mismas condiciones que el tratamiento.

Tabla 1. Condiciones generales del ensayo de PBM

Condiciones generales	
Concentración de inóculo	5 gSSV/L
Medio nutritivo	Se utilizó el mismo medio nutritivo que el utilizado para los ensayos de AME (Tabla 2 de la sección de AME en esta tesis)
V efectivo	336 mL
Headspace	40% (224 mL)
Pre-aclimatación del lodo	Previamente al ensayo, las muestras de lodo fueron incubadas a 35°C en un reactor de 2 L, con la llave abierta, durante 5 días
Blanco	Sin el agregado de sustrato, por duplicado
Mezclado y temperatura	Agitación axial, 2 veces al día durante 20 min; temperatura a 35°C

Para trabajar en condiciones mesofílicas, se utilizó una incubadora, regulada a 35°C y como sistema de agitación se utilizaron dos agitadores magnéticos con 6 puertos cada uno. Para ello, se le agregó a cada reactor una barra magnética (Figura 2).



Figura 2. Condiciones experimentales. a) Reactores anaeróbicos en agitador magnético con 6 puertos; b) reactores anaeróbicos en incubadora regulada a 35°C.

Para el muestreo del líquido, se tomó 10 mL de muestra y se registró su volumen exacto, a fin de calcular el nuevo volumen del *headspace*, y considerarlo en los cálculos de volumen de biogás y metano generado en la próxima medición. Para asegurar la homogeneidad y representatividad de la muestra líquida, el reactor fue agitado manualmente e inmediatamente se tomó la muestra.

La frecuencia del muestreo dependió de la presión en el *headspace*. Se consideró como valor mínimo 0,10 bares y como valor máximo 1 bar para realizar la medición cromatográfica. El valor mínimo de presión es requerido para realizar una barrida segura por la columna cromatográfica y el valor máximo es para evitar posibles fugas y ruptura del recipiente por sobrepresión. Una vez medido el volumen de biogás y CH₄, el reactor es despresurizado hasta alcanzar la presión atmosférica, quedando listo para una próxima acumulación de biogás y metano en el *headspace*.

La frecuencia de muestreo programada fue 3 veces la primera semana, 2 veces la segunda semana y luego 1 vez por semana. La duración del ensayo aproximada fue de 60 días. Se tomó como referencia, hasta que la producción de biogás diaria sea < 1% del total producido.

Inóculo y Sustrato

Se evaluaron dos inóculos provenientes de diferentes orígenes, y bajo diferentes condiciones operativas.

IA= inóculo adaptado. Es un inóculo de tipo disperso, proveniente de un reactor de 25 L de mezcla completa, alimentado 3 veces por semana con guano de aves ponedoras y bajo condiciones mesofílicas. La actividad de este lodo fue medida en el capítulo AME como G2.

Aprovechando la facilidad para disponer de este lodo nuevamente, y que este reactor está en continuo funcionamiento alimentado con guano de aves ponedoras, se tomó una nueva muestra de lodo para llevar a cabo el ensayo de PBM. Se determinó nuevamente su actividad metanogénica específica, la cual dio un valor de 0,05 gDQO/gSSV.d.

I= inóculo proveniente de un reactor tipo IC (*internal circulation*), alimentado con efluente cervecero. Este inóculo es granular, y se describió en el capítulo de AME como PC1. En función a los 8 lodos analizados en el capítulo de AME, se seleccionó el PC1 para este ensayo debido a que fue el de mayor actividad metanogénica, con un valor AME de 0,13 gDQO/gSSV.

Ambos inóculos fueron caracterizados inicialmente, y conservados en heladera hasta su uso.

El guano fue recolectado de una avícola ubicada en el predio de INTA-Castelar, con sistema de manejo automatizado, donde el estiércol es extraído 3 veces por semana. La alimentación es a base alimento balanceado, compuesto principalmente por maíz, expeller de soja, afecho de trigo, cochinilla y harina de carne. El guano fue homogeneizado, descartando algunas plumas o partículas gruesas e inorgánicas como piedras. Se cuarteo y se fraccionó en tres réplicas para su caracterización. Se conservó a -18°C hasta su uso (menos de 1 mes).

En la Tabla 2 se resume las condiciones iniciales de cada sistema (IA e I). Se probaron diferentes cantidades de masa de sustrato para cada inóculo, manteniéndose fija la cantidad de masa del inóculo (como gSSV agregados al reactor) y una concentración de 5 gSSV/L de inóculo en cada tratamiento (IA e I). Cada relación S/I fue calculada como gSV de sustrato/gSSV de inóculo.

Tabla 2. Condiciones iniciales del ensayo en cada sistema

		Unidad	S/I (gSV/gSSV)			
			0,4	1	2	4
Sustrato guano	masa agregada	g (bh)	5	9	20	47
		gSV	0,75	1,5	3,2	7,5
Inóculo IA	masa agregada	gSSV	1,68	1,68	1,68	1,68
	Concentración de SSV en el sistema	gSSV/L	5	5	5	5
Inóculo I	masa agregada	gSSV	1,68	1,68	1,68	1,68
	Concentración de SSV en el sistema	gSSV/L	5	5	5	5

Referencias. IA= inóculo adaptado; I= inóculo no adaptado; bh= en base húmeda

Determinaciones analíticas

Se analizaron las variables pH, AGV, AP, AT, ST, SV, DQO_t, DQO_s, NTK, N-NH₃ en los inóculos, en los sustratos y en las muestras líquidas (inóculo + sustrato) al inicio y al final del ensayo. Además, se determinó los SST y SSV en el inóculo para su caracterización. El nitrógeno amoniacal (NA) y el pH fueron medidos periódicamente en la muestra líquida (seis muestreos) para determinar su evolución en el tiempo. A través de estas dos variables y la temperatura de incubación, se calculó el nitrógeno amoniacal libre (NAL). El volumen de biogás se determinó mediante la presión generada en el *headspace* del reactor, utilizándose un transductor de presión. Una vez medido el volumen de biogás y CH₄, el reactor se despresurizó hasta alcanzar la presión atmosférica (P= 1,013 bares).

La metodología de todas estas variables, fue descripta en “métodos analíticos” de esta tesis.

Los promedios de las variables fueron comparados estadísticamente entre las diferentes relaciones S/I para cada tipo de inóculo (IA, I), mediante el test ANOVA de una vía ordinaria y el test de Tuckey. Cuando no fue satisfactoria la normalidad y homocedácea se aplicó el test no paramétrico Kruskal-Wallis. Los promedios de las variables al inicio y al final para cada relación S/I de cada tipo de inóculo, y la comparación entre los dos tipos de inóculos para cada relación S/I, fueron analizadas por el t-test y por el test no paramétrico Mann-Whitney, cuando no cumplían los supuestos de normalidad y homocedácea. Se aplicó un nivel de significancia del 5% en todos los casos. El análisis estadístico fue realizado por el GraphPad Prism®, version 6.01.

Cálculos

Mediante la Ley de Gases Ideales, y bajo condiciones normales de presión y temperatura (273 K y 1 atm), el volumen de CH₄, CO₂ y biogás producido se calculó según las siguientes expresiones:

$$V_{CH_4} = \frac{P_m \times V_h \times T_{CE}}{P_{CE} \times T_i} \times \frac{C_{CH_4}}{100}$$

$$V_{CO_2} = \frac{P_m \times V_h \times T_{CE}}{P_{CE} \times T_i} \times \frac{C_{CO_2}}{100}$$

$$V_{biogás} = V_{CH_4} + V_{CO_2}$$

Dónde:

V_{CH₄}= volumen de metano producido en condiciones estándares (mL)

P_m= incremento de la presión (bar)

V_h= volumen del *headspace* (mL)

T_{CE}= temperatura en condiciones estándares (273 K)

P_{CE}= presión en condiciones estándares (1,013 bar)

T_i= temperatura de incubación de cada reactor (K)

C_{CH₄}= concentración de metano calculada por cromatografía gaseosa (%)

C_{CO₂}= concentración de dióxido de carbono calculada por cromatografía gaseosa (%)

V_{biogás}= volumen de biogás producido en condiciones estándares (mL)

El rendimiento de metano se calculó según:

$$R \left(\frac{mLCH_4}{gSV} \right) = \frac{V_{CH_4} \text{acumulado}(mL)}{m}$$

Dónde:

R= rendimiento de metano (mLCH₄/gSV)

V_{CH₄} acumulado= el máximo volumen de metano acumulado durante todo el período ensayado (mL)

m= masa de sustrato agregada (gSV)

El volumen total producido por la muestra blanco fue considerado, restando este valor al volumen de metano acumulado durante todo el período ensayado para cada sistema.

El Potencial Bioquímico Metanogénico (PBM) será el valor máximo de rendimiento alcanzado (mLCH₄/gSV) para cada sistema IA e I.

El índice de biodegradabilidad se calculó considerando que por cada g de DQO de sustrato agregado al sistema se transforman 350 mL de CH₄ en CNPT (Lesteur et al., 2010):

$$IB = \frac{V_{CH_4} \text{acumulado}(mL) \times 100}{350 \times DQO}$$

Dónde:

IB= índice de biodegradabilidad (%)

V_{CH₄} acumulado= el máximo volumen de metano acumulado durante todo el período ensayado (mL)

DQO= masa de la muestra agregada al sistema (gDQO).

350= es el factor de conversión, que considera que 1 g DQO= 350 mL de CH₄

5.4. Resultados y Discusión

5.4.1. Características del inóculo y del sustrato

En la Tabla 3 se presentan las características fisicoquímicas del guano y de los inóculos utilizados en este ensayo.

El sustrato es rico en compuestos nitrogenados y materia orgánica, con alto contenido de DQO y de SV. Tal como se esperaba, el nitrógeno amoniacal fue alto, representando un 60% del NTK.

Tabla 3. Características fisicoquímicas del sustrato y de los inóculos utilizados en el ensayo. Unidades expresadas como base húmeda (promedio \pm desvío estándar).

	Unidad	Guano	IA	I
pH	upH	7,6 \pm 0,4	8,3 \pm 0,0	7,2 \pm 0,0
DQO _t	g/kg o g/L	243,3 \pm 6,7	18,1 \pm 1,1	65,5 \pm 1,7
ST	mg/g	217,7 \pm 2,4	21,0 \pm 0,3	50,6 \pm 0,5
SV	mg/g	163,1 \pm 1,6	9,5 \pm 0,3	48,6 \pm 0,4
SST	g/L	nd	15,3 \pm 0,9	62,0 \pm 1,5
SSV	g/L	nd	7,9 \pm 0,6	49,5 \pm 1,3
NTK	g/kg	15,4 \pm 0,6	2,3 \pm 0,0	5,8 \pm 0,1
N-NH ₃	g/kg o g/L	9,1 \pm 0,6	2,1 \pm 0,1	0,6 \pm 0,0

Referencias. nd= no determinado; IA= inóculo adaptado; I= inóculo sin adaptación.

En cuanto a los inóculos, el inóculo I presentó una mayor concentración de materia orgánica (DQO y SV) y de NTK en comparación con el inóculo IA. En cuanto al nitrógeno amoniacal (N-NH₃), el IA presentó una mayor concentración de este compuesto, representando un 91,3% del NTK. Contrariamente, en el I sólo un 10,3% del NTK está solubilizado como amoniacal.

5.4.2. Producción de biogás y metano

En la Figura 3 se muestra la producción acumulada y la velocidad de producción de CH₄ para las diferentes relaciones S/I en los inóculos IA e I durante todo el período ensayado.

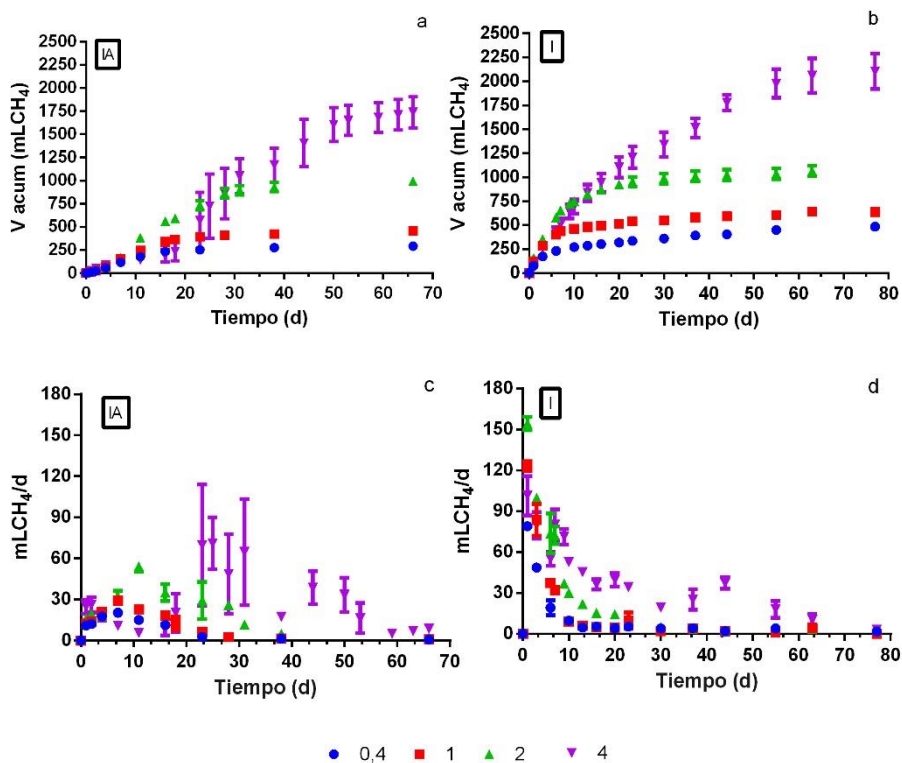


Figura 3. Evolución del volumen y la velocidad de producción de CH₄ en el tiempo para los inóculos IA e I, en los sistemas con diferentes relaciones de S/I. a) Producción acumulada de CH₄ en IA; b) Producción acumulada de CH₄ en I; c) velocidad de producción de CH₄ en IA; d) velocidad de producción de CH₄ en I.

Para el sistema IA (Figura 3 a) se observó una tendencia hacia una mayor producción de metano cuanto mayor fue la relación S/I. Con excepción de S/I= 4, la fase exponencial comenzó entre los 7-10 días del ensayo para 0,4, 1 y 2 de S/I y la fase estacionaria comenzó a los 16, 18 y 23 días para 0,4, 1 y 2 de S/I, respectivamente. Más del 75% del volumen total de metano fue producido al iniciar la fase estacionaria para estas relaciones S/I, mostrando una rápida degradación de la materia orgánica en un tiempo relativamente corto (< 23 días). Estos resultados son similares a los obtenidos por Kafle and Chen (2016) quienes encontraron que para una relación de S/I= 0,5, el 80% del guano fue degradado a los 13 días del ensayo de PBM, utilizándose como inóculo un lodo de un digestor de estiércol vacuno. En relación a las velocidades de producción (Figura 3 c), los picos máximos fueron observados los primeros días del ensayo (7-10 días), alcanzando valores de 20 mL/d, 24 mL/d y 59 mL/d para 0,4, 1 y 2 de S/I, respectivamente. Cuanto mayor fue la concentración de sustrato agregada, mayor fue la velocidad de producción máxima. Luego del pico máximo alcanzado, la velocidad de producción comenzó a decaer en el tiempo, hasta alcanzar un valor menor a 1 mL/d para todas las relaciones, exceptuando la relación S/I= 4.

En cuanto al sistema con una S/I= 4, se observó un estado de retardo (fase lag) extenso, donde hubo muy baja producción durante los primeros días del ensayo. La prolongada fase lag podría deberse a una inhibición en el sistema a esa concentración de sustrato, la cual se revierte a partir del día 20 comenzando a incrementarse la producción. Debido a este retardo, recién a los 44 días del ensayo se inició la fase estacionaria, lográndose más del 75% del volumen total de metano producido mientras que para el resto de las relaciones ese mismo porcentaje fue alcanzado en un tiempo mucho menor (< 23 días). La inhibición por el NAL, ha sido reportada como una inhibición en el tiempo reversible, donde luego de la aclimatación del inóculo al medio, el sistema logra reponerse y continúa produciendo metano (González-Fernández and García-Encina, 2009; Rozzi and Remigi, 2004).

En cuanto a la velocidad de producción en S/I= 4, se observaron dos picos máximos a los 2 d y 25 d, con valores de 29 mL/d y 71 mL/d, respectivamente (Figura 3 c), siendo el segundo mucho mayor. La máxima velocidad lograda (71 mL/d) a los 25 d, reflejó el período donde se revierte la inhibición y la producción acumulada de metano comienza a

incrementarse. En concordancia con otros investigadores (Hashimoto, 1989; Raposo et al., 2006), una excesiva cantidad de sustrato (y la más baja relación I/S) podría causar toxicidad a los microorganismos. Si bien, el comportamiento en este caso fue una inhibición reversible, el uso de grandes cantidades de sustrato guano para este inóculo, mostró largos períodos de incubación para alcanzar la fase estacionaria y su máxima producción de metano. Otra observación que puede extraerse de las Figuras 3 a y c para la mayor relación de S/I, es que hubo una gran variabilidad entre las réplicas, principalmente cuando las velocidades de producción de metano fueron máximas. Los desvíos altos encontrados están relacionados con la disparidad de la reactivación de la biomasa en cada réplica del reactor S/I= 4, que revierte la inhibición a tiempos diferentes. Para el sistema I (Figura 3 b), con la misma tendencia que el sistema IA, se observó que cuanto mayor es la cantidad de sustrato agregada mayor es la producción acumulada de metano. A diferencia del sistema IA, la fase exponencial comienza desde el primer día del ensayo para todas las relaciones y la fase estacionaria comienza a los 10, 10, 23 y 44 días del ensayo para 0,4, 1, 2 y 4 de S/I, respectivamente. Por otro lado, más del 75% del volumen total de metano fue producido a los 30 d, 13 d, 13 d y 44 d para las relaciones de S/I= 0,4, 1, 2 y 4.

En relación a las velocidades de producción (Figura 3 d), la velocidad máxima fue alcanzada el primer día del ensayo para todos los casos, con valores de 79 mL/d, 123 mL/d, 154 mL/d y 101 mL/d para 0,4, 1, 2 y 4 de S/I respectivamente. A excepción de la relación S/I= 4, cuanto mayor es la concentración de sustrato agregada, mayor es la velocidad de producción máxima. Luego de alcanzada la velocidad máxima, ésta comenzó a decaer en el tiempo hasta alcanzar un valor menor a 1 mL/d al final el ensayo. En cuanto a la relación S/I= 4, se observó un decaimiento en la velocidad de producción, comparado con la relación anterior S/I= 2. Esto podría estar indicando una pérdida de la capacidad del inóculo en degradar el sustrato. Por otro lado, comparado con el sistema IA, el inóculo I, el cual no tuvo una aclimatación previa al sustrato, no mostró inhibición del proceso ni fase lag extensa para esta relación, como así tampoco altos desvíos entre las réplicas

Con respecto a los blancos, la producción acumulada fue de 24 ± 1 mL y 136 ± 3 mL de CH₄ para el inóculo IA e I, respectivamente al final del ensayo. Es notoria la diferencia de los volúmenes generados por ambos inóculos. A partir de los 11 días la generación de metano fue despreciable para el inóculo IA. Sin embargo, el inóculo I generó un volumen de metano considerable hasta el final del ensayo. Esto podría deberse a una activación de

las bacterias por las nuevas condiciones ambientales generadas en este ensayo, que favorecen la degradación de la materia orgánica que pudiera estar remanente en el inóculo.

En ambos sistemas IA e I, se encontró la misma tendencia, incrementándose el volumen de metano producido cuanto mayor fue la masa de sustrato agregada (mayor S/I). Yoon et al. (2014), reportó resultados similares, donde al incrementar la masa de sustrato (residuos de matadero de cerdo) se incrementó la producción de metano.

En cuanto a la velocidad de producción de metano los sistemas IA e I, muestran diferencias cinéticas, donde el inóculo I responde más rápidamente transformando la materia orgánica en metano que el inóculo IA. Sin embargo, se requieren mayores estudios cinéticos para cuantificar estas diferencias. Por otro lado, las diferencias encontradas en las velocidades de producción de metano podrían estar asociadas a que estos inóculos presentan diferentes actividades (medidas como actividad metanogénica específica), siendo el inóculo I el de mayor actividad (0,13 gDQO/gSSV.d Vs 0,05 gDQO/gSSV.d).

En la Figura 4 a, se muestran los % de CH₄ y CO₂ al final del ensayo para los sistemas IA e I, considerando a estos compuestos como únicos gases constituyentes del biogás.

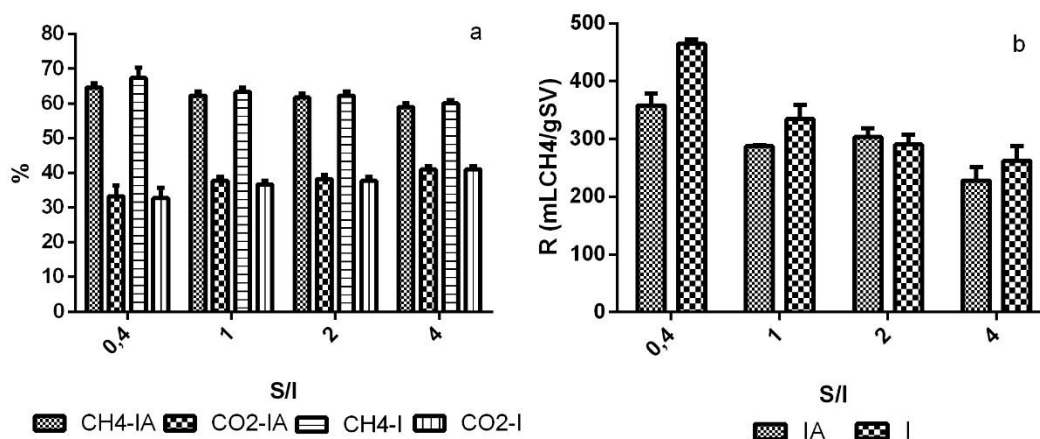


Figura 4. Composición del biogás y PBM al final del ensayo para los dos sistemas IA e I y en todas las relaciones S/I evaluadas. a) Porcentaje de CH₄ y CO₂; b) Potencial Bioquímico Metanogénico (PBM).

Haciendo un análisis integral, el % de CH₄ fue superior al 60% y el % de CO₂ fue inferior al 40% en ambos inóculos. Los % de CH₄ y de CO₂ se encontraron dentro de los valores reportados por otros autores (Al Seadi et al., 2013; Guebitz et al., 2015; Khanal, 2008), mostrando un buen desarrollo del proceso por las metanogénicas en todos los casos evaluados.

Para el sistema IA, el % de CH₄ con S/I= 0,4 fue significativamente superior a las relaciones S/I= 2 y S/I= 4 ($p < 0,05$) y no mostró diferencias significativas con respecto a S/I= 1 ($p > 0,05$). En cuanto al % de CO₂, el sistema con S/I= 0,4 fue significativamente inferior a las relaciones S/I= 2 y S/I= 4 ($p < 0,05$) y no mostró diferencias significativas con S/I= 1 ($p > 0,05$). Por lo tanto, el mayor porcentaje de CH₄ y el menor porcentaje de CO₂ fue obtenido con las relaciones 0,4 y 1 de S/I en el sistema IA.

En el sistema I, el comportamiento fue similar que en el sistema IA, donde el % de CH₄ en la relación con S/I= 0,4 fue significativamente superior con respecto a las relaciones S/I= 2 y S/I= 4 ($p < 0,05$) y el % de CO₂ fue significativamente inferior con respecto también a estas dos relaciones ($p < 0,05$). Por lo tanto, el mayor porcentaje de CH₄ y el menor porcentaje de CO₂ fue obtenido con las relaciones 0,4 y 1 de S/I en el sistema I.

La comparación entre IA e I, mostró que no hay diferencias significativas en el % de CH₄ y del % de CO₂ para todas las relaciones evaluadas ($p > 0,05$).

En la Figura 4 b se muestra el rendimiento de metano (R) para las diferentes relaciones evaluadas y en ambos sistemas (IA e I). En el sistema IA, el R fue $357,9 \pm 20,1$ mLCH₄/gSV, $287,4 \pm 2,1$ mLCH₄/gSV, $302,6 \pm 15,1$ mLCH₄/gSV y $228,5 \pm 22,5$ mLCH₄/gSV para las relaciones S/I de 0,4, 1, 2 y 4, respectivamente. El PBM, que representa el valor máximo de rendimiento de metano alcanzado, se obtuvo con la menor relación S/I de 0,4, siendo significativamente superior con respecto al resto de las relaciones ($p < 0,05$). Por otro lado, se observó una tendencia marcada hacia la disminución del R al incrementarse la masa de sustrato agregada. Sin embargo, no hubo diferencias significativas en el R entre las relaciones S/I= 1 y S/I= 2 ($p > 0,05$). Las masas agregadas de guano para ambas relaciones (1,5 gSV para S/I= 1 y 3,2 gSV para S/I= 2, ver Tabla 2) fueron degradadas por el inóculo IA con el mismo potencial de metanización. En cuanto al sistema I, los valores de R fueron $464,4 \pm 7,4$ mLCH₄/gSV, $334,5 \pm 24,7$ mLCH₄/g SV, $290,1 \pm 16,5$ mLCH₄/gSV y $262,6 \pm 24,7$ mLCH₄/gSV para las relaciones S/I de 0,4, 1, 2 y 4, respectivamente. El PBM fue logrado con la menor relación S/I= 0,4, siendo significativamente superior con respecto al resto de las relaciones evaluadas ($p < 0,05$). Se observó una tendencia hacia la disminución del R al incrementar la masa de sustrato. Sin embargo, estas diferencias no son significativas para las relaciones S/I= 1 y S/I= 2 y para las relaciones S/I= 2 y S/I= 4 ($p > 0,05$).

La comparación entre los sistemas IA e I, mostró que ambos inóculos alcanzaron el PBM cuando la relación S/I fue de 0,4, con valores de 464 mLCH₄/gSV y 358 mLCH₄/gSV para I e IA, respectivamente. La utilización de un inóculo aclimatado generó un 30%

menos de PBM que un inóculo sin aclimatación y con mayor AME. Asimismo, los R fueron significativamente superiores en I, para las menores relaciones evaluadas, con S/I= 0,4 y S/I= 1 ($p < 0,05$). Pero para las mayores relaciones evaluadas, con S/I= 2 y S/I= 4, los R obtenidos fueron similares, sin diferencias significativas entre ambos sistemas ($p > 0,05$). Ambos inóculos, IA e I, tienen el mismo potencial metanogénico del guano para las mayores masas de guano agregadas al sistema (3,2 gSV para S/I= 2 y 7,5 gSV para S/I= 4).

El mayor valor de PBM y de R alcanzado en el sistema I para las relaciones S/I= 0,4 y S/I= 1 podría deberse a una mayor actividad metanogénica específica con respecto al inóculo IA. Neves et al. (2004) llevaron a cabo un estudio de PBM con residuos de comedor utilizando un inóculo suspendido y granular y encontraron que el granular tuvo mejor rendimiento de metano para las relaciones de 1, 1,35 y 2,3 gSV/gSV de S/I. Esto fue asociado a la actividad del lodo, sugiriendo que hay mayor cantidad de bacterias activas dentro de la estructura del lodo granular. La proximidad entre los diferentes grupos de bacterias, debido a la arquitectura y la distribución espacial que existe en el lodo granular favorece la actividad metabólica y el flujo de los productos y metabolitos intermediarios (Neves et al., 2004).

Según Angelidaki and Sanders (2004), un sustrato rico en proteínas, como lo es el guano de aves ponedoras, tiene un rendimiento teórico de metano de 0,496 LCH₄/gSV. El PBM del guano obtenido en este trabajo para los inóculos IA e I se encontró relativamente cercano a este valor de referencia.

La Figura 5 muestra el índice de biodegradabilidad (IB) en los inóculos IA e I, y para las diferentes relaciones S/I.

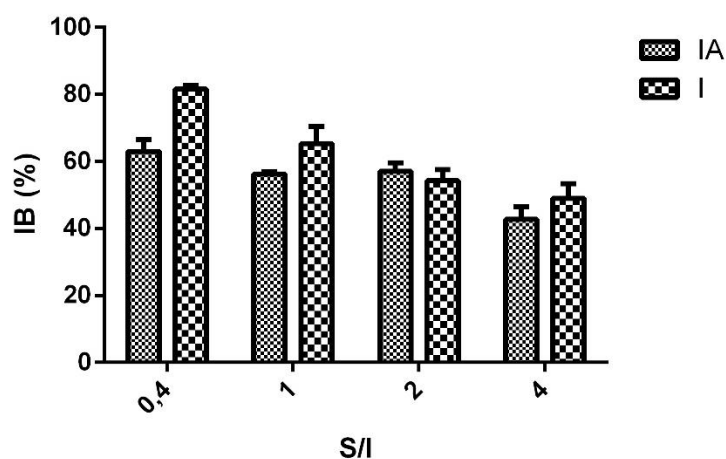


Figura 5. Índice de biodegradabilidad (IB) para las diferentes relaciones (S/I) en los sistemas IA e I.

En el sistema IA, el IB fue de 63, 56, 57 y 43% (con desvíos estándares menores al 4%) para las relaciones S/I de 0,4, 1, 2 y 4, respectivamente, donde sólo la máxima relación de S/I= 4, fue significativamente inferior al resto de las relaciones ($p < 0,05$). Hubo una tendencia hacia un mayor IB con la menor relación S/I, en concordancia con el máximo R alcanzado (PBM). Sin embargo, este valor de IB no fue significativamente superior con respecto al resto de las relaciones de S/I= 1 y 2 ($p > 0,05$).

En el sistema I, los valores de IB fueron $82 \pm 1\%$, $65 \pm 5\%$, $54 \pm 3\%$ y $49 \pm 5\%$ para las relaciones S/I de 0,4, 1, 2 y 4, respectivamente, siendo el IB de la relación S/I= 0,4 significativamente superior al resto de las relaciones evaluadas ($p < 0,05$). Por otro lado, no se encontraron diferencias significativas en los valores de IB ($p > 0,05$) entre las relaciones más altas evaluadas (2 y 4). Por lo tanto, el inóculo I, respondió con el mismo potencial metanogénico y con el mismo IB ante el agregado de mayor masa de guano (3,2 gSV para S/I= 2 y 7,5 gSV para S/I= 4).

La comparación entre ambos sistemas IA e I, mostró que el IB fue significativamente superior en I ($p < 0,05$) con las menores relaciones evaluadas (0,4 y 1 de S/I). Sin embargo, con las relaciones más altas (2 y 4 de S/I), ambos inóculos alcanzaron el mismo IB. Esto podría deberse a que el inóculo I disminuye su actividad cuando la carga orgánica es elevada, reduciendo así su capacidad de degradación y biodegradabilidad por el sustrato guano.

En relación a los resultados aquí mostrados sobre la producción de metano para ambos sistemas IA e I, se observó una mejor respuesta con el inóculo I bajo la misma relación S/I, con una mayor producción acumulada de metano y máximas velocidades de producción. En cuanto al R, el PBM y al IB, hay una marcada diferencia en el inóculo I, para las relaciones S/I más bajas utilizadas, sin embargo, cuando las concentraciones de sustrato son mayores, estas diferencias no son significativas, mostrando que ambos inóculos tienen la misma respuesta de potencial metanogénico y biodegradabilidad del sustrato.

Estas diferencias encontradas entre ambos inóculos en las relaciones S/I más bajas, podrían estar asociadas a la mayor actividad metanogénica específica (AME) encontrada en el inóculo I (0,13 gDQO/gSSV Vs 0,05 gDQO/gSSV). Si bien en ambos sistemas la concentración de inóculo fue la misma (5 gSSV/L), el inóculo I tuvo en esa concentración bacterias más activas que el inóculo IA. En un ensayo de PBM, donde se busca la máxima producción de metano por masa de sustrato, la actividad del inóculo podría ser una variable que impacta fuertemente en el resultado, y de mayor importancia que la

aclimatación o adaptación al sustrato. Similares resultados fueron encontrados por Li et al. (2013), donde el inóculo de una planta de tratamiento de aguas residuales tuvo mejor rendimiento de metano y biodegradabilidad del estiércol avícola que un inóculo de un reactor anaeróbico para el tratamiento de este mismo sustrato. También, Elbeshbishy et al. (2012) evaluaron la influencia del uso de dos inóculos de distintos orígenes en la degradación anaeróbica de residuos orgánicos domiciliarios. En concordancia con los resultados de este trabajo, estos autores encontraron que el inóculo de una planta de tratamiento de aguas residuales fue superior al inóculo de un reactor anaeróbico para el tratamiento de residuos orgánicos domiciliarios. Neves et al. (2004) estudió la influencia de la actividad de dos inóculos sobre la degradación anaeróbica de residuos orgánicos domiciliarios bajo diferentes relaciones I/S. Los resultados demostraron que el inóculo granular de una cervecería, con una AME de 0,35 LCH₄/gSSV.d, evitó la acidificación durante la degradación anaeróbica de este residuo, en un rango de relaciones de S/I= 0,5-2,3 gSV/gSV. Sin embargo, cuando se utilizó un inóculo suspendido con menor actividad (0,046 LCH₄/gSSV.d) se observó una menor velocidad de producción y biodegradabilidad bajo esas mismas relaciones, y una acidificación del sistema a 2,3 gSV/gSV. Sus resultados concluyen recomendando el uso de un inóculo granular en un ensayo de PBM debido a que maximiza la biodegradación de sustratos complejos como los residuos orgánicos domiciliarios.

Un estudio más reciente, realizado por De Vrieze et al. (2015), en concordancia con Neves, también sugiere el uso de lodos granulares en los ensayos de PBM, debido a que tienen mayor abundancia metanogénica y capacidad *buffer* comparados con otros inóculos.

Por otro lado, un estudio realizado por Koch et al. (2017), reveló que la naturaleza del inóculo no es una variable que influye en el PBM, pero la adaptación del inóculo al sustrato puede influir en la velocidad de producción de metano, donde los inóculos aclimatados al sustrato son favorables para degradar más rápidamente el sustrato, acortando los tiempos del ensayo. Sin embargo, estos autores no ponen en juego la influencia de las actividades metanogénicas específicas (AME) que pudieran tener cada uno de los inóculos evaluados. La discrepancia encontrada entre los resultados de Koch y este trabajo, refuerza la idea de que la actividad de los inóculos influye fuertemente en los ensayos de PBM, tanto en las velocidades de producción como en el rendimiento de metano.

En consideración de que la actividad del inóculo es un parámetro importante para un ensayo de PBM, Angelidaki and Sanders (2004) proponen que el volumen de inóculo a utilizar en este ensayo, debe ser calculado no solo a través del contenido de SSV, sino también considerando la actividad del inóculo y la constante cinética de hidrólisis.

Por otro lado, y en relación al uso de inóculos dispersos en un ensayo de PBM (como lo es el inóculo IA), debe considerarse que hay cierta incerteza en la determinación de los sólidos suspendidos volátiles para este tipo de muestras. En lodos provenientes de estiércoles digeridos, no puede distinguirse ni diferenciarse el contenido de biomasa microbiana con el contenido de materia orgánica particulada. Sin embargo, en un lodo granular, debido a su estructura y mayor densidad, la determinación de los SSV permite identificar el contenido neto de la biomasa microbiana (Angelidaki et al., 2009; Raposo et al., 2011). Consecuentemente, la concentración de biomasa en el inóculo IA (como gSSV) podría estar sobrestimada en este trabajo.

5.4.3. Análisis químico de la fase líquida

Alcalinidad, AGV e indicadores de estabilidad

En la Tabla 4, se muestra los resultados obtenidos al inicio y al final del ensayo en los sistemas IA e I para las diferentes relaciones evaluadas. Los valores obtenidos al inicio y al final del ensayo fueron comparados estadísticamente para cada parámetro (AP, AT y AGV).

Tabla 4. Alcalinidades y AGV (expresadas como mg/L) para las diferentes masas evaluadas en ambos sistemas (promedio \pm desvío estándar). Letras distintas muestran diferencias significativas entre el inicio y el final, con $p < 0,05$.

S/I	Inicial			Final		
	AP	AT	AGV	AP	AT	AGV
IA						
0,4	2100 \pm 141 ^a	2860 \pm 85 ^a	505 \pm 32 ^a	1400 \pm 40 ^b	1627 \pm 46 ^b	104 \pm 14 ^b
1	2060 \pm 85 ^a	3040 \pm 57 ^a	806 \pm 14 ^a	1520 \pm 69 ^b	1800 \pm 0 ^b	136 \pm 14 ^b
2	2300 \pm 141 ^a	3960 \pm 57 ^a	1404 \pm 17 ^a	2240 \pm 40 ^a	2693 \pm 23 ^b	168 \pm 24 ^b
4	3160 \pm 170 ^b	6440 \pm 57 ^a	3400 \pm 158 ^a	4893 \pm 23 ^a	5920 \pm 40 ^b	2210 \pm 33 ^b
Bco	2120 \pm 170 ^a	3060 \pm 85 ^a	324 \pm 119 ^a	920 \pm 113 ^b	1160 \pm 57 ^b	84 \pm 17 ^b
I						
0,4	525 \pm 35 ^b	625 \pm 35 ^b	99 \pm 38 ^a	1054 \pm 24 ^a	1240 \pm 7 ^a	108 \pm 0 ^a
1	825 \pm 35 ^b	975 \pm 35 ^b	150 \pm 59 ^a	1200 \pm 50 ^a	1433 \pm 29 ^a	142 \pm 34 ^a
2	825 \pm 35 ^b	1550 \pm 71 ^b	1236 \pm 25 ^a	1787 \pm 23 ^a	2213 \pm 23 ^a	1780 \pm 41 ^a
4	1025 \pm 247 ^b	2850 \pm 495 ^b	3120 \pm 738 ^a	3800 \pm 0 ^a	4450 \pm 71 ^a	447 \pm 81 ^b
Bco	150 \pm 0 ^b	200 \pm 0 ^a	27 \pm 4 ^a	540 \pm 28 ^a	640 \pm 0 ^a	430 \pm 10 ^a

Referencias. AT= alcalinidad Total; AP= alcalinidad parcial; AGV= ácidos grasos volátiles; Bco= blanco; IA= inóculo adaptado; I= inóculo sin adaptación.

En el sistema IA, se observó una reducción de la AT y los AGV al final del proceso para todas relaciones evaluadas, mostrando estadísticamente diferencias significativas entre el inicio y el final del ensayo ($p < 0,05$). Esto significa que los carbonatos y los AGV fueron consumidos durante el proceso degradativo. Con respecto a la AP, hubo una significativa reducción de este parámetro para las relaciones de S/I= 0,4 y S/I= 1 ($p < 0,05$), y un significativo incremento para la relación S/I= 4 ($p < 0,05$) al final del proceso. El incremento en la AP para la mayor relación, podría estar asociado a la inhibición reversible observada en la curva de rendimiento de metano, donde el sistema respondió generando *buffers* bicarbonatos para equilibrar y compensar la alta concentración de AGV. Por otro lado, el sistema IA presentó inicialmente concentraciones altas de AT, AP y AGV. Probablemente, esto favoreció la estabilidad del proceso, donde los *buffers* generados durante el proceso degradativo y los *buffers* propios de la biomasa fueron consumidos durante el proceso, para compensar la alta concentración de los AGV iniciales.

En el sistema I, se observó un incremento significativo de la AP y AT al final del proceso para todas las relaciones evaluadas ($p < 0,05$). En comparación con el sistema IA, se observó una respuesta diferente, donde los carbonatos y bicarbonatos se incrementaron al final de proceso. En particular, hubo un gran incremento para la mayor relación utilizada (S/I= 4), generándose un 73% más de bicarbonatos (AP) en relación a la concentración inicial del ensayo. La degradación de proteínas del estiércol, conduce a un incremento del nitrógeno amoniacal y consecuentemente al incremento de la alcalinidad por bicarbonato (Herrmann et al., 2011; Kafle and Chen, 2016; Raposo et al., 2006). Con respecto a los AGV, no se observaron diferencias significativas en las menores relaciones de S/I ($p > 0,05$) pero sí hubo un incremento significativo para la relación S/I= 2 y una reducción significativa de este parámetro para la relación S/I= 4 al final del ensayo ($p < 0,05$). El incremento de los AGV al final del proceso encontrado en S/I= 2 podría estar indicando cierta inestabilidad en el sistema, donde los carbonatos y bicarbonatos no fueron suficientes para consumir y amortiguar las concentraciones de AGV en el sistema. En cuanto a la relación S/I= 4, donde se observó un gran incremento de la AP y una significativa reducción de los AGV, mostró un desarrollo del proceso en condiciones estables. Kafle y Chen (2016) y Raposo et al. (2006), encontraron resultados similares en su trabajo, donde la alcalinidad total se incrementó significativamente al final del ensayo de PBM, atribuyendo este efecto al aporte del nitrógeno amoniacal sobre la alcalinidad

cuando el sustrato es rico en proteínas y también encontraron una reducción de los AGV al final del proceso.

Para evaluar la estabilidad en cada sistema, se utilizó el indicador *alfa*, que relaciona ambas alcalinidades (AP/AT) y la relación AGV/AT para cada sistema IA e I (Figura 6). Cuando los valores de *alfa* se encuentran comprendidos entre 0,6-0,9 y la relación AGV/AT es menor a 0,3-0,4 indican condiciones de estabilidad en el sistema anaeróbico (marcados como línea punteada negra en la Figura).

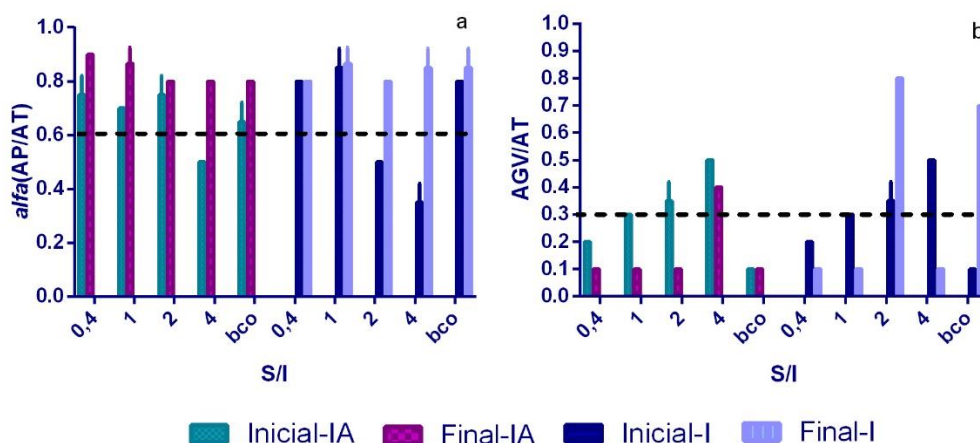


Figura 6. Indicadores *alfa* y AGV/AT al inicio y al final del ensayo para las diferentes relaciones en ambos sistemas IA e I.

En el sistema IA se observó que, a excepción de la relación S/I= 4, todas las relaciones mostraron un valor *alfa* por encima de los valores de referencia al inicio y al final del ensayo, indicando que el proceso degradativo anaeróbico ocurrió en condiciones estables en cada sistema (Figura 6 a). La relación más alta, con S/I= 4, mostró estar en condiciones críticas al inicio del ensayo (valor *alfa*< 0,6 y valor AGV/AT> 0,4). Sin embargo, al finalizar el proceso el sistema lograría reponerse, con un valor *alfa*> 0,8, pero un valor de AGV/AT= 0,4, mostrando cierta incertidumbre en cuanto a la estabilidad del proceso. Sumado al análisis de la fase gaseosa, esto podría estar indicando que, si bien hubo una inhibición reversible, donde las bacterias respondieron reactivándose, generando metano y compuestos *buffer* para equilibrar el sistema, la relación S/I= 4 no sería recomendable ya que generó cierta inestabilidad en el proceso degradativo anaeróbico.

En el sistema I, se observó que las mayores relaciones S/I= 2 y S/I= 4 arrancaron el ensayo en condiciones críticas de estabilidad, según los indicadores *alfa* y AGV/AT. Sin embargo, al final del ensayo, la relación S/I= 4, logró desarrollar el proceso anaeróbico

en condiciones estables., con valores de $\alpha > 0,8$ y $AGV/AT < 0,3$. Asociando estos indicadores con los resultados observados de las alcalinidades y los AGV en $S/I = 4$, puede decirse que, si bien el sistema no arrancó en las mejores condiciones, respondió generando suficiente *buffer* (altas concentraciones de AP y AT) y consumiendo los AGV en forma estable y equilibrada, reflejado esto en los dos indicadores de estabilidad. Por el contrario, el sistema con la relación $S/I = 2$, que arrancó el ensayo en condiciones críticas, mostró valores AGV/AT muy superiores a los valores de referencia ($AGV/AT > 0,8$), evidenciando inestabilidad en el proceso anaeróbico. Evidentemente no hubo suficiente capacidad *buffer* para compensar la concentración de los AGV en esta relación.

Materia orgánica

En la Tabla 5 se muestran los porcentajes de remoción de materia orgánica calculados a través de los valores de DQO_t , DQO_s y los SV al inicio y al final del ensayo para cada sistema IA e I.

Tabla 5. Remoción de la materia orgánica (promedio \pm desvío estándar). Letras distintas implican diferencias significativas con $p < 0,05$ entre las diferentes relaciones S/I para cada sistema IA e I.

S/I	DQOt (%R)	DQOs (%R)	SV (%R)
IA			
0,4	49,2 \pm 3,9 ^{ab}	79,7 \pm 0,4 ^{ab}	42,8 \pm 1,8 ^{ab}
1	37,1 \pm 5,7 ^{ab}	79,7 \pm 0,7 ^{ab}	52,5 \pm 2,4 ^{ab}
2	58,6 \pm 3,2 ^{ab}	83,4 \pm 0,6 ^{ab}	50,8 \pm 5,0 ^{ab}
4	63,5 \pm 0,7 ^a	90,3 \pm 0,6 ^a	65,4 \pm 0,6 ^a
Bco	7,1 \pm 11,0 ^b	60,2 \pm 3,2 ^b	17,3 \pm 9,2 ^b
I			
0,4	52,8 \pm 10,6 ^a	85,5 \pm 2,4 ^a	39,9 \pm 3,2 ^a
1	55,9 \pm 1,8 ^a	93,3 \pm 1,9 ^a	48,9 \pm 2,6 ^a
2	46,0 \pm 3,0 ^a	87,3 \pm 1,8 ^a	50,3 \pm 1,8 ^a
4	15,5 \pm 3,0 ^b	89,0 \pm 0,8 ^a	51,4 \pm 2,9 ^a
Bco	29,0 \pm 10,8 ^a	70,7 \pm 6,6 ^a	26,3 \pm 2,6 ^a

Referencias. R= remoción; IA= inóculo adaptado; I= inóculo sin adaptación; Bco= blanco

En el sistema IA, pudo observarse una reducción de la DQO total y de los SV entre el 37-64% (promedio= 52%) y entre el 43-65% (promedio= 53%), respectivamente. Se considera una conversión típica de SV entre el 40-50% para estiércol vacuno y entre un 55-65% para estiércol de cerdo (Angelidaki et al., 2011). Los valores aquí encontrados se encuentran dentro de este rango reportado para estiércoles. Asimismo, la DQO_s tuvo un alto porcentaje de remoción (80-90%) para todas las relaciones evaluadas. El análisis

estadístico mostró que no hubo diferencias significativas de remoción de SV, DQO_t y DQO_s para todas las relaciones evaluadas ($p > 0,05$).

En el sistema I, hubo una remoción de los SV entre el 40-51% (promedio= 48%) para todas las relaciones evaluadas, no encontrándose diferencias significativas entre las relaciones evaluadas. La remoción de la DQO_t se encontró entre el 46-56% (promedio= 52%), sin diferencias significativas para las relaciones S/I de 0,4, 1 y 2 ($p > 0,05$). El valor de remoción de la DQO_t en S/I= 4 fue significativamente más bajo que el resto de las relaciones evaluadas, con solo un 16% de remoción. El % de reducción de la DQO_s se encontró entre 85-93% para las diferentes relaciones, no encontrándose diferencias significativas. Con respecto a la muestra blanco, se observaron valores altos de remoción para estas tres variables analizadas. Esto evidencia la presencia de materia orgánica remanente en el inóculo que es degradada bajo las nuevas condiciones ambientales generadas por el ensayo, en concordancia con el apreciable volumen de metano producido durante el ensayo.

Los sistemas IA e I fueron comparados estadísticamente para los parámetros DQO_t, DQO_s y SV (resultados no mostrados en la tabla) para cada relación de S/I. Los resultados mostraron que no hubo diferencias significativas entre cada relación S/I evaluada para estas variables ($p > 0,05$), mostrando que se comportan de forma similar degradando la materia orgánica bajo una misma relación S/I.

Por otro lado, vale destacar que las técnicas de DQO total y SV presentaron altos desvíos estándares. Técnicamente resulta difícil tomar una muestra representativa en los lodos, principalmente en lodos granulares, debido a su estructura, a su rápida sedimentación y a sus características de heterogeneidad. Por ello, sería recomendable utilizar la DQO soluble como parámetro de medición de la remoción de la materia orgánica.

Compuestos nitrogenados

En la Tabla 6 se muestran los resultados obtenidos de NTK, N-NH₃ (NAT) y pH para las diferentes relaciones evaluadas en cada sistema IA e I, al inicio y al final del ensayo.

En el sistema IA, se observó una marcada tendencia hacia la reducción de los valores de NTK para todas las relaciones y una tendencia hacia la reducción del NAT en las relaciones S/I de 0,4, 1 y 2. Sin embargo, en el sistema con la relación más alta (S/I= 4) se observó un incremento significativo ($p < 0,05$) de esta variable NAT al final del ensayo. Esta respuesta diferente, está en concordancia con el mayor valor de pH observado al final del proceso, el cual favorece la formación del nitrógeno amoniacal acuoso y con el incremento de la alcalinidad parcial (Tabla 4).

En el sistema I, se observó que los valores de NTK son similares al inicio y final del ensayo, con el mismo orden de magnitud, sin diferencias significativas ($p > 0,05$). En cuanto al NAT, se observó una tendencia hacia una mayor concentración de este compuesto en todas las relaciones evaluadas, en particular para la mayor relación S/I=4. Sin embargo, estas diferencias no son estadísticamente significativas.

La comparación entre ambos sistemas mostró que, en principio, las concentraciones iniciales de los compuestos nitrogenados como NTK y NAT en el inóculo IA son significativamente mayores al inóculo I para todas las relaciones evaluadas ($p < 0,05$). Esto es debido a que el inóculo IA se alimentó con guano de aves ponedoras, compuesto por altas concentraciones de N, y que como producto de su degradación se libera NAT al medio. Así esta biomasa está pre-aclimatada a concentraciones más altas de nitrógeno que la biomasa granular I.

Tabla 6. Compuestos nitrogenados (NTK y NAT expresados como mg/L) y pH para las diferentes relaciones S/I en cada sistema IA e I al inicio y al final del ensayo (promedio \pm desvío estándar). Letras distintas implican diferencias significativas con $p < 0,05$ entre el inicio y final para cada relación S/I en cada sistema.

S/I	Inicial			Final		
	NTK	NAT	pH	NTK	NAT	pH
IA						
0,4	1257 \pm 52 ^a	734 \pm 34 ^a	7,0 \pm 0,0	975 \pm 64 ^a	702 \pm 47 ^a	7,1 \pm 0,0
1	1480 \pm 4 ^a	843 \pm 138 ^a	7,0 \pm 0,1	1094 \pm 17 ^a	811 \pm 14 ^a	7,1 \pm 0,0
2	1843 \pm 181 ^a	1445 \pm 278 ^a	7,0 \pm 0,1	1508 \pm 13 ^a	1116 \pm 14 ^a	7,2 \pm 0,1
4	3010 \pm 76 ^a	1738 \pm 121 ^a	7,0 \pm 0,0	1720 \pm 805 ^a	2152 \pm 50 ^b	7,6 \pm 0,1
Bco	965 \pm 55 ^a	585 \pm 8 ^a	7,0 \pm 0,0	775 \pm 7 ^a	506 \pm 66 ^a	7,3 \pm 0,0
I						
0,4	894 \pm 49 ^a	354 \pm 4 ^a	7,0 \pm 0,0	849 \pm 73 ^a	527 \pm 7 ^a	6,8 \pm 0,0
1	1085 \pm 129 ^a	422 \pm 48 ^a	7,0 \pm 0,1	1035 \pm 193 ^a	607 \pm 23 ^a	6,9 \pm 0,1
2	1463 \pm 31 ^a	715 \pm 28 ^a	7,0 \pm 0,1	697 \pm 95 ^a	856 \pm 48 ^a	7,2 \pm 0,1
4	2469 \pm 259 ^a	1213 \pm 7 ^a	7,0 \pm 0,0	2515 \pm 47 ^a	1780 \pm 37 ^a	7,3 \pm 0,1
Bco	643 \pm 142 ^a	217 \pm 30 ^a	7,0 \pm 0,0	329 \pm 20 ^a	310 \pm 11 ^a	7,0 \pm 0,1

Referencias. IA= inóculo adaptado; I= inóculo sin adaptación; Bco= blanco

Para estudiar la evolución del NAT en el tiempo, se tomaron muestras del líquido a diferentes tiempos. A partir del NAT, se calculó el nitrógeno amoniacal libre (NAL) que es el compuesto tóxico para las bacterias metanogénicas. Los resultados de NAT, NAL y pH en el tiempo son mostrados en la Figura 7.

En el sistema IA, el NAT se mantuvo aproximadamente constante en el tiempo para todas las relaciones evaluadas, a excepción de la relación de S/I= 4, en la cual se incrementó a

lo largo del tiempo (Figura 7 a). En cuanto al NAL (Figura 7 b), se observó un importante incremento a los 7 d para la relación de S/I= 1 y el blanco, decayendo luego en el tiempo para alcanzar concentraciones de $NAL < 20$ mg/L. Este incremento de la concentración está asociado con el incremento del pH por encima de los 7,8. Las curvas de NAL en el tiempo fueron similares en las relaciones S/I= 0,4 y S/I= 2, mostrando un comportamiento similar en el tiempo. Ambas curvas, alcanzaron valores máximos a los 25 d, y luego la concentración comienza a decaer hasta alcanzar valores < 20 mg/L al final del ensayo. En cuanto a la máxima relación utilizada (S/I= 4), el comportamiento fue muy diferente: la concentración comenzó a incrementarse a partir de los 17 d hasta alcanzar valores cercanos a los 100 mg/L al final del ensayo.

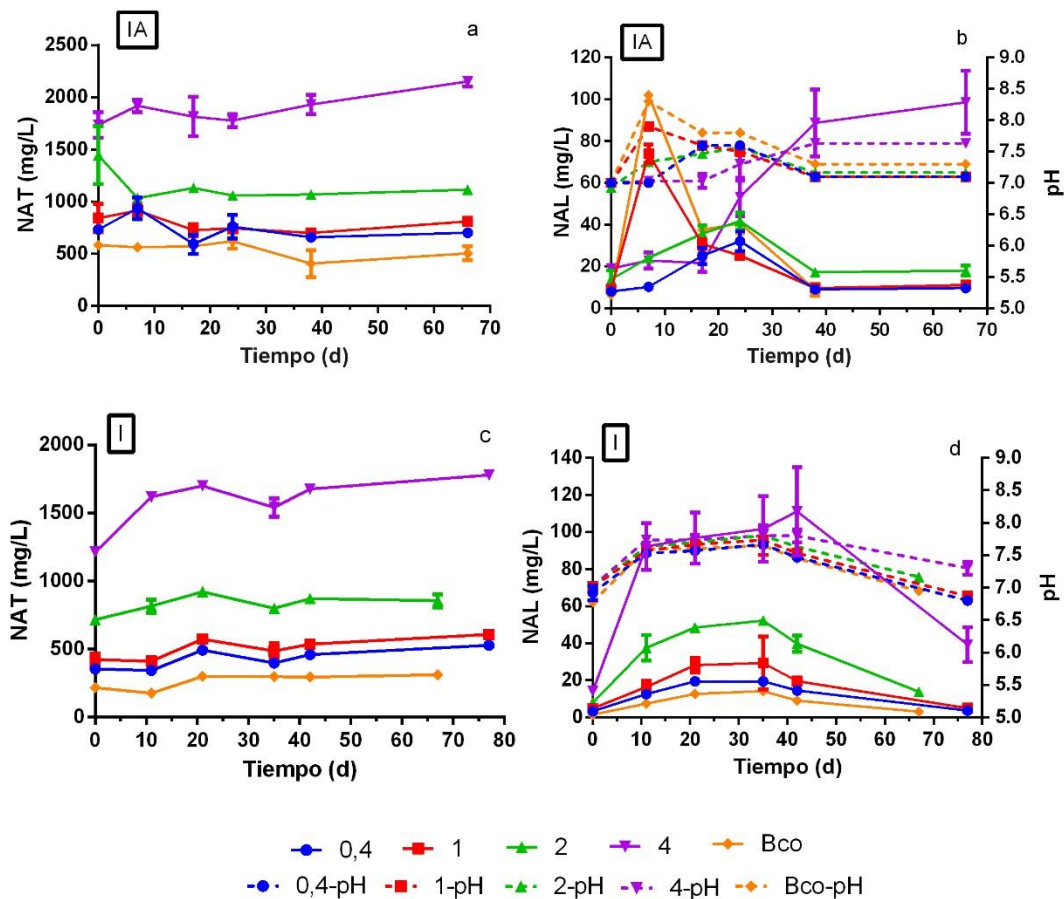


Figura 7. Compuestos nitrogenados NAT y NAL en los 5 muestreos realizados en el tiempo para IA e I y las diferentes relaciones S/I; Concentración de NAT en el tiempo para las diferentes relaciones S/I en el sistema IA (a) e I (c); Concentración de NAL y pH en el tiempo para las diferentes relaciones S/I en el sistema IA (b) e I (d).

En el sistema I, el NAT (Figura 7 c) se mantuvo aproximadamente constante en el tiempo para todas las relaciones evaluadas, con excepción de la relación S/I= 4, donde hubo un incremento el día 10 para luego mantenerse aproximadamente constante (min. 1500 mg/L

y max. 1800 mg/L). Este incremento está asociado a la liberación de este compuesto al medio como producto de la degradación del sustrato guano por las bacterias anaeróbicas. En cuanto al NAL (Figura 7 d), se observaron valores máximos durante los 20 d y 35 d del ensayo para las relaciones S/I de 0,4, 1 y 2 y el blanco, decayendo luego la concentración en el tiempo, para alcanzar valores < 10 mg/L. En la relación de S/I= 4 se observó un incremento importante de la concentración a los 10 d del ensayo, en concordancia con el incremento de la concentración de NAT. Luego se mantiene aproximadamente constante (min. 92 mg/L y max. 111 mg/L), para decaer a partir de los 42 d, alcanzando valores cercanos a los 40 mg/L al final del ensayo. En relación al pH, se observa el mismo comportamiento que las curvas de NAL, mostrando la dependencia con esta variable.

La comparación entre ambos sistemas, mostró que hubo una tendencia similar en las curvas de NAT en el tiempo, donde la concentración dependerá de la concentración del sustrato y de los valores iniciales en cada relación S/I, manteniéndose aproximadamente constantes en el tiempo. En cuanto al NAL, hay una tendencia hacia mayores concentraciones en los primeros días del ensayo en ambos sistemas, alcanzando valores máximos hasta los 25 d para IA y hasta los 35 d para I en todas las relaciones evaluadas, con excepción de S/I= 4. En el sistema con la máxima relación utilizada, la respuesta en cuanto al NAL fue marcadamente diferente en ambos sistemas. A pesar de haber alcanzado en ambos sistemas valores cercanos a 100 mg/L, solo en el sistema I la concentración disminuye hasta valores muy inferiores (< 40mg/L). Parecería ser que el inóculo I, a diferencia del inóculo IA, respondió eliminando esa concentración alta del medio.

5.5. Resumen y Conclusiones

La evaluación de la influencia de las diferentes relaciones S/I sobre el proceso degradativo anaeróbico del guano de aves ponedoras mostró los siguientes resultados y conclusiones:

En el sistema IA

- 1- La relación S/I= 0,4 respondió teniendo el máximo rendimiento de metano, es decir el PBM, con una buena calidad de biogás (con 65% de CH₄ y 35% de CO₂ aproximadamente) y alto % de biodegradabilidad, con presencia de bicarbonatos y carbonatos y bajos valores de AGV que mantienen condiciones estables en el

sistema, con compuestos nitrogenados altos pero que se mantienen aproximadamente constantes, y con valores bajos de NAL. El análisis de todas estas variables evidencia que esta relación fue la más eficiente en la degradación del guano de aves ponedoras.

- 2- Las relaciones de $S/I= 1$ y 2 parecerían responder de forma similar, no encontrándose diferencias marcadas en cuanto al R, calidad de biogás y % de biodegradabilidad.
- 3- La más alta relación evaluada, $S/I= 4$, mostró ser el sistema menos estable, con una inhibición de la producción de metano al principio y velocidades máximas recién a los 20 d del ensayo. Sin embargo, el sistema logra reponerse al final del proceso (presencia de bicarbonatos y carbonatos y bajas concentraciones de AGV, con indicadores de estabilidad dentro del rango de referencia), a pesar de haber alcanzado los mayores valores de NAL. Si bien no hubo cese de la producción de metano, se encontró el menor R, con menor calidad de biogás (59% de CH_4 y 41% de CO_2) con respecto al resto de los sistemas evaluados. Por otro lado, se observó una tendencia hacia mayores valores de NAT, NAL y pH, generando condiciones no adecuadas para las bacterias anaeróbicas. El análisis de todas estas variables evidencia que esta relación para el inóculo IA no sería la más adecuada para utilizar en un ensayo de PBM del guano de aves ponedoras.

En el sistema I:

- 1- En relación a la producción de metano, se observó que el sistema con la menor relación $S/I= 0,4$ respondió teniendo el máximo R (PBM), con una buena calidad de biogás (con 67% de CH_4 y 33% de CO_2 aproximadamente) y la mayor biodegradabilidad. En relación al análisis de las variables analizadas en el líquido, este sistema mostró una buena remoción de la materia orgánica, aportando alcalinidad al sistema como producto de la degradación del guano y manteniendo la concentración de AGV en un valor bajo, con los dos indicadores (*alfa* y AGV/AT) que muestran condiciones estables del sistema. En cuanto a los compuestos nitrogenados, las concentraciones fueron bajas y se mantuvieron aproximadamente estables.
- 2- Las relaciones más altas, $S/I= 2$ y $S/I= 4$ mostraron tener el mismo R y biodegradabilidad de sustrato, con valores bajos (260-290 mL CH_4 /gSV y 50% de IB). La relación $S/I= 2$, mostró una AGV/AT crítica, por lo que evidentemente la capacidad *buffer* no fue suficiente para compensar los AGV. En el sistema con la

máxima relación S/I, se observó condiciones estables al final del proceso. El análisis de estas variables evidencia que estas dos relaciones no serían recomendables para un ensayo de PBM para la degradación del guano de aves ponedoras.

La evaluación de la influencia de dos inóculos de orígenes y actividades metanogénicas específicas diferentes sobre el proceso degradativo anaeróbico del guano de aves ponedoras, bajo una misma relación S/I, mostró los siguientes resultados y conclusiones:

- 1- El PBM y el mayor IB fue logrado con la relación $S/I= 0,4$ en ambos sistemas, siendo estos valores superiores en el inóculo no aclimatado (I). Asimismo, el inóculo I presentó una mayor velocidad de producción, respondiendo más rápidamente en la degradación del guano y consecuentemente reduciendo los tiempos del ensayo de PBM. La actividad del inóculo tiene mayor influencia que la aclimatación al tipo de sustrato, obteniéndose un 30% menos de PBM utilizando un inóculo aclimatado (IA).
- 2- Cuando las relaciones de S/I son más altas ($S/I= 2$ y 4) no hubo influencia del origen y actividad del inóculo, ya que ambos responden generando el mismo potencial metanogénico y biodegradabilidad del residuo.
- 3- En relación a las variables fisicoquímicas, el inóculo I responde generando *buffers*, manteniendo valores bajos de AGV y con concentraciones de NTK, NAL y NAT bajas y menores a las encontradas en el inóculo IA.

La implementación de esta metodología permitió calcular el PBM del guano de aves ponedoras, y evaluar la influencia del origen y la AME del inóculo en este tipo de ensayo. El TRH, una variable de diseño importante para la construcción de una planta de biogás, puede estimarse mediante este ensayo, sabiendo que el 75% del volumen total de metano producido fue generado durante los primeros 30 días. Asimismo, este ensayo permitió conocer el PBM utilizando un inóculo aclimatado, el cual podrá utilizarse para estimar el rendimiento máximo de metano en una planta de biogás que utiliza biomasa aclimatada al sustrato como una estrategia de optimización del proceso anaeróbico. Sin embargo, para un ensayo de PBM, se recomienda utilizar inóculos con alta actividad microbiana ya que maximizan el potencial metanogénico de un residuo. La influencia de las diferentes relaciones S/I es compleja, y en efecto, se recomienda aplicar más de dos relaciones S/I para asegurar un resultado confiable de PBM.

***6. Ensayo de potencial bioquímico
metanogénico: proceso de co-
digestión del guano***

6.1. Introducción

Una de las herramientas más utilizadas para superar la inhibición por amoníaco en la digestión anaeróbica es la co-digestión. Mediante el uso de esta herramienta, el guano de aves ponedoras puede ser mezclado con otros sustratos con contenido alto de carbono para incrementar principalmente la relación C/N. Si bien la relación C/N no es un parámetro crucial para la digestión anaeróbica, sí lo son las concentraciones altas de nitrógeno. El ajuste de la relación C/N en la materia prima o sustrato de carga, permite regular las concentraciones de nitrógeno amoniacal en el proceso, debido a que disminuye los niveles de nitrógeno (Fuchs et al., 2018). Por otro lado, la co-digestión es una de las técnicas más fáciles de implementar, y una de las más efectivas en cuanto a su relación costo-beneficio que permite reducir la toxicidad por amoníaco (Chen et al., 2014; Rajagopal et al., 2013).

Varios investigadores han evaluado diferentes co-sustratos con el guano de aves ponedoras en reactores *batch* y en semi-continuos. Se ha estudiado la co-digestión del guano con trigo, arroz y paja (Bayrakdar et al., 2017; Rahman et al., 2017), rastrojos de maíz (Li et al., 2013b), residuos orgánicos domiciliarios (Matheri et al., 2017), residuos de comida (Wang et al., 2014), lodos de aguas residuales (Borowski and Weatherley, 2013), ensilaje de maíz (Sun et al., 2016), hierbas marinas y microalgas (C. Li et al., 2017; R. Li et al., 2017). Generalmente la elección del co-sustrato ha sido simplificada en la optimización de la relación C/N pero el efecto combinado de otros parámetros tales como macro y micronutrientes, pH, alcalinidades, inhibidores y compuestos tóxicos, la materia orgánica húmeda y seca, han sido escasamente estudiados (Fuchs et al., 2018; Mata-Alvarez et al., 2014).

Los co-sustratos preferentemente seleccionados para estiércoles son los residuos agroindustriales, seguido de los residuos sólidos domiciliarios (Mata-Alvarez et al., 2014). Esto es debido principalmente a su alta disponibilidad, a que tienen grandes cantidades de materia orgánica fácilmente biodegradable y su alta relación C/N. Por otro lado, tiene baja capacidad *buffer* y dependiendo de su biodegradabilidad, pueden producir altas concentraciones de AGV durante el proceso degradativo. En contraste, los estiércoles y en particular el guano de aves ponedoras, se caracterizan por tener baja relación C/N y alta capacidad *buffer* (Mata-Alvarez et al., 2011; Wang et al., 2012).

Si bien los sustratos agroindustriales son los de mayor conveniencia, la necesidad de superar la problemática de la estacionalidad, conduce al estudio y la evaluación de otro

tipo de sustratos. Los residuos orgánicos domiciliarios o los residuos de frutas y verduras presentan una alta disponibilidad continua, representando además una gran problemática a nivel mundial por los grandes volúmenes generados y la inadecuada gestión y tratamiento.

6.2. Objetivo

En relación a lo expuesto, se planteó el objetivo específico 4 de esta tesis:

4- Evaluar la co-digestión del guano de aves ponedoras utilizando residuos de frutas y verduras y estiércol vacuno como co-sustratos, a fin de mejorar el rendimiento de biogás y metano y reducir la presencia de potenciales inhibidores del proceso anaeróbico.

6.3. Materiales y Métodos

Diseño experimental y condiciones iniciales

Se utilizaron los mismos reactores y se siguió el mismo procedimiento descrito anteriormente en el ensayo de potencial bioquímico metanogénico (PBM), sobre la influencia del origen del inóculo a diferentes concentraciones de sustrato guano.

El inóculo utilizado en este ensayo fue recolectado de una planta de tratamiento de efluente de jarabe de maíz, de un reactor UASB mesofílico, con características granulares (Figura 1). Se determinó la AME del inóculo dando un valor de 0,18 gDQO/gSV.d. Luego, el inóculo fue caracterizado y conservado en heladera hasta su uso.



Figura 1. Lodo proveniente de una planta de jarabe de maíz. Puede observarse sus características granulares.

Por falta de accesibilidad y de disponibilidad, no pudo utilizarse el mismo inóculo que en el ensayo anterior, el inóculo I, el cual había mostrado condiciones óptimas del desarrollo del proceso para la relación S/I= 0,4 (I= inóculo sin aclimatación al sustrato, proveniente de un reactor IC para el tratamiento de efluente cervecero). Sin embargo, se utilizó como referencia esta relación para el nuevo inóculo, debido a que éste presentó características similares, con alta actividad y del tipo granular.

Se eligieron como co-sustratos residuos de frutas y verduras (FV) y estiércol vacuno (V). El residuo FV, fue recolectado de diferentes verdulerías, cuya composición fue la siguiente (% m/m en peso húmedo): 17,6 % de berenjenas negras, 13,3 % de hojas de brócoli, 11% de tomate, 3,9% de hojas de lechuga morada, 6,1% de hojas verdes (rúcula, lechuga), 3,2% de manzana, 7,5% de pera, 3,6% de morrón rojo, 3,4% de morrón verde, 7% de naranja, 2,7% de chaucha, 6,1% de cebolla, 5,8% de zapallitos y 9% de choclo. Luego, la mezcla de residuos, fue triturada con un mixer marca Dynam, con 750 W de potencia. El estiércol vacuno fue recolectado de los boxes de un establecimiento ubicado dentro del predio INTA-Castelar, con cría extensiva, por lo que la base del alimento es pastoril. Ambos residuos fueron homogenizados, fraccionados en tres réplicas, y conservados en heladera hasta su uso. El % de SV de cada residuo se realizó luego de la homogenización y por sexto-duplicado. En la Figura 2 a y b se muestra una foto del residuo FV (antes de su trituración por mixer) y del estiércol vacuno, respectivamente.



Figura 2. Co-sustratos utilizados en el ensayo. a) Residuo de frutas y verduras (FV), previo a la trituración. b) Estiércol vacuno (V) homogenizado

Los tratamientos fueron realizados con diferentes diluciones de co-sustrato, manteniendo siempre la relación 0,4 gSV/gSSV, y la misma concentración de inóculo. En la Tabla 1

se muestran los tratamientos de este ensayo, con las diferentes relaciones utilizadas entre sustrato: co-sustrato, expresadas como %.

Tabla 1. Relación sustrato: co-sustrato para cada sistema

Sistemas	Sustrato	Co-sustrato
G	100% guano (G)	0% co-sustrato
GV25	75% guano (G)	25% vacuno (V25)
GV50	50% guano (G)	50% vacuno (V50)
GFV25	75% guano (G)	25% de frutas y verduras (FV25)
GFV50	50% guano (G)	50% frutas y verduras (FV50)
Blanco (B)	0%	0%

Determinaciones analíticas

El lodo, los sustratos y las muestras líquidas (inóculo + sustrato) del ensayo fueron caracterizados mediante la determinación de variables fisicoquímicas. Se analizaron las variables pH, AGV, AP, AT, ST, SV, DQO_t, DQO_s, NTK, N-NH₃ en los inóculos, en los sustratos y en las muestras líquidas al inicio y al final del ensayo. Además, se determinó los SST y SSV en el inóculo para su caracterización. El nitrógeno amoniacal total (NAT) y el pH fueron medidos periódicamente en la muestra líquida (seis muestreos) para determinar su evolución en el tiempo. A través de estas dos variables y la temperatura de incubación, se calculó el nitrógeno amoniacal libre (NAL). Todas las variables fueron determinadas según métodos descritos en el capítulo “métodos analíticos” de esta tesis. El volumen de biogás se determinó mediante la presión generada en el *headspace* del reactor, utilizándose un transductor de presión. La determinación del CH₄ y CO₂ se realizó por cromatografía gaseosa. Una vez medido el volumen de biogás y CH₄, el reactor es despresurizado, llevándolo a presión atmosférica (P= 1,013 bares).

La metodología empleada, los cálculos de producción y rendimiento de biogás y metano fueron los mismos que los aplicados en el capítulo anterior sobre la determinación del potencial bioquímico metanogénico.

Mediante la Ley de Gases Ideales, y bajo condiciones normales de presión y temperatura (273 K y 1 atm), el volumen de CH₄, CO₂ y biogás producido se calculó según las siguientes expresiones:

$$V_{CH_4} = \frac{P_m \times V_h \times T_{CE}}{P_{CE} \times T_i} \times \frac{C_{CH_4}}{100}$$

$$V_{CO_2} = \frac{P_m \times V_h \times T_{CE}}{P_{CE} \times T_i} \times \frac{C_{CO_2}}{100}$$

$$V_{biogás} = V_{CH_4} + V_{CO_2}$$

Dónde:

V_{CH_4} = volumen de metano producido en condiciones estándares (mL)

P_m = incremento de la presión (bar)

V_h = volumen del *headspace* (mL)

T_{CE} = temperatura en condiciones estándares (273 K)

P_{CE} = presión en condiciones estándares (1,013 bar)

T_i = temperatura de incubación de cada reactor (K)

C_{CH_4} = concentración de metano calculada por cromatografía gaseosa (%)

C_{CO_2} = concentración de dióxido de carbono calculada por cromatografía gaseosa (%)

$V_{biogás}$ = volumen de biogás producido en condiciones estándares (mL)

El PBM se calculó según:

$$PBM \left(\frac{mLCH_4}{gSV} \right) = \frac{V_{CH_4} \text{acumulado}(mL)}{m}$$

Dónde:

PBM= potencial bioquímico metanogénico expresado en mLCH₄/gSV

V_{CH_4} acumulado= el máximo volumen de metano acumulado durante todo el período ensayado (mL)

m = masa de sustrato agregada (mezcla de guano + co-sustrato) (gSV).

El PBM teórico (PBM_t) se calculó considerando que por cada g de DQO de sustrato agregado al sistema se transforman 350 mL de CH₄ en CNPT:

$$PBM_t \left(\frac{mLCH_4}{gSV} \right) = \frac{DQO \times 350}{m}$$

Dónde:

DQO= suma de la masa de sustrato y la masa de co-sustrato agregada al sistema (gDQO agregados)

350= es el factor de conversión, 350 mL de CH₄/gDQO

m= suma de la masa de sustrato y la masa de co-sustrato agregada al sistema (gSV agregados).

El volumen total producido por la muestra blanco fue considerado, restando este valor al volumen de metano acumulado durante todo el período ensayado para cada sistema.

El índice de biodegradabilidad se calculó según ecuación descrita en el capítulo anterior de esta tesis.

Se realizó un análisis de microorganismos patogénicos en las muestras iniciales y finales de cada tratamiento. Se cuantificaron coliformes fecales y *E coli* por el método del número más probable y se determinó ausencia o presencia de *Salmonella*, siguiendo las metodologías descritas en el capítulo “métodos analíticos” de esta tesis.

Análisis estadístico

Los promedios de las variables fueron comparados entre los diferentes tratamientos mediante el test ANOVA de una vía ordinaria, utilizando el test de Tuckey como test de comparaciones múltiples. Cuando no fue satisfactoria la normalidad y homocedácea se utilizó el test no paramétrico Kruskal-Wallis. Los promedios de las variables al inicio y al final para cada tratamiento fueron analizados por el t-test y por el test no paramétrico Mann-Whitney, cuando no cumplían los supuestos de normalidad y homocedácea. Se consideró un nivel de significancia del 5% en todos los casos. El análisis estadístico fue realizado por el GraphPad Prism®, version 6.01.

6.4.Resultados y Discusión

6.4.1. Características de los residuos y el inóculo

En la Tabla 2, se muestra la caracterización de cada residuo y del inóculo utilizado en este ensayo.

El guano presentó altos valores de materia orgánica y alto contenido de NTK, donde el N-NH₃ representa el 63% del total. Tal como se esperaba, este guano presenta características muy similares a las encontradas en el guano utilizado en el ensayo anterior, ya que el origen es el mismo.

En cuanto a los co-sustratos, puede destacarse que presentaron valores de pH bajos, por debajo del valor recomendado para las bacterias anaeróbicas (6,5-7,5), y valores de C/N más altos que el guano. Se espera que estas características favorezcan la digestión anaeróbica del guano, que presenta alto valor de pH y la más baja relación de C/N.

Tabla 2. Características de cada residuo y del inóculo utilizado en este ensayo. Unidades expresadas como base húmeda (promedio \pm desvío estándar)

	Unidad	G	FV	V	I
pH	upH	7,2 \pm 0,1	3,4 \pm 0,1	4,9 \pm 0,1	7,2 \pm 0,0
CE	mS/cm	17,6 \pm 0,7	6,8 \pm 0,1	11,7 \pm 0,7	8,3 \pm 0,1
ST	g/Kg	246,9 \pm 8,5	100,9 \pm 6,5	387,8 \pm 5,4	66,5 \pm 7,3
SV	g/Kg	179,6 \pm 7,5	92,9 \pm 6,3	205,3 \pm 2,3	55,4 \pm 6,9
DQO	g/Kg	188,2 \pm 12,8	135,0 \pm 8,1	252,3 \pm 11,9	36,3 \pm 7,9
COT	g/Kg	99,9 \pm 4,2	51,6 \pm 3,5	114,1 \pm 1,3	30,8 \pm 3,8
NTK	g/Kg	13,7 \pm 0,8	3,4 \pm 0,9	11,2 \pm 0,4	10,7 \pm 1,4
N-NH3	g/Kg	8,64 \pm 0,14	0,26 \pm 0,02	3,13 \pm 0,22	0,87 \pm 0,04
C/N*		7,3	15,2	10,2	2,9
SST	mg/g				71,8 \pm 2,0
SSV	mg/g				63,0 \pm 1,5

Referencias. * se calculó en base a los promedios de COT y de NTK; G= guano; FV= residuo de frutas y verduras; V= estiércol vacuno; I= inóculo

Por otro lado, el estiércol vacuno presentó los mayores valores de materia orgánica (como SV y DQO). Fen et al.(2017) encontró resultados similares, donde el estiércol vacuno presentó las concentraciones más altas de materia orgánica, asociado a mayores concentraciones de carbohidratos y fibras, en comparación con al estiércol avícola.

6.4.2. Producción de biogás y metano

Se calculó el volumen acumulado y la velocidad de producción de metano para cada tratamiento. Los resultados son graficados en la Figura 3 a y b, respectivamente.

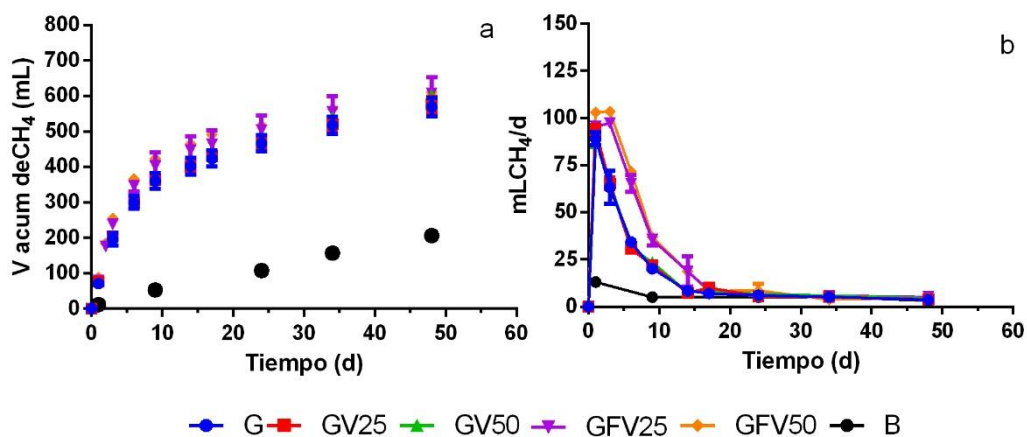


Figura 3. Producción de metano en el tiempo para cada tratamiento. a) Volumen acumulado de metano; b) Velocidad de producción de metano.

Pudo observarse que todos los tratamientos mostraron la misma *performance*, donde la fase exponencial comenzó desde el primer día, no identificándose fase *lag* o de retardo. Hubo una rápida degradación de la materia orgánica, donde aproximadamente el 50% de la producción de metano fue generada durante los primeros 6 días del ensayo, para todos los tratamientos evaluados (Figura 3 a). Esto concuerda con el análisis de la velocidad de producción, donde los máximos valores fueron alcanzados en el primer día para todos los tratamientos (Figura 3 b). A partir del pico máximo de producción, la velocidad comenzó a decrecer hasta alcanzar valores < 3 mL/d al final del ensayo. Fen et al. (2017), analizó el potencial metanogénico de diferentes estiércoles y encontró que para el guano de aves ponedoras, la máxima velocidad de producción fue alcanzada también al día 6 del ensayo, usando un lodo de un digestor rural como inóculo.

En cuanto al blanco, se observó un volumen de producción de CH₄ alto, alcanzando un promedio de 207 ± 3 mL de CH₄ al final del ensayo. A partir del día 20, se observó un incremento de la producción en el blanco, probablemente debido a la fase endógena.

La Figura 4 a y b muestra los rendimientos de metano y CO₂ y el rendimiento de biogás, al final del ensayo para cada tratamiento, respectivamente.

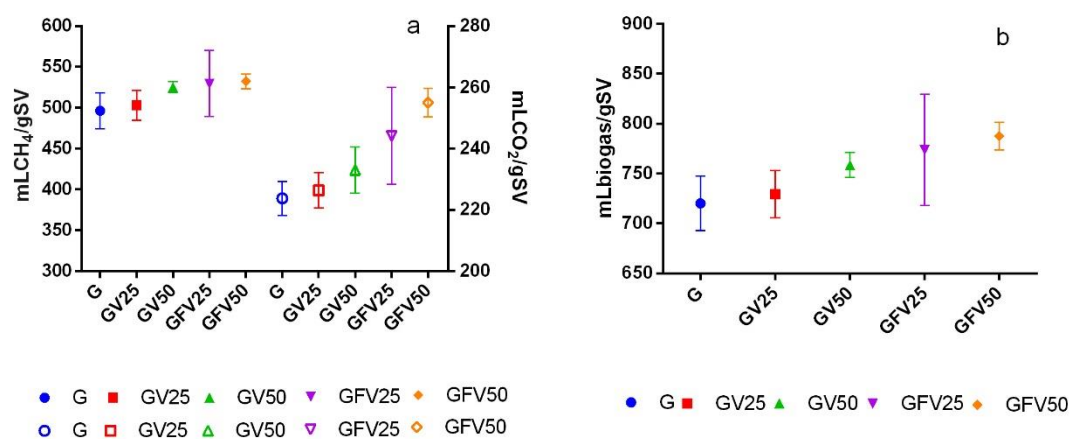


Figura 4. Rendimientos de los gases en la fase gaseosa al final del ensayo para cada sistema. a) Rendimiento del CH₄ (símbolo con relleno) y del CO₂. (símbolo sin relleno); b) Rendimiento del biogás.

Los valores obtenidos en promedio de rendimiento de metano fueron: 496 ± 22 mLCH₄/gSV, 503 ± 18 mLCH₄/gSV, 525 ± 7 mLCH₄/gSV, 530 ± 40 mLCH₄/gSV y 533 ± 9 mLCH₄/gSV para G, GV25, GV50, GFV25 y GFV50, respectivamente. Estos valores muestran una tendencia hacia el incremento del rendimiento de metano cuanto mayor es el agregado de co-sustrato, siendo un 6,9% y 7,5% mayor en GV50 y GFV50, respectivamente con respecto al guano mono-digerido (G).

Por otro lado, se observó una marcada tendencia al incremento del rendimiento de CO₂ (Figura 4 a) y del rendimiento de biogás (Figura 4 b) cuanto mayor es la masa de los dos co-sustrato evaluados (GV50 y GFV50). El mayor incremento del rendimiento del CO₂ en GFV25 y GFV50 podría provenir de la degradación de los residuos de FV, aportando mayor contenido de CO₂ en el biogás. Los porcentajes de CH₄ y CO₂ en el biogás fueron 69 ± 1% de CH₄ y 31 ± 1% de CO₂ para G, 71 ± 3% de CH₄ y 34 ± 1% de CO₂ para GV25, 70 ± 1% de CH₄ y 31 ± 1% de CO₂ para GV50, 66 ± 5% de CH₄ y 30 ± 2% de CO₂ para GFV25 y 66 ± 1% de CH₄ y 32 ± 1% CO₂. Estos resultados mostraron que en todas las mezclas evaluadas se encontraron valores óptimos de porcentaje de CH₄ y CO₂ en el biogás, mostrando una eficiente digestión anaeróbica. Si bien hubo una tendencia hacia el incremento de los rendimientos de CH₄, CO₂ y biogás cuanto mayor es la masa de co-sustrato agregada, estas diferencias no fueron significativas para ninguna de los sistemas evaluados (p > 0,05).

Si se considera el volumen de metano producido por el propio inóculo, es notorio el cambio en cuanto al rendimiento de metano y el PBM en todos los casos. En la Tabla 3, se muestran los PBM experimentales (PBM_e, máximo rendimiento de metano restándole el blanco), el PBM teórico (PBM_t) y el índice de biodegradabilidad (IB) calculado para cada sistema. El análisis estadístico mostró que no hubo diferencias significativas entre los tratamientos, obteniéndose un alto IB para todos los casos, con valores superiores al 81%.

Tabla 3. Potencial bioquímico metanogénico teórico (PBM_t) y experimental (PBM_e), y el IB para cada sistema (promedio ± desvío estándar).

Sistema	PBM_e mLCH ₄ /gSV	PBM_t mLCH ₄ /gSV	IB (%)
G	316 ± 22	366	86 ± 6
GV25	323 ± 18	382	84 ± 5
GV50	345 ± 7	398	87 ± 2
GFV25	349 ± 40	401	87 ± 10
GFV50	352 ± 9	437	81 ± 2

Diferentes valores de PBM del guano de aves ponedoras, del estiércol vacuno y de los residuos de frutas y verduras como únicos sustratos fueron reportados. El PBM del guano puede estar comprendido en un rango entre 200-360 mL/gSV (Fuchs et al., 2018). Un estudio realizado recientemente del PBM de residuos de frutas y verduras mostró la fuerte influencia de la composición del residuo en el resultado del PBM, encontrándose valores

entre 288 y 516 LCH₄/KgSV, con un valor promedio de 377 ± 67 LCH₄/KgSV y un IB del 79% (Edwiges et al., 2018).

Un estudio realizado por Abdallah et al. (2018) mostró que el potencial metanogénico del estiércol vacuno puede variar dependiendo del tipo de la edad y humedad del estiércol, encontrándose valores comprendidos entre 148-216 LCH₄/KgSV. Los potenciales metanogénicos y sus propiedades favorables para la digestión anaeróbica, sugieren que estos co-sustratos podrían haber mejorado significativamente el potencial metanogénico del guano.

Por otro lado, los antecedentes bibliográficos muestran que el guano puede mejorar su potencial metanogénico en un proceso de co digestión. Un *review* realizado recientemente por Fuchs et al. (2018) reportó el PBM del guano co-digerido con diferentes tipos de residuos orgánicos donde se muestra una mejora en los rendimientos y PBM. Si bien este trabajo evidencia una tendencia hacia la mejora del proceso anaeróbico con el agregado de co-sustratos, estos cambios no fueron significativos, probablemente, a causa de una baja relación entre el sustrato y el inóculo. La alta actividad del inóculo (AME= 0,18 gDQO/gSSV), condujo a una rápida y fácil transformación de la masa de sustrato agregada (como SV) a CH₄ y CO₂ (el 50% del total de la producción de metano se produjo a los 6 días del ensayo, buen rendimiento de metano, con un alto potencial metanogénico e IB del 86% para el guano mono-digerido). Por otro lado, ambos co-sustratos no mostraron efectos negativos en ninguna de las relaciones evaluadas (al 25% y 50%). Sería necesario realizar otros estudios, probando diferentes relaciones S/I para observar diferencias marcadas y los efectos de co-digestión del guano.

6.4.3. Análisis químico de la fase líquida

Alcalinidad, AGV e indicadores de estabilidad

En la Tabla 4, se muestran los resultados obtenidos de las alcalinidades y AGV al inicio y al final del ensayo en los tratamientos con diferentes cantidades de co-sustratos agregados.

Se observó una tendencia hacia el incremento de la capacidad *buffer* del sistema al final del ensayo, si bien estos cambios no fueron estadísticamente significativos tanto para AP como para AT ($p > 0,05$). Durante el proceso degradativo se liberan los compuestos carbonatados y bicarbonatados, como así también el amonio. Estos resultados concuerdan con lo encontrado en el capítulo anterior sobre el potencial bioquímico metanogénico

utilizando diferentes inóculos y diferentes relaciones S/I. En el lodo de cervecería (inóculo I), con similares características a este inóculo (tipo granular, sin adaptación y activo), también se encontraron mayores valores de alcalinidades al final del proceso degradativo anaeróbico del guano.

Tabla 4. Valores promedios de la alcalinidad parcial (AP), la alcalinidad total (AT) y los ácidos grasos volátiles (AGV) al inicio y al final del ensayo para cada tratamiento (promedio \pm desvío estándar).

	Inicial			Final		
	AP	AT	AGV	AP	AT	AGV
G	433,2 \pm 40,5	555,6 \pm 58,6	108,3 \pm 17,1	669,0 \pm 0,8	794,7 \pm 11,4	102,0 \pm 7,9
GV25	523,0 \pm 53,5	653,6 \pm 39,6	108,1 \pm 16,8	683,8 \pm 42,9	807,9 \pm 40,1	86,2 \pm 9,3
GV50	412,5 \pm 20,4	608,3 \pm 5,7	189,2 \pm 15,6	610,2 \pm 9,9	735,5 \pm 3,9	83,0 \pm 13,8
GFV25	475,6 \pm 24,2	647,9 \pm 4,3	63,7 \pm 21,5	653,9 \pm 26,5	775,7 \pm 23,1	106,3 \pm 4,9
GFV50	323,0 \pm 16,6	457,6 \pm 39,7	98,6 \pm 5,2	606,1 \pm 8,6	721,3 \pm 11,4	96,9 \pm 8,5
B	169,5 \pm 2,1	229,6 \pm 1,9	44,5 \pm 0,5	338,0 \pm 10,7	400,5 \pm 10,6	74,8 \pm 7,5

En cuanto a los AGV, se encontraron valores bajos, tanto al inicio como al final del proceso, evitándose así el riesgo de inhibición del proceso. Por otro lado, no se observaron cambios significativos entre el inicio y el final del proceso ($p > 0,05$).

Los valores al inicio y al final del proceso de los indicadores *alfa* y AGV/AT son mostrados en la Figura 5 a y b, respectivamente, para todos los sistemas evaluados.

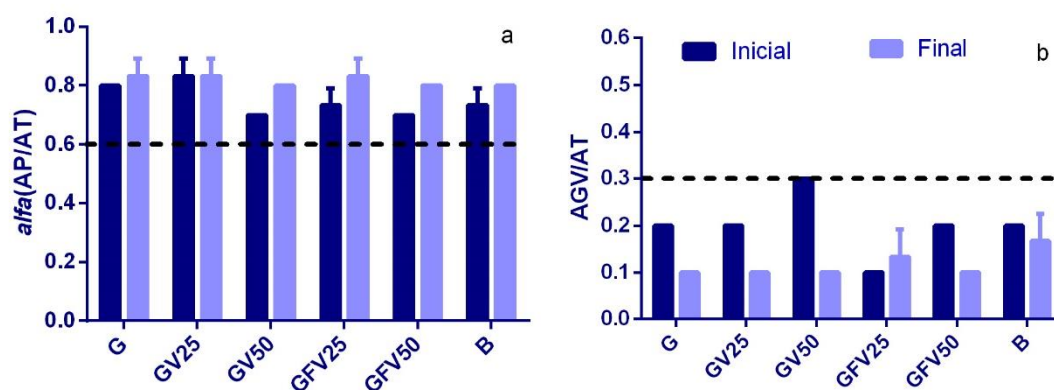


Figura 5. Indicadores de estabilidad *alfa* (a) y AGV/AT (b) al inicio y al final del proceso para todos los sistemas evaluados.

Pudo observarse que el valor de *alfa* se encontró siempre por encima de 0,6 y el valor de AGV/AT por debajo del valor crítico de 0,3-0,4, mostrando que tanto al inicio como al final del proceso, todos los sistemas se encontraron en condiciones estables.

Materia orgánica

El porcentaje de remoción (% R) de la materia orgánica fue calculado a través de las variables de SV, DQO total y DQO soluble (Tabla 5).

El mayor % de R de SV fue encontrado en el tratamiento GV25, con un valor del 31,6% ($p < 0,05$). En general, se observaron valores bajos de remoción de SV con un promedio del 13%. El % de remoción de la DQO total, mostró valores comprendidos en el rango de 28-52%, también con valores relativamente bajos de remoción de materia orgánica. Sin embargo, el % de remoción de la DQO soluble mostró valores altos de reducción de la materia orgánica, con un promedio del 90%, sin diferencias significativas entre tratamientos ($p > 0,05$).

Tabla 5. Valores promedios de la remoción de la materia orgánica calculada a través de los SV, DQO total y soluble para cada sistema (promedio \pm desvío estándar).

Sistema	SV (%R)	DQO _T (%R)	DQO _S (%R)
G	13,1 \pm 2,3 ^b	32,2 \pm 13,7 ^a	89,8 \pm 1,7 ^a
GV50	6,3 \pm 0,4 ^b	46,4 \pm 10,4 ^a	89,7 \pm 0,3 ^a
GV25	31,6 \pm 3,9 ^a	28,3 \pm 7,5 ^a	90,2 \pm 0,6 ^a
GFV50	13,3 \pm 3,9 ^b	40,4 \pm 7,0 ^a	92,8 \pm 1,7 ^a
GFV25	16,9 \pm 2,4 ^b	51,6 \pm 1,5 ^a	91,2 \pm 0,7 ^a

Las diferencias encontradas entre las metodologías aplicadas para la determinación de la materia orgánica, podrían estar asociadas a la errónea representatividad de la muestra. Debido a que el inóculo está conformado por gránulos con alta sedimentación, la toma de muestra representativa resulta difícil. Sin embargo, para la determinación de la DQO soluble, la muestra es filtrada, independizándose de esta forma del contenido de sólidos en la muestra. La muestra filtrada es altamente representativa y homogénea tanto al inicio como al final del ensayo.

Compuestos nitrogenados

El análisis de los compuestos nitrogenados en el tiempo para todos los sistemas se muestra en la Figura 6.

El NTK (Figura 6 a) no mostró diferencias significativas entre el inicio y el final del proceso, siendo los valores promedios de 921 y 977 mg/L, respectivamente, para todos los sistemas evaluados ($p > 0,05$). Los valores obtenidos fueron bajos para todos los sistemas, no representando concentraciones que puedan generar una inhibición en el proceso.

El NAT (Figura 6 b) mostró una reducción durante los primeros días del ensayo, hasta el día 14 aproximadamente, en todos los sistemas evaluados. Luego, se observó un incremento en el tiempo hasta el final del ensayo. Sin embargo, las concentraciones del NAT se mantuvieron bajas en todos los casos (225 mg/L en promedio), con valores muy inferiores a las concentraciones tóxicas reportadas por otros autores, entre 3 a 5 g/L (Guebitz et al., 2015; Yenigün and Demirel, 2013).

En cuanto al NAL (Figura 6 c) en general, se observaron valores muy bajos para todas las relaciones. Esto está relacionado con las bajas concentraciones de NAT y valores de pH cercanos al neutro (7,1 en promedio). Pudo observarse la fuerte dependencia del NAL con el pH, donde las concentraciones más altas (observados en los picos máximos de NAL al día 34) fueron coincidentes con los valores más altos de pH y superiores a 7,4.

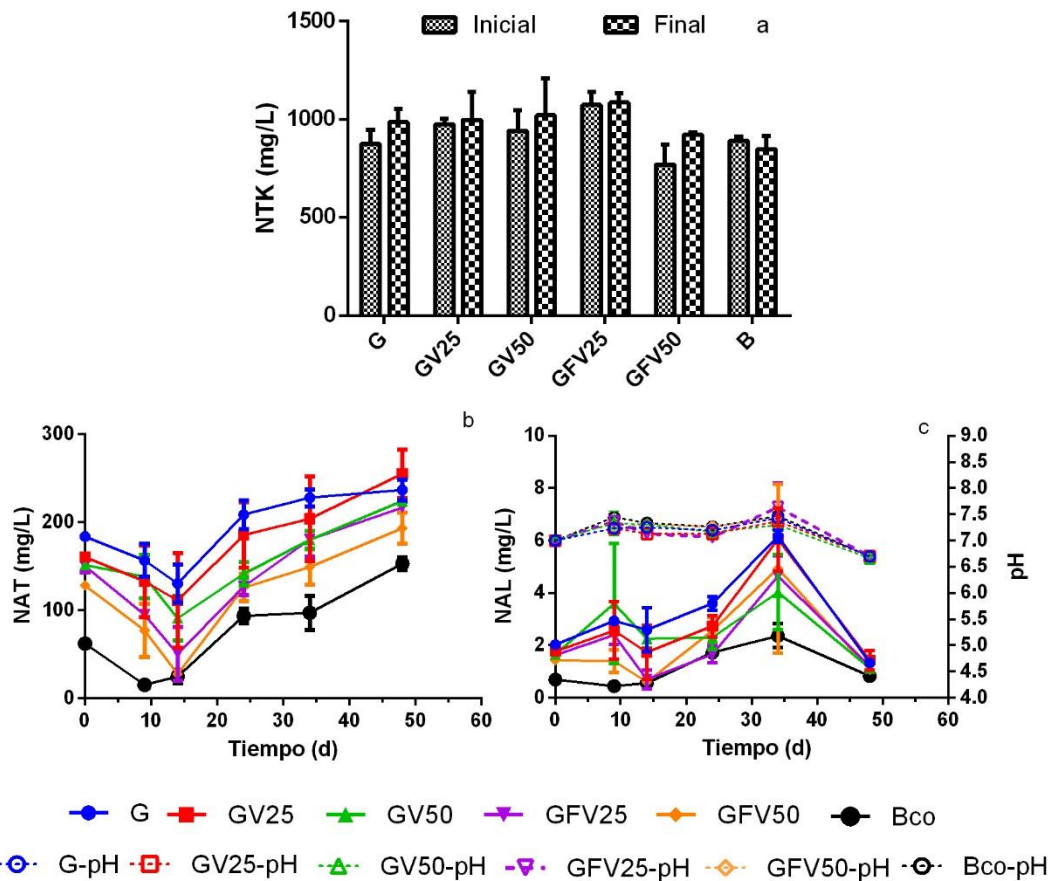


Figura 6. Análisis de los compuestos nitrogenados en la fase líquida para todos los sistemas evaluados. a) Nitrógeno total Kjeldahl (NTK) al inicio y al final del ensayo; b) Evolución del nitrógeno amoniacal total (NAT); c) Evolución del pH (símbolo sin relleno) y del nitrógeno amoniacal libre (NAL; símbolo con relleno).

Análisis microbiológico

En la Tabla 6 se muestran los resultados microbiológicos obtenidos para cada tratamiento al inicio y al final del ensayo. Los resultados mostraron que hubo eliminación de coliformes fecales y *Salmonella* luego del proceso de digestión anaeróbica.

La *E coli* y coliformes fecales son generalmente utilizados como organismos indicadores o de monitoreo para el control de la higienización del producto digerido proveniente de plantas de biogás (Guebitz et al., 2015). La reciente resolución argentina 19/2019 sobre aplicación de digeridos para su valorización agronómica, establece que el producto digerido debe tener < 1000 NMP/g MF de coliformes fecales, ausencia de *E. coli* y ausencia de *Salmonella* para que pueda ser aplicado. Los resultados obtenidos mostraron que los productos digeridos de todos los tratamientos cumplen con estas condiciones de higienización. Sin embargo, este producto digerido proviene de un ensayo en *batch*, llevado a cabo bajo condiciones ideales y de laboratorio, donde los tiempos de retención y otras condiciones de manejo en reactores semi-continuos o plantas de biogás a escala real podrían ser diferentes.

Tabla 6. Análisis microbiológico al inicio y al final del ensayo para cada sistema

	Coliformes fecales		<i>E. coli</i>		<i>Salmonella spp</i> ⁽²⁾	
	Inicial (NMP/g)	Final	Inicial (NMP/g)	Final	Inicial	Final
G	> 1600	Negativo ⁽¹⁾	> 1600	Negativo	Presencia	Ausencia
GV25	> 1600	Negativo	> 1600	Negativo	Presencia	Ausencia
GV50	> 1600	Negativo	> 1600	Negativo	Presencia	Ausencia
GFV25	> 1600	Negativo	> 1600	Negativo	Presencia	Ausencia
GFV50	> 1600	Negativo	> 1600	Negativo	Presencia	Ausencia
BCO	> 1600	Negativo	> 1600	Negativo	Ausencia	Ausencia

Referencias. (1)= se consideró negativo para valores <1,8 NMP/g para la determinación de coliformes fecales y *E. coli*.; NMP= número más probable

La reducción o eliminación de estos microorganismos patogénicos es dependiente de las condiciones ambientales y operativas del proceso. La temperatura, tiempo de retención y concentración de amonio son algunas de las variables que influyen en la eliminación de los patógenos (Guebitz et al., 2015). Watcharasukarn et al. (2009) estudió el efecto de la temperatura en la reducción de *E coli* y coliformes fecales. La *E coli* se redujo por debajo de su límite de detección a los 10 segundos a 70°C, 40 minutos a 55°C y 5 días a 37°C. Las coliformes fecales se redujeron por debajo de su límite de detección en el primer día a los 70°C, a los 2 días a los 55°C y a los 15 días a los 37°C. En este trabajo, el ensayo

finalizó a los 48 días, tiempo suficiente para favorecer la eliminación de estos microorganismos patógenos sometidos a condiciones mesofílicas.

La *Salmonella* también es uno de los organismos indicadores de control para la salinización e higienización del producto digerido de plantas de biogás. Franke-Whittle y Insam, (2013) reportaron que la temperatura es uno de los factores que más afecta la supervivencia de microorganismos patogénicos en la digestión anaeróbica. La *Salmonella* podría ser inactivada dentro de las 24 horas en condiciones termofílicas, mientras que podría requerirse semanas o meses en condiciones mesofílicas. En este trabajo, las condiciones ambientales empleadas y el tiempo del ensayo fueron suficientes para eliminar la *Salmonella* al final del proceso de degradación anaeróbica en todos los sistemas evaluados.

6.5. Conclusiones

Es viable la degradación anaeróbica del guano mono-digerido, utilizando un inóculo granular y bajo una relación S/I= 0,4 gSV/gSSV. Los resultados mostraron un alto rendimiento de metano y potencial metanogénico, y alto índice de biodegradabilidad. Asimismo, las concentraciones de compuestos nitrogenados no mostraron efectos inhibitorios del proceso. Los parámetros de remoción de materia orgánica e indicadores de estabilidad mostraron que el proceso ocurrió en condiciones estables y con alta eficiencia de degradación.

La co-digestión del guano con estiércol vacuno y residuos de frutas y verduras mostró una tendencia hacia el incremento de rendimiento de biogás, metano y PBM. Será necesario estudiar otras relaciones de S/I para observar una mejora significativa del proceso.

La digestión anaeróbica del guano mono y co-digerido, bajo condiciones mesofílicas y con tiempos de retención largos (48 días), eliminó los microorganismos patogénicos coliformes fecales, *E. coli* y *Salmonella*, generando un producto digerido en condiciones seguras de sanitización.

Finalmente, se concluye que el guano puede ser co-digerido hasta un 50% con estiércol vacuno y residuos de frutas y verduras en condiciones anaeróbicas estables y favorables, y con la obtención de un producto digerido libre de los tres principales organismos indicadores de patogenicidad.

***7. Ensayo en reactores semi-
continuos: guano co-digerido con
residuos de frutas y verduras***

7.1 Introducción

Los ensayos realizados en *batch*, de potencial bioquímico metanogénico permiten estimar la máxima generación de energía para un dado sustrato o co-sustratos y evaluar variables que afectan al proceso, trabajando bajo condiciones controladas de laboratorio. Sin embargo, para el “*scaling up*” o escalamiento de la tecnología, resulta clave desarrollar el proceso previamente en sistemas donde el flujo de alimentación se asemeje al funcionamiento real de plantas de biogás.

La digestión anaeróbica es implementada en reactores que operan en régimen *batch*, o continuo, siendo este último el régimen que habitualmente utilizan las plantas de biogás para el tratamiento de residuos orgánicos. En el proceso continuo el sustrato es alimentado constantemente y diariamente, en forma continua o en forma intermitente con intervalos de tiempo definidos (una, dos, tres veces al día). En este último caso, se lo denomina reactores semi-continuos. En un reactor piloto de régimen continuo o semi-continuo se pueden evaluar variables de diseño y operativas como tiempo de retención hidráulica, puesta en marcha, velocidad de carga, sistemas de mezclado, entre otras, las cuales no pueden ser evaluadas en un proceso *batch* a escala laboratorio.

Existen diferentes tipos de diseños de reactores, verticales, horizontales, de simple o múltiples etapas, y también pueden ser clasificados en función al tipo de mezclado (flujo pistón, de mezcla completa), de concentración de carga (alta tasa y baja tasa) y de concentración de sólidos (digestión húmeda y digestión seca).

Particularmente, el reactor utilizado en esta tesis es de tipo mezcla completa, trabajándose en condiciones de digestión húmeda. Este diseño de reactor es el más adecuado para la digestión de una gran variedad de sustratos, como los residuos agropecuarios, industriales y residuos de cultivos energéticos (Khanal, 2008; Tabatabaei and Ghanavati, 2018). Generalmente son circulares y con sistema de agitación, y pueden ser operados a diferentes temperaturas y velocidades de carga. El sistema de mezclado es bien conocido y garantiza una alta eficiencia de digestión de los SV comparado con otros sistemas, debido a un mayor contacto entre el sustrato y los microorganismos.

En la digestión húmeda los sustratos son “bombeables”, mientras que en la digestión seca los sustratos son “apilables”, es decir agregados sin la necesidad de la incorporación de agua. No existe una división exacta entre estos dos tipos de digestión, pero generalmente cuando el proceso trabaja con una concentración de sólidos no superior al 10-15% de ST se denomina digestión húmeda, mientras que en la digestión seca el proceso ocurre con

concentraciones superiores al 20% de ST (Angelonidi and Smith, 2015). Para trabajar en condiciones de digestión húmeda con sustratos sólidos, se requiere su dilución con el agregado de agua o de un líquido (Moriarty et al., 2013). Esto representa una desventaja de la digestión anaeróbica húmeda frente a la seca.

Los parámetros pH, temperatura, alcalinidad total (AT) y parcial (AP), ácidos grasos volátiles (AGV), los indicadores de estabilidad *alfa* y AGV/AT, producción de biogás y metano, son incluidos como parámetros claves de control y monitoreo en el manejo de plantas de biogás.

Otros factores, relacionados con la implementación de la digestión anaeróbica en reactores semi-continuos, son el tiempo de hidráulico (TRH) y la velocidad de carga orgánica (VCO), los cuales son parámetros de diseño y que dependen de la tecnología utilizada y del tipo de sustrato. El TRH es el período promedio de permanencia de un sustrato en el reactor, que permite el desarrollo de la población bacteriana y del proceso de producción de biogás. Se obtiene dividiendo el volumen total del digestor entre el caudal de alimentación, y se expresa en unidades de tiempo, normalmente en horas o días. Cuando los TRH son bajos, la biomasa activa puede ser “lavada” o eliminada del sistema, mientras que cuando los TRH son altos, puede ocurrir una disminución en la producción de biogás en el digestor. Por lo tanto, el TRH debe ser ajustado al nivel adecuado para el tipo de alimentación y del reactor (Drosg, 2013; Jimenez et al., 2015). El tiempo de retención mínimo al que se puede operar depende, fundamentalmente, de la temperatura y de la composición del sustrato (Tabatabaei and Ghanavati, 2018). En un reactor de mezcla completa, generalmente ronda entre los 25-35 días, trabajando bajo condiciones mesofílicas (Al Seadi et al., 2008).

La VCO es la cantidad de materia orgánica introducida diariamente por unidad de volumen del reactor y tiempo, expresada generalmente como $\text{kgSV}/\text{m}^3 \cdot \text{d}$ para sustratos sólidos, o bien como $\text{kgDQO}/\text{m}^3 \cdot \text{d}$ cuando el sustrato es un efluente o líquido. La VCO debe ajustarse dependiendo del tipo de sustrato (Esteves et al., 2013). Uno de los problemas críticos que ocurre al incrementar la VCO es la acidificación del sistema, debido a una sobrecarga de materia orgánica que conducen a disminuir o detener la producción de metano (Al Seadi et al., 2013; Moriarty et al., 2013). Por ello, es importante regular la VCO durante la puesta en marcha de un digestor anaeróbico, realizándose incrementos lentos de la carga para asegurar una eficiente adaptación de los microorganismos. En reactores mesofílicos, generalmente la VCO oscila entre los 3 y 5

kgSV/m³.d, dependiendo del tipo de sustrato, mientras que la microflora puede inhibirse con valores que exceden los 6,4 kgSV/m³.d (Moriarty et al., 2013).

En un reactor semi-continuo piloto se puede evaluar la *performance* del proceso, mediante el monitoreo y control de factores ambientales y operativos que afectan el desarrollo de la digestión anaeróbica, aproximándose a las condiciones con que se operan las plantas de biogás.

Además, en un régimen continuo se genera constantemente un producto semilíquido, llamado digerido. Los ensayos de digestión anaeróbica llevados a cabo bajo este régimen de alimentación, permiten conocer la composición y las propiedades intrínsecas del digerido, evaluando sus potencialidades y limitantes para su posterior uso y aplicación. La digestión anaeróbica conduce a la liberación de macro y micronutrientes en el digerido, valorizándose su aplicación como fertilizante del suelo. Comparado con el estiércol crudo, el digerido tiene mejores capacidades de fertilizante, mayor homogeneidad y disponibilidad de nutrientes, una mayor relación C/N y menor generación de olores que los residuos crudos (Al Seadi et al., 2008). Además, el digerido contiene metales pesados. Aunque, la mayoría de los metales pesados y microelementos son esenciales para las plantas, altas cantidades pueden producir toxicidad. Por ello, es importante conocer la calidad del digerido antes de ser aplicado, no solo considerando la composición de nutrientes sino también la presencia de elementos potencialmente tóxicos (Lukehurst et al., 2010).

7.1. Objetivo

En relación a lo expuesto, se planteó en este capítulo de la tesis cumplir con el objetivo específico 5:

5- Analizar el proceso anaeróbico del guano de aves ponedoras mono-digerido y co-digerido bajo régimen de alimentación semi-continua, determinando la performance y la calidad de los dos productos generados (biogás y digerido).

7.2. Materiales y Métodos

Sustrato y co-sustrato

El guano (G) recolectado de una avícola ubicada en el predio de INTA-Castelar, con sistema de manejo automatizado, donde el estiércol es extraído 3 veces por semana. Este guano es de la misma avícola que el utilizado para los ensayos anteriores de esta tesis (capítulo 5 y 6). Periódicamente se le agrega cal al guano para secarlo y evitar la generación de larvas de moscas. El sustrato fue mezclado y homogeneizado, descartando algunas plumas o partículas gruesas e inorgánicas como piedras. Se cuarteo y se fraccionó en tres réplicas para su caracterización. Se conservó a -18°C hasta su uso.

El residuo de frutas y verduras (FV) fue recolectado de diferentes verdulerías y su composición fue la siguiente (% m/m en peso húmedo): 15,6% de berenjena, 6,5% de cebolla de verdeo; 3,8% de repollo, 11,4% de brotes de soja, 1,9% choclo y chala, 11,3% de zanahoria y zapallo anco, 15,3% de lechuga, 2,5% de brócoli, 5,8% de zapallito, 10,8% de naranja, 1,4% de uva, 4% de tomate y 2% de batata. El sustrato de frutas y verduras fue triturado y homogenizado antes de su fraccionamiento y conservación.

El G fue mezclado con FV en una relación 50% y 50% en peso húmedo. En el ensayo de PBM de la co-digestión del G con FV de esta tesis (capítulo 6), se observó una tendencia al incremento del rendimiento de metano utilizando una relación 50:50 de G: FV. Por otro lado, existen antecedentes bibliográficos que demuestran que el agregado de FV mejora el proceso anaeróbico del guano de aves ponedoras. Molinuevo-Salces et al. (2013) demostró que la mezcla de 75% de FV y 25% de residuo avícola incrementó un 41% el rendimiento de metano con respecto al residuo avícola mono-digerido en reactores en *batch*. En este trabajo se utilizó una menor relación de FV que este autor, debido a que el principal objetivo es tratar al guano y utilizar a los residuos de FV como co-sustratos. En este sentido, se seleccionó aquella relación que pudiera co-digerirse en condiciones estables y que pudiera proveer una mejora en el rendimiento de metano usando la máxima cantidad de guano posible.

El G, las FV y la mezcla G-FV fueron caracterizadas mediante la determinación de variables fisicoquímicas. Luego, los sustratos G-FV y G fueron fraccionados en bolsas de polipropileno en función a la cantidad de alimentación diaria requerida en cada reactor y almacenados a -18°C hasta su uso.

Diseño experimental

Para el desarrollo de este ensayo se utilizaron dos reactores de 20 L de igual diseño, con un volumen efectivo de 19 L. Uno de los reactores se utilizó para evaluar el proceso de mono-digestión del guano y el otro reactor para evaluar la co-digestión del G con residuos de FV. Debido a que se trabajó con reactores a escala piloto (y no laboratorio), se decidió no considerar las réplicas en el diseño experimental debido a la falta de disponibilidad de más cantidad de reactores y a priorizar la investigación en los diferentes tratamientos (mono y co-digestión del guano).

Los reactores fueron colocados en un baño termostatzado, de acero inoxidable, programado para trabajar a temperatura mesofílica ($34,5 \pm 1,4$ °C). La agitación se realizó en forma mecánica, programada a 200 rpm, y con una frecuencia de 2 veces por día durante 20 minutos. Mayores detalles sobre el diseño del reactor son descriptos en Bres et al. (2011). Un esquema del tipo de reactor y sus características son mostradas en la Figura 1.

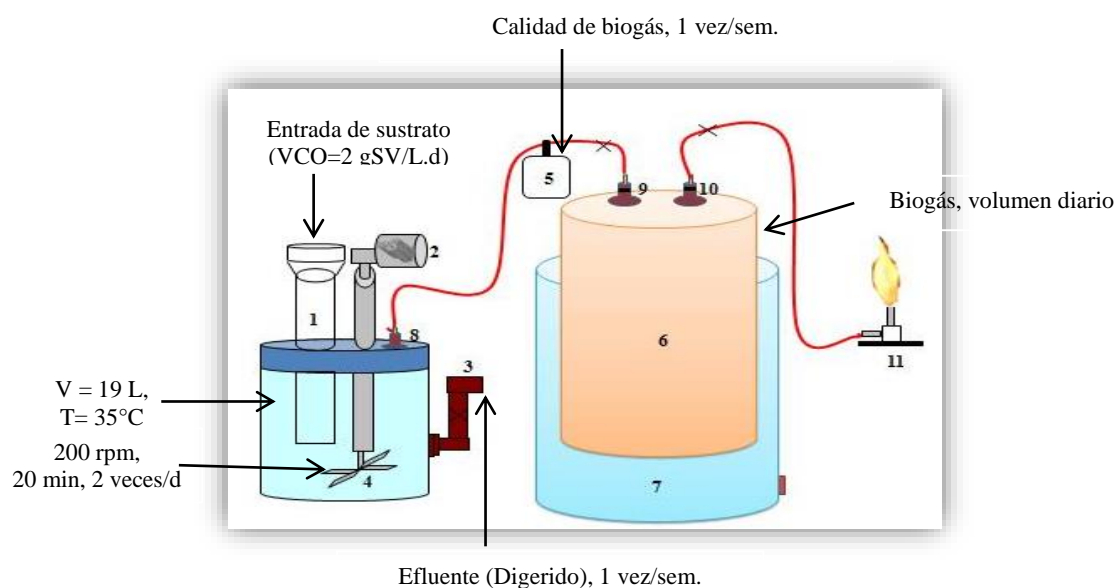


Figura 1. Esquema del reactor anaeróbico y gasómetro. 1-cámara de carga; 2-motor de agitación; 3-cámara de carga; 4-sistema de agitación; 5-bolsa Tedlar; 6-gasómetro; 7-recipiente contenedor del gasómetro; 8-conexión para la salida del gas; 9-conexión para la entrada del gas; 10-conexión para la salida del gas; 11-quemador.

Los reactores fueron inoculados inicialmente con lodo proveniente de una planta de tratamiento de jarabe de maíz con una concentración de 5 gSSV/L y hasta alcanzar el volumen efectivo del reactor (19 L). Cada reactor fue alimentado con G o G-FV diluidos con agua de red para alcanzar un 8% de sólidos totales (ST). La velocidad de carga orgánica (VCO) se incrementó gradualmente (0,5, 1, 1,5 y 2 gSV/L.d) para generar una

biomasa aclimatada a cada sustrato durante un período de 7 meses. La VCO de 2 gSV/L.d se mantuvo constante por un período de dos veces el TRH (56 días, TRH= 28 d) para alcanzar condiciones de estado estacionario.

Luego, comenzó el período experimental donde se tomaron muestras de la cámara de descarga (muestras del digerido) por triplicado, una vez por semana durante un período de 114 días (16 muestreos) y se contabilizó la producción de biogás generado diariamente. El biogás fue calculado mediante la altura alcanzada del gasómetro y expresado bajo condiciones estándares de presión y temperatura (273 K y 1 atm). Las muestras de biogás fueron tomadas mediante el uso de una bolsa especial para muestreo de gases (bolsa Tedlar®) con una frecuencia de una vez por semana durante el período de 80 a 114 días.

Determinaciones analíticas

Los sustratos G, FV y la mezcla G-FV se caracterizaron mediante los parámetros de ST, SV, DQO, NTK, PT, y los elementos totales Ca, Mg, K, Na, Fe, Zn, Mn y Cu.

El proceso anaeróbico fue monitoreado determinando las variables pH, CE, DQO, ST, SV, AGV, AT y AP en las muestras del digerido recolectadas una vez por semana durante el período ensayado. Además, se determinó NTK, NAT, NAL y los elementos totales (Ca, Mg, K, Na, Fe, Zn, Mn y Cu) en las muestras del digerido durante las últimas seis semanas de operación (6 eventos de muestreo). En el último muestreo, se tomaron muestras del digerido por triplicado de cada reactor para su análisis microbiológico y parasitológico. Se cuantificó coliformes fecales y se determinó como presencia o ausencia los patógenos *Salmonella*, spp., *Pseudomona aeruginosa* y *P. mirabilis* y los parásitos ácaros, *Strongyloides* spp. (huevos) y *Ascaridia* spp./*Heterakis* spp.

La calidad del biogás fue determinada mediante la medición del CH₄ y CO₂ por cromatografía gaseosa. La producción de biogás específica (PBE) fue calculada mediante la siguiente ecuación:

$$PBE = \frac{V_{biogas}}{m} \left[\frac{L_{biogas}}{gSV_{agregados}} \right]$$

Dónde:

V_{biogas}= volumen acumulado de biogás en condiciones estándares (L_{biogas})

m= masa de sustrato agregada (gSV_{agregados})

El rendimiento de metano fue expresado como la producción de metano específica (PME) reemplazando V_{biogas} por V_{metano} en la ecuación, donde V_{metano} es el volumen de metano acumulado en condiciones estándares (L_{CH₄}).

Todas las variables mencionadas se determinaron según metodología descrita en el capítulo “métodos analíticos” de esta tesis.

Análisis estadístico

Se realizó un t-test de a pares, para comparar los parámetros fisicoquímicos entre tratamientos (G y G-FV), cuando los datos pasaron la prueba de normalidad D’Agostino-Pearson ($p < 0,05$). Además, se llevó a cabo un análisis de correlación de Pearson entre los parámetros fisicoquímicos. El análisis de datos se realizó con el software estadístico Infostat®, versión 2011 y Prisma®, GraphPad versión 6.0.

7.3. Resultados

Caracterización del sustrato y co-sustrato

Las propiedades químicas y físicas del sustrato G, co-sustrato FV y mezcla G-FV son mostradas en la Tabla 1. La relación C/N fue 6 y 9 para G y G-FV, respectivamente.

Tabla 1. Características físicas y químicas del sustrato G, co-sustrato FV y mezcla G-FV (promedio \pm desvío estándar).

Parámetro	Unidad	G	FV	G-FV
ST	% bh	30,2 \pm 1,6	11,7 \pm 0,6	17,9 \pm 0,7
SV	%	79,8 \pm 1,7	85,4 \pm 0,9	74,2 \pm 2,1
NTK	mg/g	56,9 \pm 1,0	22,1 \pm 0,2	42,2 \pm 1,8
PT	mg/g	17,1 \pm 2,4	2,9 \pm 0,4	4,7 \pm 0,4
DQO	g/g	1,0 \pm 0,2	1,4 \pm 0,2	0,8 \pm 0,0
Ca	mg/g	23,9 \pm 3,6	7,4 \pm 0,5	19,4 \pm 4,4
Mg	mg/g	6,9 \pm 0,8	1,8 \pm 0,3	1,7 \pm 0,2
K	mg/g	29,0 \pm 2,7	24,3 \pm 2,5	10,5 \pm 0,4
Na	mg/g	4,3 \pm 0,4	3,8 \pm 0,5	2,0 \pm 0,3
Fe	mg/g	1,1 \pm 0,1	2,6 \pm 0,3	0,4 \pm 0,1
Zn	μ g/g	255 \pm 33	62 \pm 2	82 \pm 7
Mn	μ g/g	359 \pm 33	96 \pm 9	133 \pm 16
Cu	μ g/g	21,2 \pm 4,8	2,2 \pm 1,0	11,2 \pm 0,9

Referencias. G: guano; FV: frutas y verduras; bh: peso en base húmeda; G-FV: mezcla de guano y residuos de frutas y verduras en una relación 50%: 50% como base húmeda. Excepto ST, todos los otros parámetros son expresados en base seca.

Producción y rendimiento de biogás y metano

La evolución del biogás para ambos reactores se muestra en la Figura 2 a. Pudo observarse una fase *lag* mayor en el co-digerido G-FV que el mono-digerido G. La producción

acumulada fue mayor en el G hasta el día 65, luego comenzó a decaer y la producción acumulada en el co-digerido G-FV fue superior desde ese día y hasta los 114 d de ensayo.

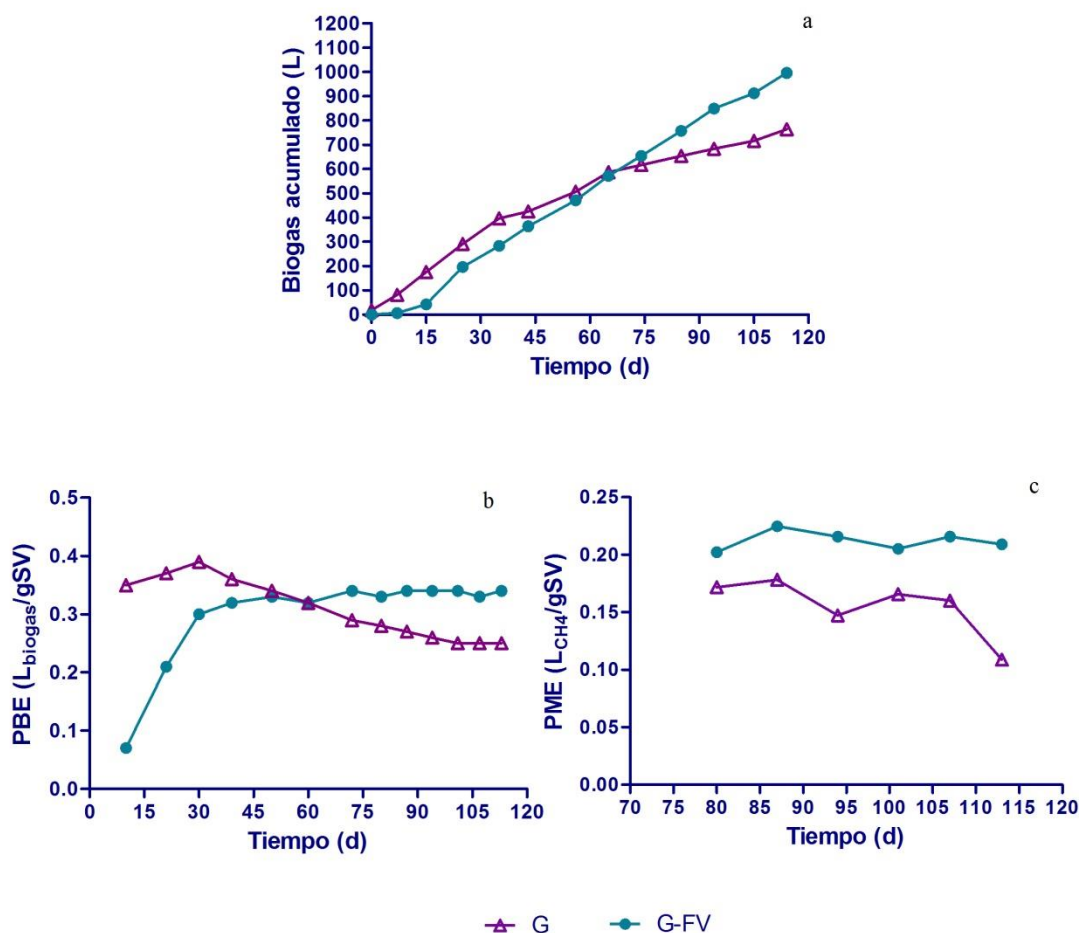


Figura 2. Evolución de la producción y rendimiento de biogás y metano para G y G-FV. a) Biogás acumulado en el tiempo; b) Producción de biogás específica (PBE) en el tiempo; c) Producción de metano específica (PME).

La producción acumulada fue de 996 L y 764 L para G-FV y G, respectivamente al final del ensayo. Si bien ambos reactores fueron operados con la misma temperatura, agitación y VCO la mayor producción de biogás acumulada fue observada en el co-digerido G-FV, incrementándose en un 30% con respecto al proceso mono-digerido G.

El rendimiento de biogás calculado como PBE se muestra en la Figura 2 b. La PBE en G fue superior hasta el día 60 y luego comenzó a decaer en el tiempo hasta alcanzar un valor constante en la etapa final del ensayo (92-114 d), con un promedio de $0,25 \pm 0,01$ L/gSV. La PBE en G-FV fue superior al G a partir del día 60, con un valor promedio de $0,33 \pm 0,01$ L/gSV hasta el final del ensayo. La PBE fue 32% superior en G-FV que en G al final del ensayo.

En cuanto a la generación de metano, se observó que el % de metano en el biogás fue $62,6 \pm 2,4\%$ y $62,8 \pm 4,0\%$ para G-FV y G, respectivamente, en el período estacionario. El contenido de metano en el volumen de gas total quedó aproximadamente constante desde el día 78 y hasta el final del ensayo en ambos reactores (seis muestreos), no encontrándose diferencias significativas ($p > 0,05$).

El rendimiento de CH_4 (Figura 2 c) fue calculado como producción de metano específica (PME). La PME fue aproximadamente constante en ambos reactores, a excepción del último punto de muestreo (114 d) en G donde hubo una marcada caída. La PME promedio fue $0,21 \pm 0,01 \text{ LCH}_4/\text{gSV}$ y $0,16 \pm 0,03 \text{ LCH}_4/\text{gSV}$ en G-FV y G, respectivamente. El proceso co-digerido condujo a un incremento del 31% comparado con el proceso mono-digerido del guano. Por otro lado, el análisis de correlación mostró que el rendimiento de biogás y metano tuvieron una correlación positiva ($R^2 = 0,89$; $p \leq 0,001$).

Efecto de los compuestos nitrogenados

Las concentraciones de NTK y NAT en G y G-FV en el tiempo son mostradas en la Figura 3 a. Los valores promedios obtenidos fueron $3,45 \pm 0,45 \text{ g/L}$ y $2,68 \pm 0,27 \text{ g/L}$ para G-FV y $4,44 \pm 0,20 \text{ g/L}$ y $3,54 \pm 0,14 \text{ g/L}$ para G, respectivamente. Pudo observarse que en el rango medido (63-114 d), la concentración máxima de NTK y NAT en G-FV fue en el día 63 y luego la concentración decreció en el tiempo. Sin embargo, la concentración de NTK y NAT fue relativamente constante para el sistema G, con un rango comprendido entre 4,1-4,5 g/L de NTK y entre 3,3-3,7 g/L de NAT durante todo el período analizado. Además, un pico de concentraciones de NAT y NTK fue observado al final del ensayo (114 d) en ambos reactores G y G-FV. Por otro lado, el análisis estadístico mostró que hubo diferencias significativas en las concentraciones de NTK y NAT entre ambos reactores, siendo significativamente superior en G con respecto al guano co-digerido ($p < 0,01$ y $p < 0,001$, respectivamente). El análisis de correlación mostró que la variable NAT tuvo una correlación positiva con la variable NTK ($R^2 = 0,98$; $p \leq 0,001$) y además, hubo una alta relación NAT/NTK con un promedio del 0,78 y 0,79 en G-FV y G, respectivamente. Como era esperado, ambos tratamientos mostraron alto contenido de compuestos nitrogenados, con una alta transformación del nitrógeno a amoníaco en el medio.

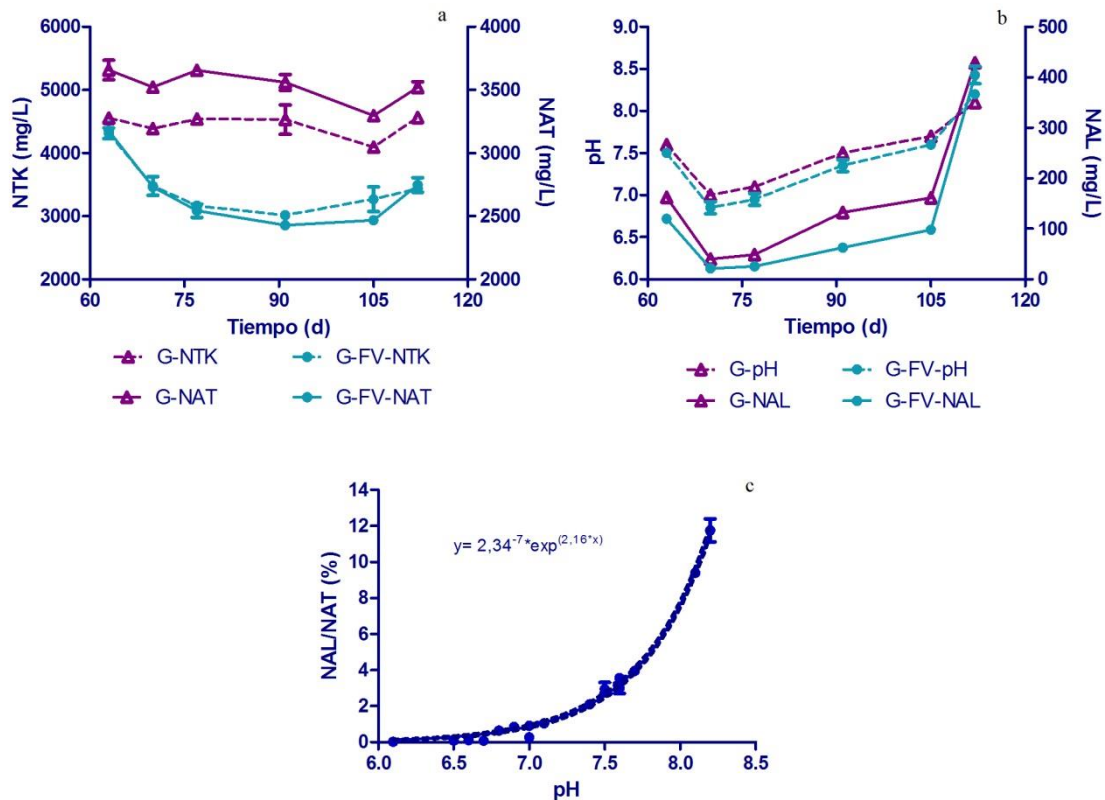


Figura 3. Variación de los compuestos nitrogenados y su relación con el pH para G y G-FV. a) NTK (líneas punteadas) y NAT (línea sólida) durante el período analizado; b) pH (línea punteada) y NAL (línea sólida) durante el período analizado; c) Relación entre pH y el % de NAL/NAT, independientemente del reactor y del tiempo (líneas punteada indican el 95% de intervalo de confianza de la regresión lineal).

Los valores obtenidos de las concentraciones de NAL y del pH para ambos reactores en el período ensayado son mostrados en la Figura 3 b. La concentración de NAL fue significativamente superior en G ($p < 0,01$). En ambos reactores, las concentraciones de NAL se incrementaron de 42,0 mg/L a 161,6 mg/L en G y de 22,0 mg/L a 98,2 mg/L en G-FV durante el período 70-105 d. La concentración NAL tuvo una correlación positiva con el pH durante todo el período ensayado ($R^2 = 0,90$; $p < 0,001$). Por otro lado, los valores de pH mostraron no tener diferencias significativas entre ambos tratamientos G y G-FV ($p > 0,05$). En consideración a la relación entre variables (pH y NAL), se observó que la máxima concentración de NAL fue alcanzada con un valor de $\text{pH} > 8$ al final del ensayo (114 d) para ambos reactores.

En la Figura 3 c, se muestra la relación entre el % de la concentración NAL en el medio, con respecto al NAT y su relación con el pH, independientemente del tiempo. La curva responde a una correlación no lineal entre NAL/NAT (eje y) y el pH (eje x), siguiendo la ecuación exponencial:

$$y = 2,34^{-7} * e^{(2,16 * x)} \quad (R^2 = 0,993)$$

Los valores de NAL/NAT fueron menores al 2% cuando el pH fue menor a 7,4, mientras que esta relación se incrementó exponencialmente cuando el pH fue superior a 7,4. A un pH superior a 8, las concentraciones de NAL se incrementaron entre 9-12% para ambos tratamientos.

Análisis de la estabilidad del proceso

Los parámetros de control AP, AT, AGV y los indicadores de estabilidad *alfa* (AP/AT) y AGV/AT fueron monitoreados en el tiempo y son graficados en la Figura 4.

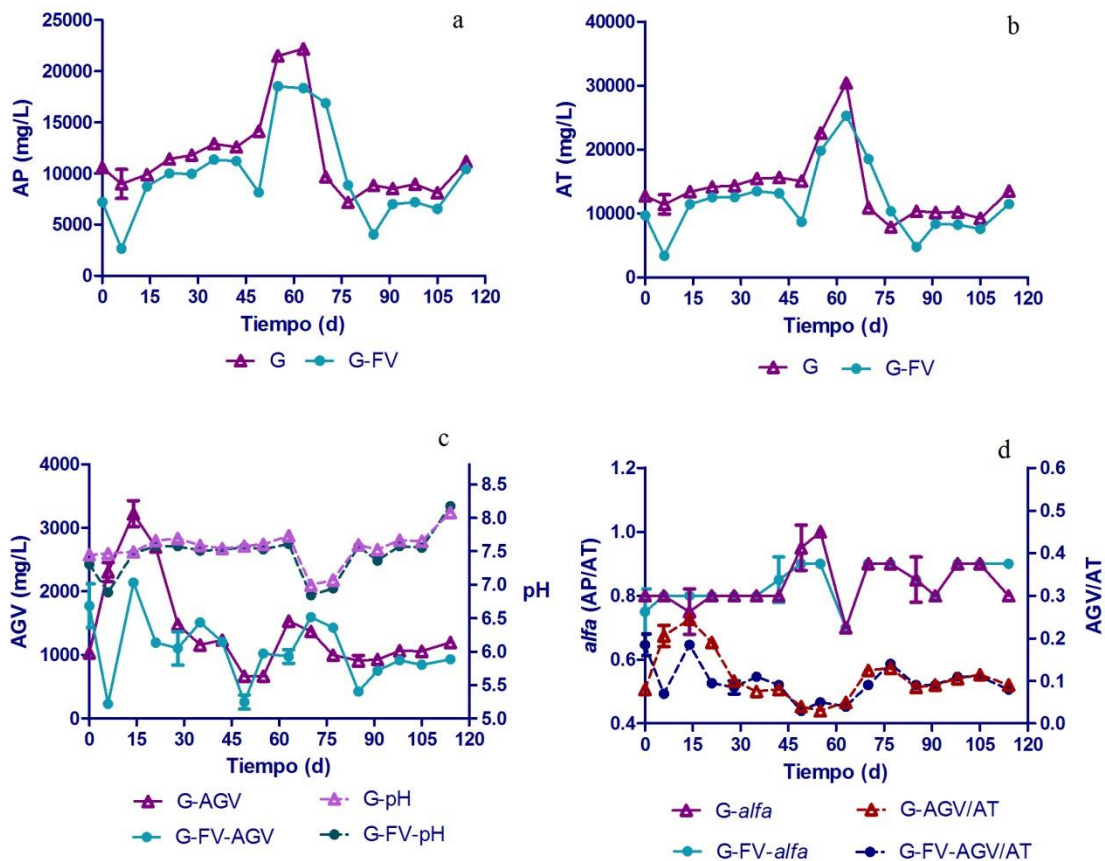


Figura 4. Monitoreo de los parámetros de control del proceso anaeróbico para los tratamientos G y G-FV. a) Evolución de la alcalinidad total (AT); b) Evolución de la alcalinidad parcial (AP); Evolución de los ácidos grasos volátiles (AGV) y el pH; d) Evolución de los indicadores de estabilidad *alfa* (AP/AT) y AGV/AT.

La AP (Figura 4 a) y AT (Figura 4 b) siguieron el mismo comportamiento, con un valor máximo de 30 g/L de AT y 22 g/L de AP en G y de 25 g/L de AT y 18 g/L de AP a los 63 d. Si bien la AP y la AT se mantuvieron dentro de un rango acotado tanto para G como

para G-FV, una caída de estas variables fue observada a los 6, 49 y 85 días de ensayo en el tratamiento G-FV.

Los AGV (Figura 4 c) mostraron valores máximos de 2,1 g/L y 3,2 g/L en G-FV y G respectivamente, a los 14 d del ensayo. Luego, la concentración de AGV decae en el tratamiento G, hasta alcanzar un valor mínimo de 0,7 g/L a los 49 d, para luego incrementarse hasta alcanzar un valor de 1,5 g/L a los 63 d del ensayo. En el caso del tratamiento G-FV se observó un comportamiento fluctuante en el tiempo, donde los picos mínimos se observaron a los 6, 49 y 85 d de ensayo, los mismos días donde se observaron las menores concentraciones de AT y AP, y los picos máximos ocurrieron a los 14, 35 y 70 d de ensayo. En cuanto al pH, mostró un comportamiento constante en el tiempo hasta los 63 d, para luego reflejar una caída a los 70-77 d del ensayo y un incremento posterior en el tiempo en ambos reactores G y G-FV. No se observaron diferencias marcadas de pH entre ambos reactores, y por otro lado, esta variable no reflejó los incrementos de AGV encontrados durante los primeros días del ensayo. Sin embargo, la caída observada del pH a los 70-77 días está relacionado con el incremento de los AGV en ese mismo período para ambos tratamientos.

Los indicadores de estabilidad del proceso, *alfa* y AGV/AT, mostraron estar siempre dentro de los valores de referencia que indican condiciones estables (*alfa* > 0,6 y AGV/AT < 0,3-0,4). Sin embargo, se destaca un valor mínimo de *alfa* de 0,7 a los 63 d, coincidente con los picos máximos alcanzados de AT y AP en ambos tratamientos. La relación AGV/AT mostró un incremento durante los primeros días y entre los 63-70 d del ensayo, reflejando el incremento de los AGV en ese mismo período.

Se calcularon los % de remoción de la materia orgánica como remoción de la DQO total (DQO_t) y de los SV. Los valores obtenidos fueron $64,9 \pm 8,9\%$ R de SV y $72,0 \pm 10,3\%$ R de DQO_t para G-FV, $58,5 \pm 7,4\%$ R de SV y $65,1 \pm 3,2\%$ R de DQO_t para G. Se observó una alta eficiencia de remoción de sustrato, alcanzando el 60% (como DQO y SV) en G y G-FV. El co-digerido mostró valores de reducción de SV significativamente superiores al tratamiento mono-digerido del guano ($p < 0,05$). Aunque no hubo diferencias significativas entre ambos tratamientos para DQO_t, se observó una tendencia de mayor remoción de este parámetro en G-FV. Por otro lado, la R de DQO_t y de los SV mostraron una correlación negativa con el parámetro NTK ($R^2 = -0,70$; $p \leq 0,05$).

Análisis de la calidad del digerido

Los valores promedios fisicoquímicos medidos en el digerido son mostrados en la Tabla 2. Los parámetros CE, DQO, Mn, Ca y Zn mostraron ser estadísticamente superiores en G.

Tabla 2. Propiedades físicas y químicas del digerido en los últimos seis eventos de muestreo en ambos tratamientos G y G-FV (promedio \pm desvío estándar).

Parámetro	Unidad	G-FV	G
CE	mS/cm	16,8 \pm 2,6 ^a	19,6 \pm 0,6 ^b
DQO	g/L	12,5 \pm 3,8 ^a	33,8 \pm 3,7 ^b
Ca	mg/L	1630,0 \pm 272,4 ^a	1771,0 \pm 454,6 ^b
Mg	mg/L	163,5 \pm 53,8 ^a	277,3 \pm 75,8 ^a
K	mg/L	1960,4 \pm 498,4 ^a	2117,5 \pm 270,4 ^a
Na	mg/L	701,8 \pm 36,2 ^a	702,3 \pm 60,9 ^a
Zn	mg/L	10,2 \pm 2,5 ^a	20,7 \pm 3,7 ^b
Mn	mg/L	6,3 \pm 2,5 ^a	19,1 \pm 2,7 ^b
Cu	mg/L	1,6 \pm 0,3 ^a	1,7 \pm 0,5 ^a
Fe	mg/L	57,0 \pm 17,3 ^a	76,5 \pm 12,5 ^a

Referencias. CE: conductividad eléctrica; DQO: demanda química de oxígeno. Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los tratamientos G y G-FV.

En el resto de los parámetros no se observaron diferencias significativas. En particular, los valores obtenidos de Cu y Zn, fueron comparados con la normativa de Reino Unido PAS 110 (2010) y con la reciente normativa Argentina (Res. 19/19, 2019). La normativa internacional establece como valores límites 400 mg/Kg de Zn y 200 mg/Kg de Cu y la normativa argentina, 300 mg/Kg de Zn y 150 mg/Kg de Cu (expresados en base seca). En este trabajo, las concentraciones de Zn fueron 391 \pm 89 mg/Kg (10,2 mg/L) y 596 \pm 100 mg/Kg (20,7 mg/L) y las concentraciones de Cu fueron 49,7 \pm 15, 6 mg/Kg (1,6 mg/L) y 60,0 \pm 9,6 mg/Kg (1,7 mg/L) en G-FV y G, respectivamente, expresadas como base seca. En la Tabla 3, se muestra el análisis microbiológico y parasitológico del digerido obtenido en el último muestreo, en ambos tratamientos G-FV y G.

Tabla 3. Análisis microbiológico y parasitológico en el último muestreo del digerido obtenido en ambos tratamientos G y G-FV.

	G-FV	G
Microorganismos		
Coliformes fecales	>1100 NMP/g	>1100 NMP/g
<i>E. coli</i>	presencia	presencia
<i>Salmonella</i> spp	ausencia	ausencia
<i>P. aeruginosa</i>	ausencia	ausencia
<i>Proteus Mirabilis</i>	presencia	presencia
Parásitos		
	<i>Strongylus avium</i>	<i>Strongylus avium</i>
	Huevos de	Ácaros
	Strongyloides	<i>Ascaridia</i> spp/ <i>Heterakis</i> spp

Referencias. NMP= número mas probable

Análisis de correlación

La Tabla 4 muestra los resultados obtenidos del análisis de correlación entre todos los parámetros analizados. La CE se correlacionó positivamente con NAT ($R^2= 0,79$; $p\leq 0,01$) y NTK ($R^2= 0,73$; $p\leq 0,01$), mostrando la influencia de este parámetro sobre la CE, donde una mayor concentración de amonio tendería a incrementar la CE. El elemento Zn tuvo una correlación positiva con el Mn ($R^2= 0,82$; $p\leq 0,01$), Mg ($R^2= 0,85$; $p\leq 0,001$), NAT ($R^2= 0,85$; $p\leq 0,05$) y NTK ($R^2= 0,88$; $p\leq 0,05$), mientras que éste tuvo una correlación negativa con el rendimiento de biogás ($R^2= -0,82$; $p\leq 0,05$) y rendimiento de metano ($R^2= -0,93$; $p\leq 0,01$). Mg y Mn mostraron una correlación positiva con el NAL ($R^2= 0,96$; $p\leq 0,05$) y el Fe ($R^2= 0,72$; $p\leq 0,05$), respectivamente, mientras que éstos metales mostraron una correlación negativa con el rendimiento de biogás ($R^2= -0,72$ y $R^2= -0,78$, respectivamente; $p\leq 0,05$). La correlación negativa del Zn, Mn y Mg con la producción de biogás podría indicar que estos metales tienen un efecto en las bacterias anaeróbicas, afectando negativamente la producción de biogás, y en particular el Zn, con las bacterias metanogénicas (correlación negativa con la producción de metano).

La DQO tuvo una correlación positiva con el NAT ($R^2= 0,86$; $p\leq 0,001$) y el NTK ($R^2= 0,87$; $p\leq 0,001$), mientras que tuvo una correlación negativa con el rendimiento de metano ($R^2= -0,83$; $p\leq 0,01$). Finalmente, los parámetros NAT y NTK tuvieron una correlación negativa con el rendimiento de biogás ($R^2= -0,74$ y $R^2= -0,73$, respectivamente; $p\leq 0,01$) y rendimiento de metano ($R^2= -0,86$ y $R^2= -0,89$, respectivamente; $p\leq 0,01$), indicando que estas variables afectan directamente el proceso de degradación del guano.

Tabla 4. Coeficientes de correlación de Pearson entre los parámetros fisicoquímicos en los dos reactores anaeróbicos.

	Ca	Zn	Mn	Fe	DQOr	SVr	NAT	NTK	NAL	PBE	PME
pH	-0.72**								0.90***		
CE							0.79**	0.73**			
Mg		0.85***							0.96*	-0.72*	
Zn			0.82**				0.85*	0.88*		-0.82*	-0.93**
Mn				0.72*						-0.78*	
DQO					-0.81***		0.86***	0.87***			-0.83**
DQOr								-0.70*			
SV						-0.99***					
SVr								-0.70*			
NAT								0.98***		-0.74**	-0.86**
NTK										-0.73**	-0.89**
PBE											0.89***

Los asteriscos indican co-relaciones significativas entre los parámetros: * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, and *** $p \leq 0,001$. DQOr y SVr representan la DQO y SV removidos, expresados como %.

7.4. Discusión

Caracterización de los sustratos y performance del proceso anaeróbico

Los sustratos utilizados mostraron alto contenido de materia orgánica y nutrientes, indicando condiciones favorables para el proceso biológico anaeróbico. Las características del guano y de las FV en este experimento fueron similares a las reportadas en otros trabajos (Alvarez and Lidén, 2008; Borowski and Weatherley, 2013; Gangagni Rao et al., 2011; Quiroga et al., 2010; Wang et al., 2012; Zhao et al., 2014). En particular, se encontraron altas concentraciones de N, P, Ca, Mg, Na, Mn, Cu y Zn en el sustrato G. El agregado del co-sustrato FV mejoró la relación C/N, incrementando esta relación de 6 a 9. Sin embargo, a pesar que el co-sustrato FV incrementó un 33% la relación C/N, no se logró alcanzar el rango óptimo comprendido entre 25-30 (Meegoda et al., 2018) y que requieren las bacterias metanogénicas para su desarrollo y supervivencia. Sin embargo, según Foster Carneiro (2005) la cantidad requerida de estos nutrientes en los proceso de digestión anaeróbica es variable según las especies de microorganismos existentes y el sustrato que se degrade.

En cuanto al análisis del biogás, los resultados mostraron que el proceso de la co-digestión del guano con FV mejoró la producción y rendimiento de biogás y metano (> 30%). Este efecto de mejora en la producción y rendimiento del gas, podría deberse a varios factores.

La composición de nutrientes del FV podría producir un efecto sinérgico junto con los nutrientes aportados por el guano, mejorando así el proceso. Otra causa podría ser por la dilución del potencial inhibitorio que es el amoníaco libre. La concentración de nitrógeno en la mezcla G-FV es menor que en el sustrato G. Además, la relación C/N fue mayor en la mezcla G-FV, mostrando también condiciones más favorables para el crecimiento y actividad de las metanogénicas. Otro factor influyente en la mejora del proceso es el mayor potencial bioquímico metanogénico (PBM) en FV comparado con el guano. Las FV poseen un alto porcentaje de materia orgánica biodegradable (75% de la materia seca es azúcar y hemicelulosa) que favorece la degradación de este residuo (Bouallagui et al., 2005; Gelegenis et al., 2007; Ren et al., 2018).

Por otro lado, se observó que en el reactor mono-digerido G, el PBE decayó luego de los 30 d. Sin embargo, este decaimiento no fue observado en el PME, el cual se mantuvo aproximadamente constante en el tiempo. Esto podría explicarse considerando las dos vías de formación del metano, mediante la acción de bacterias acetoclásticas e hidrogenotróficas. Las acetoclásticas son generalmente más sensibles que las hidrogenotróficas a compuestos tóxicos como el NAL. Así, altos niveles de NAL, pueden inhibir a las acetoclásticas pero el metano puede seguir generándose por las hidrogenotróficas, vía consumo de H_2 y CO_2 . Esto se refleja con una caída en la producción del biogás, no impactando en el contenido de metano en el gas total (Borowski et al., 2014).

En cuanto al monitoreo de los compuestos nitrogenados, se observó que hubo una tendencia hacia menores concentraciones de NTK, NAT y NAL en el proceso co-digerido. Esto está relacionado con el efecto de dilución del sustrato guano que es agregado con las FV, cuya composición de nitrógeno es menor. Las concentraciones encontradas en este trabajo fueron superiores a las reportadas por otros investigadores que encontraron inhibición con concentraciones de 1,7-1,8 g/L de NAT utilizando inóculos no aclimatados (Yenigün and Demirel, 2013).

La ausencia de inhibición en este trabajo, podría estar asociada al extenso período de adaptación de las bacterias al sustrato (7 meses) y al incremento paulatino de la VCO antes de arrancar el ensayo. Esto generó una biomasa aclimatada y con mayor tolerancia a concentraciones más altas de nitrógeno amoniacal, permitiendo un proceso estable de degradación anaeróbica del guano, evidenciado por la generación continua de biogás y metano. Varios estudios han reportado que la biomasa aclimatada, permite concentraciones hasta 4 g/L de NAT y hasta 1,1 g/L de NAL (Rajagopal et al., 2013;

Yenigün and Demirel, 2013). En este trabajo las concentraciones de NAT y NAL estuvieron por debajo de esas concentraciones críticas reportadas. Si bien no hubo una interrupción del proceso anaeróbico en el sistema G, pudo observarse una leve o parcial inhibición del proceso, reflejado por la caída en la PBE a partir de los 30 d. La falta de muestreo de los compuestos nitrogenados durante los primeros 60 d, impide relacionar esta caída del biogás con las concentraciones de NTK, NAT y NAL en ese momento. Por otro lado, las concentraciones de NAL en el co-digerido y mono-digerido fueron similares y siguieron la misma *performance* durante todo el período muestreado. Las máximas concentraciones alcanzadas de NAL (> 400 mg/L) y de pH (8,1) se relacionaron con la caída del PME a los 114 d en el tratamiento G. Probablemente, estas concentraciones pudieron afectar a las bacterias metanogénicas. Resultados similares fueron reportados por Duan et al. (2012), quien encontró una leve inhibición del proceso anaeróbico cuando las concentraciones de NAL se encontraron en el rango de 250-400 mg/L. Sin embargo, es de destacar que a pesar de haberse alcanzado la misma concentración de NAL y de valor de pH en G-FV a los 114 d, esta caída en la PME no fue observada, teniendo una respuesta diferente que el tratamiento G. Esta diferente respuesta en G-FV, podría deberse a que el proceso ocurrió a menores concentraciones de NTK que en G (3500 mg/L en G-FV Vs 4500 mg/L en G), o bien a diferencias en la composición biomásica, donde el proceso de co-digestión favoreció la selección de bacterias más tolerantes a las concentraciones de NAL. Mayores estudios son requeridos para explicar mejor esta diferencia encontrada entre ambos procesos.

En cuanto al efecto del pH, se observó que las mayores concentraciones de NAT y NAL estuvieron asociados a $\text{pH} > 8$ en ambos reactores G y G-FV. El incremento del pH condujo a un mayor porcentaje de NAL en solución. La bibliografía reporta que un $\text{pH} > 7$ puede producir un impacto negativo en la generación de biogás debido a una mayor presencia del amoníaco (Hadj et al., 2009; Rajagopal et al., 2013). Sin embargo, en el caso del proceso co-digerido, se encontraron pH superiores a 7 y no hubo disminución en la producción de biogás.

Existe una fuerte interacción y dependencia entre el NAL, el NAT y el pH, que para una mejor interpretación de estos inhibidores deberían ser relacionados entre sí. El porcentaje del NAL que proviene de la disociación del NAT y su relación con el pH, permitió clarificar las asociaciones entre estas variables. Cuando el pH fue superior a 7,4, el % del NAL en solución se incrementó exponencialmente, alcanzando 9-12% para $\text{pH} > 8$. Un resultado similar fue encontrado por Rajagopal et al (2013), quien encontró que un

digestor anaeróbico operado a pH 7 y a 35°C, la concentración de NAL se mantiene por debajo del 1% del NAT, y a pH 8, la concentración de NAL fue un 10% del NAT. La relación entre el NAL/NAT y el pH podrían ser indicadores de toxicidad e inhibición durante el proceso anaeróbico. En relación a lo expuesto entonces, en este ensayo se observó una caída del rendimiento de metano cuando el pH fue 8,1 y la relación NAL/NAT fue del 12%.

En cuanto a las variables de control que evalúan la *performance* del proceso, *alfa* y AGV/AT mostraron condiciones estables del proceso. *alfa* y AGV/AT indicaron estar dentro de los valores de referencia, con suficiente capacidad *buffer* para estabilizar el proceso anaeróbico en ambos reactores. Sin embargo estos indicadores no pudieron reflejar la cierta inestabilidad observada en G, reflejada por la disminución en la PBE y por la caída en el PME a los 114 d. Similares resultados fueron reportados por Duan et al. (2012), quien reportó una leve inhibición en el proceso pero la relación AGV/AT mostró condiciones estables al mismo tiempo.

El incremento de la concentración NAL conduce a un incremento de la AT. Esto pudo reflejarse a los 63 d del ensayo, donde un pico máximo de NAL es coincidente con el máximo valor alcanzado de la AT, en ambos tratamientos. Luego, hubo un incremento de la AGV que condujo a una caída del pH. La AT y NAL decaen por la caída del pH y el sistema alcanza un nuevo estado de equilibrio. Así la relación AGV/AT podría no reflejar la inestabilidad causada por el amoníaco, manteniendo la relación dentro del rango de referencia entre 0,3-0,4. Nie et al. (2015) también mostró que la mono-digestión del guano operó en condiciones estables con una relación AGV/AT entre 0,20-0,35 mientras que una inhibición parcial se encontró con concentraciones de 9,86 g/L de AGV y con concentraciones de $NAL < 0,6$ g/L.

En relación a la materia orgánica, se observó un alto porcentaje de remoción de DQO y SV (> 60%), indicando una eficiente degradación de la materia orgánica en ambos casos. El porcentaje de remoción se encontró comprendido dentro del rango reportado por Sakar et al. (2009), quien encontró entre 32% y 78% de DQO y SV de remoción para la digestión anaeróbica del guano. La comparación entre ambos tratamientos mostró que G-FV tuvo una mayor remoción de SV que G, asociado esto con la mayor producción y rendimiento de biogás y metano observado. Asimismo, la menor remoción de la materia orgánica en G, podría estar asociada con las mayores concentraciones de nitrógeno, evidenciado por la correlación negativa encontrada entre la DQO y los SV (removidos) con el NTK.

El nitrógeno amoniacal, sulfuros, metales y compuestos orgánicos son los inhibidores comúnmente encontrados en reactores anaeróbicos (Chen et al., 2014). El análisis de correlación de este trabajo, sugiere que alta materia orgánica, alto contenido de compuestos nitrogenados (como NTK y NAT) y alto contenido de ciertos elementos totales (Zn, Mg y Mn) podrían ser indicadores de la disminución del rendimiento de biogás y metano. Como se mencionó anteriormente (capítulo sobre caracterización del guano), estos elementos están presentes en el estiércol, debido a que ingresan en el animal a través de la alimentación, el uso de aditivos y como promotores del crecimiento (Bolan et al., 2004; F.A.O., 2008). Excesivas cantidades conducen a una acumulación de estos elementos en el estiércol, los cuales se acumulan en un proceso anaeróbico y pueden generar toxicidad para las bacterias anaeróbicas. Se ha reportado que bajas concentraciones de Zn^{2+} y con valor óptimo de 5 mg/L conduce a una mejora de la producción de biogás. Cantidades trazas de Zn^{2+} son necesarias para mantener el metabolismo celular, mientras que a altas concentraciones puede inhibir el crecimiento de las metanogénicas (Guo et al., 2019). En este trabajo se encontraron concentraciones superiores al valor óptimo para el desarrollo de las metanogénicas, siendo 10 mg/L y 20 mg/L para G-FV y G respectivamente.

Calidad del digerido

La CE mostró valores altos en ambos reactores G y G-FV. Si bien este parámetro no está incluido como parámetros de control en las normativas internacionales, debe considerarse que excesivas dosis o aplicaciones continuas del digerido podrían conducir a un incremento en la salinidad del suelo e inhibición en el crecimiento de las plantas (Albuquerque et al., 2012). Burton and Turner (2003) reportó que el agregado de residuos orgánicos con $CE > 4mS/cm$ al suelo en zonas áridas y semiáridas podría causar salinización, afectando la producción de los cultivos.

El promedio de los valores de Ca, Mg, K y Na en G, fueron similares a aquellos reportados por Nkoa (2014) y Voća et al (2005). Varios trabajos han demostrado que los digeridos derivados de guano, cerdo, forraje y residuos orgánicos domiciliarios son fertilizantes valiosos para la producción agrícola (Amon et al., 2007; Lukehurst et al., 2010; Weiland, 2010). Sin embargo, el exceso de algunos metales, considerados como macro o micronutrientes en el digerido, pueden ser perjudiciales tanto al suelo como a los cultivos. Tanto las concentraciones de Zn como Mn fueron significativamente mayores en G. Evidentemente, la co-digestión del guano tuvo un efecto de dilución en el digerido. El Zn puede acumularse y generar fitotoxicidad, causando peligrosidad sobre los suelos

agrícolas y sobre los cultivos. Aplicaciones repetidas de digerido al suelo puede resultar en acumulación de materia orgánica y Mn, factores que favorecen la toxicidad por Mn en suelos con baja capacidad de sorción de este metal (Nkoa, 2014).

La aplicación del digerido para su valorización agronómica, está limitada principalmente por el contenido de metales pesados. Tomando como referencia los valores límites que establecen la normativa de Reino Unido (PAS 110, 2010) y la normativa argentina (Res. 19/19, 2019), la concentración de Zn en el digerido G superó el valor límite establecido en ambas normativas. En el caso del digerido G-FV, su valor supera el límite establecido por la normativa argentina solamente. Se destaca que las concentraciones de Zn fueron elevadas en ambos digeridos. Probablemente esto esté asociado al manejo y alimentación de las aves. En cuanto a las concentraciones de Cu obtenidas en ambos digeridos, se encontraron por debajo de los límites permitidos en ambas normativas.

El análisis microbiológico, mostró la presencia de *E. coli* y coliformes fecales superiores a los límites establecidos por la normativa argentina en los digeridos de ambos tratamientos G y G-FV, limitando así su aplicación para su valorización agronómica. Por otro lado, se encontró presencia *P mirabilis* y de parásitos en ambos digeridos. En el digerido del tratamiento G-FV se observó ausencia de ácaros y de *Ascaridia* spp/*Heterakis* spp, mientras que en el tratamiento G se encontraron ambos parásitos en el digerido. El proceso de co-digestión del guano con FV favorece la eliminación de estos parásitos. Sin embargo, debido a que solo se realizó en el último muestreo, se requieren mayores estudios para confirmar este efecto y su causa.

7.5. Resumen y Conclusiones

El guano de aves ponedoras co-digerido con residuos de frutas y verduras condujo a una mayor producción y rendimiento de biogás y metano, mayor remoción de materia orgánica, menores concentraciones de compuestos inhibitorios y una mayor calidad del digerido. Específicamente:

- El agregado de FV condujo a un incremento superior al 31% de la PBE y la PME. Esto podría deberse a las características intrínsecas de las FV (alta biodegradabilidad y alto potencial metanogénico), al incremento de la C/N y/o a la dilución de los compuestos nitrogenados.
- La mono-digestión del guano condujo a una parcial inhibición en el rendimiento de

biogás, pero el rendimiento de metano no fue afectado. Esto podría estar asociado a la afección de las bacterias acetoclásticas y no a las hidrogenotróficas, las cuales siguen produciendo metano. Se requieren mayores estudios para determinar la causa. Esto podría estar asociado a las mayores concentraciones de los compuestos nitrogenados NAT (3,54 mg/L) y NTK (4,44 mg/L) encontrados, y no a la concentración del NAL, ya que en ambos casos estos valores fueron similares.

- Los parámetros de control, *alfa*, AGV/AT y pH, mostraron siempre condiciones estables en ambos tratamientos. Sin embargo, estos indicadores no reflejaron la inestabilidad observada en el sistema mono-digerido del guano.
- Los valores de Ca, CE, Mn y Zn, fueron más altos en el tratamiento mono-digerido del guano. Particularmente, las concentraciones de Zn encontradas en este digerido superaron los valores permitidos por la normativa internacional y Argentina, para su aplicación como valorización agronómica.
- El análisis microbiológico y parasitológico realizado en el último muestreo, mostró que el digerido proveniente de ambos reactores no cumplió con las características de higienización necesarias para asegurar la inocuidad de su aplicación al suelo.
- El análisis de correlación sugirió que la materia orgánica, los compuestos nitrogenados (NAT y NTK) y ciertos elementos totales (Zn, Mg, Mn) podrían ser indicadores de la reducción del rendimiento de biogás y metano.

Asimismo, la co-digestión del guano con frutas y verduras sería recomendable, no solo por los beneficios mencionados anteriormente, sino también porque representa una alternativa de tratamiento de dos residuos altamente problemáticos a nivel local, regional y territorial.

Por otro lado, la digestión anaeróbica del guano mono-digerido y co-digerido con residuos de frutas y verduras en un reactor piloto de alimentación semi-continua generó información sobre las concentraciones de compuestos nitrogenados que generaron una inhibición parcial, sobre los rendimientos de biogás y metano, como así también sobre las potencialidades y limitantes del digerido. Estos aportes permitirán ajustar variables de diseño, de control y de monitoreo para la implementación de plantas de biogás a escala real.

8. Conclusiones y Comentarios Generales

En general, el guano (G) presentó características favorables para que pueda ser tratado por digestión anaeróbica (DA): rico en materia orgánica, nutrientes esenciales (N, P, K), nutrientes secundarios (Ca, Mg, S) y elementos trazas (Cu, Zn, Fe, Mn). Sin embargo, presentó concentraciones altas de nitrógeno amoniacal (N-NH₃), pH alcalino, concentraciones altas de Na y Zn, los cuales son potenciales inhibidores y limitantes del proceso.

Se caracterizó y comparó el G generado en los dos sistemas principales de manejo de la producción avícola en Argentina: el sistema convencional (SC) y el sistema automatizado (SA) de jaulas en batería. La comparación demostró que las condiciones de manejo de este residuo, condicionan sus características intrínsecas. Si bien las concentraciones de compuestos nitrogenados son mayores en el G del SA, éste sería el más recomendable para ser tratado por DA. El G del SC va perdiendo carbono y humedad, concentrando nutrientes y compuestos tóxicos (Mn, Fe) y con mayor presencia de microorganismos patogénicos y parásitos.

Se ajustó la metodología e implementó el ensayo de Actividad Metanogénica Específica (AME), el cual es una herramienta de control de la actividad de la biomasa, ampliamente utilizada en plantas de biogás, pero con escasos antecedentes de su implementación en nuestro país. Para ello, se generó la protocolización del ensayo y reactores de diseño propio que aseguraron las condiciones de hermeticidad durante todo el ensayo y permitieron medir el volumen de biogás y metano de una forma práctica y precisa. Se evaluó la AME en inóculos de diferentes orígenes y de plantas en funcionamiento, siendo los lodos de cervecería, del tipo granular, los que mayor actividad presentaron.

Se determinó el potencial energético del G, mediante la implementación del ensayo de potencial bioquímico metanogénico (PBM), el cual es una metodología de gran aplicación como estudios de viabilidad técnica. Se evaluaron factores que influyen en la determinación del PBM para ajustar la metodología y la optimización del proceso: la relación entre el sustrato y el inóculo (S/I) y las características del inóculo, considerando su origen, la AME, y el efecto de la aclimatación al sustrato (IA= inóculo adaptado, I= inóculo sin adaptación). Se concluye que la relación de S/I es influyente en el PBM, siendo S/I= 0,4 gSV/gSSV la mejor relación obtenida, y la actividad del inóculo (AME) tiene mayor influencia que la aclimatación al tipo de sustrato. Sin embargo, para relaciones más altas, estas diferencias ya no son marcadas, y ambos inóculos (IA e I) responden generando el mismo rendimiento de metano y biodegradabilidad del residuo. Se recomienda utilizar inóculos con alta actividad microbiana y del tipo granular para

determinar el PBM. Por otro lado, el rendimiento de metano disminuyó en un 30% cuando se utilizó un inóculo aclimatado. Esta información podrá ser utilizada como referencia para el escalamiento, estimando el rendimiento máximo de metano en una planta de biogás que utilizará biomasa aclimatada al sustrato como una estrategia para minimizar la toxicidad por altas concentraciones de nitrógeno amoniacal.

Se evaluó el PBM del G co-digerido con otros dos residuos: vacuno (V) y frutas y verduras (FV), utilizando el proceso de co-digestión como una estrategia para la optimización de la DA. Hubo una tendencia hacia la mejora del proceso anaeróbico con el G co-digerido con FV, evidenciado por un mayor rendimiento de metano, biogás e índice de biodegradabilidad. Por otro lado, el análisis parasitológico y microbiológico mostró que con tiempos de retención de 48 días, se eliminaron los microorganismos patogénicos coliformes fecales, *E. coli* y *Salmonella*, generando un producto digerido en condiciones seguras de sanitización.

El estudio de la digestión anaeróbica en reactores semi-continuos a escala piloto permitió aproximar las condiciones de trabajo que son implementadas en una planta de biogás a escala real. El G co-digerido con FV condujo a un 30% más de producción y rendimiento de biogás y metano, mayor remoción de materia orgánica, menores concentraciones de compuestos inhibitorios y una mayor calidad del digerido que el G mono-digerido. Sin embargo, en ambos procesos se obtuvieron concentraciones altas de Zn en el digerido, y microorganismos patogénicos, los cuales limitan su aplicación para su valorización agronómica. Se recomienda modificar variables de manejo en la producción avícola que minimicen la presencia de patógenos, parásitos y compuestos que generan toxicidad tanto para el proceso como para el digerido. Finalmente, se concluye que la co-digestión del G con FV no solo genera beneficios en la DA, sino también representa una alternativa de tratamiento de dos residuos altamente problemáticos en nuestro país que podrían ser utilizados como recursos energéticos.

El trabajo realizado en esta tesis, permitió generar equipamiento y desarrollar dos ensayos de gran aplicabilidad y con alta demanda a nivel territorio. El análisis integral de la degradación anaeróbica del G, evaluado tanto a escala laboratorio como piloto brindó información para el *scaling up* y la implementación de esta tecnología a escala real.

Por otro lado, la caracterización del G y del digerido permitió generar información regional, esperando que sirvan de base para impulsar la generación de nuevas alternativas de manejo y gestión en la producción avícola, que mejoren las condiciones de este residuo y maximicen su utilización como recurso energético.

9. Bibliografía

- Abdallah, M., Shanableh, A., Adghim, M., Ghenai, C., Saad, S., 2018. Biogas production from different types of cow manure. 2018 Adv. Sci. Eng. Technol. Int. Conf. ASET 2018 1–4. <https://doi.org/10.1109/ICASET.2018.8376791>
- Abouelenien, F., Kitamura, Y., Nishio, N., Nakashimada, Y., 2009. Dry anaerobic ammonia-methane production from chicken manure. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 82, 757–764. <https://doi.org/10.1007/s00253-009-1881-3>
- Ahring, B.K., Sandberg, M., Angelidaki, I., 1995. Volatile fatty acids as indicators of process imbalance in anaerobic digestors. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 43, 559–565. <https://doi.org/10.1007/BF00218466>
- Akindele, A.A., 2016. The effects of Ammonia on Anaerobic Digestion of the Organic Fraction of Municipal Solid Wastes. Thesis. Master of Applied Science in Civil Engineering. Ottawa, Ontario, Canada.
- Al Seadi, T., Drosch, B., Fuchs, W., Rutz, D., Janssen, R., 2013. Biogas digestate quality and utilization, *The Biogas Handbook: Science, Production and Applications*. <https://doi.org/10.1533/9780857097415.2.267>
- 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>
- Albuquerque, J.A., de la Fuente, C., Bernal, M.P., 2012. Chemical properties of anaerobic digestates affecting C and N dynamics in amended soils. *Agric. Ecosyst. Environ.* 160, 15–22. <https://doi.org/10.1016/j.agee.2011.03.007>
- Alvarez, R., Lidén, G., 2008. Semi-continuous co-digestion of solid slaughterhouse waste, manure, and fruit and vegetable waste. *Renew. Energy* 33, 726–734. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2007.05.001>
- Amha, Y.M., Anwar, M.Z., Brower, A., Jacobsen, C.S., Stadler, L.B., Webster, T.M., Smith, A.L., 2018. Inhibition of anaerobic digestion processes: applications of molecular tools. *Bioresour. Technol.* 247, 999–1014.
- Amon, T., Amon, B., Kryvoruchko, V., Zollitsch, W., Mayer, K., Gruber, L., 2007. Biogas production from maize and dairy cattle manure-Influence of biomass composition on the methane yield. *Agric. Ecosyst. Environ.* 118, 173–182. <https://doi.org/10.1016/j.agee.2006.05.007>
- Angelidaki and Sanders, 2004. Assesment of the anaerobic biodegradabilty of macropollutants. *Rev. Environ. Sci. bio/technology* 3, 117–129.
- 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>
- Angelonidi, E., Smith, S.R., 2015. A comparison of wet and dry anaerobic digestion processes for the treatment of municipal solid waste and food waste. *Water Environ. J.* 29, 549–557. <https://doi.org/10.1111/wej.12130>
- APHA, 1992. *Metodos normalizados para el análisis de aguas potables y residuales*, 17th edn. ed. American Public Health Association, Washington.
- 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.peccs.2008.06.002>
- Aquino, S.F., Chernicharo, C.A., Foresti, E., Dos Santos, Maria L. F. Monteggia, L.O., 2007. Methodologies for determining the Specific Methanogenic Activity (SMA) in Anaerobic Sludges. *Eng. sanit. Ambient* 12, 192–201.
- Arogo, J., Westerman, P.W., Heber, A.J., Robarge, W.P., Classen, J.J., 2001. Ammonia in animal production - A review. <https://doi.org/10.13031/2013.4136>
- Astals, S., Batstone, D.J., Tait, S., Jensen, P.D., 2015. Development and validation of a rapid test for anaerobic inhibition and toxicity. *Water Res.* 81, 208–215. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2015.05.063>
- Baloš Živkov, M., Jakšić, S., Knežević, S., Kapetanov, M., 2016. Electrolytes – Sodium, potassium and chlorides in poultry nutrition. *Arh. Vet. Med.* 9, 31–42.
- Bayrakdar, A., Molaey, R., Sürmeli, R.Ö., Sahinkaya, E., Çalli, B., 2017. Biogas production from chicken manure: Co-digestion with spent poppy straw. *Int. Biodeterior. Biodegradation* 119, 205–210.
- Beily, M.E., 2015. *Caracterización de efluentes de cerdos, con énfasis en su biodegradabilidad anaeróbica*. Instituto Tecnológico de Buenos Aires (ITBA).
- Beltrán de Estrada, M., Tello Casanova, R., Náquira Velarde, C., 2003. *Manual de procedimientos de laboratorio para el diagnóstico de los parásitos intestinales del hombre*. Ministerio de Salud, Instituto Nacional de Salud. Lima, Peru.
- Bernal, M.P.; Albuquerque, J.A.; Bustamante, M.A. y Carrillo, R.C., 2016. *Guía de utilización agrícola de los materiales digeridos por biometanización*.
- 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>
- Bloem, E., Albiñá, A., Elving, J., Hermann, L., Lehmann, L., Sarvi, M., Schaaf, T., Schick, J., Turtola, E., Ylivainio, K., 2017. Contamination of organic nutrient sources with potentially toxic elements, antibiotics and pathogen microorganisms in relation to P fertilizer potential and treatment options for the production of sustainable fertilizers: A review. *Sci. Total Environ.* 607–608, 225–242. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.06.274>
- BOLAN, N., ADRIANO, D., MAHIMAIRAJA, S., 2004. Distribution and Bioavailability of Trace Elements in Livestock and Poultry Manure By-Products. *Crit. Rev. Environ. Sci. Technol.* 34, 291–338. <https://doi.org/10.1080/10643380490434128>
- Bolan, N.S., Adriano, D.C., Mahimairaja, S., 2004. Distribution and bioavailability of trace elements in livestock and poultry manure by-products distribution and bioavailability of trace elements in livestock and poultry manure by-products. *Crit. Rev. Environ. Sci. Technol.* 34, 291–338. <https://doi.org/10.1080/10643380490434128>
- Bolan, N.S., Szogi, A.A., Chuasavathi, T., Seshadri, B., Rothrock JR., M.J., Panneerselvam, P., 2010. Uses and management of poultry litter. *Worlds. Poult. Sci. J.* 66, 673–698. <https://doi.org/10.1017/S0043933910000656>
- Borowski, S., Domański, J., Weatherley, L., 2014. Anaerobic co-digestion of swine and poultry manure with municipal sewage sludge. *Waste Manag.* 34, 513–521. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2013.10.022>
- Borowski, S., Weatherley, L., 2013. Co-digestion of solid poultry manure with municipal sewage sludge. *Bioresour. Technol.* 142, 345–352. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.05.047>
- Bouallagui, H., Touhami, Y., Ben Cheikh, R., Hamdi, M., 2005. Bioreactor performance in anaerobic digestion of fruit and vegetable wastes. *Process Biochem.* 40, 989–995. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2004.03.007>
- Bres, P., Beily, M.E., Crespo, D., Juan, O., 2011. Co-digestión de la fracción orgánica de residuos sólidos domiciliarios con aserrín en reactores anaerobios semicontinuos 15, 9–16.
- Buffiere, P., Loisel, D., Bernet, N., Delgenes, J.P., 2006. Towards new indicators for the prediction of solid waste anaerobic digestion properties. *Water Sci. Technol.* 53,

233–241. <https://doi.org/10.2166/wst.2006.254>

- Burton, C. H., Turner, C., 2003. Treatment strategies for sustainable agriculture, 2nd edn. ed. Wrest Park Bedford UK, Sisloe Research Institute, Sisloe Research Institute.
- Calli, B., Mertoglu, B., Inanc, B., Yenigun, O., 2005. Effects of high free ammonia concentrations on the performances of anaerobic bioreactors. *Process Biochem.* 40, 1285–1292. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2004.05.008>
- Campagnolo, E.R., Johnson, K.R., Karpati, A., Rubin, C.S., Kolpin, D.W., Meyer, M.T., Esteban, J.E., Currier, R.W., Smith, K., Thu, K.M., McGeehin, M., 2002. Antimicrobial residues in animal waste and water resources proximal to large-scale swine and poultry feeding operations. *Sci. Total Environ.* 299, 89–95. [https://doi.org/10.1016/S0048-9697\(02\)00233-4](https://doi.org/10.1016/S0048-9697(02)00233-4)
- Cháves-Fuentes, J. ., Capobianco, A., Barbušová, J., Hutnan, M., 2017. Manure from our agricultural Animals : a quantitative and qualitative analysis focused on biogas production. *Waste and Biomass Valorization* 8, 1749–1757. <https://doi.org/10.1007/s12649-017-9970-5>
- Chen, J.L., Ortiz, R., Steele, T.W.J., Stuckey, D.C., 2014. Toxicants inhibiting anaerobic digestion: A review. *Biotechnol. Adv.* 32, 1523–1534. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2014.10.005>
- Chen, Y., Cheng, J.J., Creamer, K.S., 2008. Inhibition of anaerobic digestion process: A review. *Bioresour. Technol.* 99, 4044–4064. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2007.01.057>
- chen2008-inhibition ammonia, n.d.
- Cho, Y., Young, J., Moon, H., 2005. Factors affecting measurement of specific methanogenic activity. *Water Sci. Technol.* 52, 435–440. <https://doi.org/https://doi.org/10.2166/wst.2005.0550>
- Cooper, K.K., Songer, J.G., Uzal, F.A., 2013. Diagnosing clostridial enteric disease in poultry. *J. Vet. Diagnostic Investig.* 25, 314–327. <https://doi.org/10.1177/1040638713483468>
- Cornet, C., Euverink, G.J.W., 2017. Inhibiting factors in the anaerobic digestion process for biogas production. University of Groningen and Byosis group.
- Dai, X., Yan, H., Li, N., He, J., Ding, Y., Dai, L., Dong, B., 2016. Metabolic adaptation of microbial communities to ammonium stress in a high solid anaerobic digester with dewatered sludge. *Nat. Publ. Gr.* 1–10. <https://doi.org/10.1038/srep28193>
- Dar, S.A., Kleerebezem, R., Stams, A.J.M., Kuenen, J.G., Muyzer, G., 2008. Competition

- and coexistence of sulfate-reducing bacteria, acetogens and methanogens in a lab-scale anaerobic bioreactor as affected by changing substrate to sulfate ratio. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 78, 1045–1055. <https://doi.org/10.1007/s00253-008-1391-8>
- De Vrieze, J., Raport, L., Willems, B., Verbrugge, S., Volcke, E., Meers, E., Angenent, L.T., Boon, N., 2015. Inoculum selection influences the biochemical methane potential of agro-industrial substrates. *Microb. Biotechnol.* 8, 776–786. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.12268>
- Deublein, D., Steinhauser, A., 2011. *Biogas from waste and renewable resources: an introduction*. John Wiley & Sons.
- 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>
- Drosg, B., 2013. *Process monitoring in biogas plants*. IEA Bioenergy Paris, France.
- Duan, N., Dong, B., Wu, B., Dai, X., 2012. High-solid anaerobic digestion of sewage sludge under mesophilic conditions: Feasibility study. *Bioresour. Technol.* 104, 150–156. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.10.090>
- Edwiges, T., Frare, L., Mayer, B., Lins, L., Mi Triolo, J., Flotats, X., de Mendonça Costa, M.S.S., 2018. Influence of chemical composition on biochemical methane potential of fruit and vegetable waste. *Waste Manag.* 71, 618–625. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2017.05.030>
- Eigaard, N.M., Schou, T.W., Permin, A., Christensen, J.P., Ekstrøm, C.T., Ambrosini, F., Cianci, D., Bisgaard, M., 2006. Infection and excretion of *Salmonella* Enteritidis in two different chicken lines with concurrent *Ascaridia galli* infection. *Avian Pathol.* 35, 487–493. <https://doi.org/10.1080/03079450601071696>
- Elbeshbishy, E., Nakhla, G., Hafez, H., 2012. Biochemical methane potential (BMP) of food waste and primary sludge: Influence of inoculum pre-incubation and inoculum source. *Bioresour. Technol.* 110, 18–25. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.01.025>
- Esposito, G., Frunzo, L., Giordano, A., Liotta, F., Panico, A., Pirozzi, F., 2012. Anaerobic co-digestion of organic wastes. *Rev. Environ. Sci. Biotechnol.* 11, 325–341. <https://doi.org/10.1007/s11157-012-9277-8>
- Esteves, S., Miltner, M., Fletch, S., 2013. *Monitoring review and guide for the optimisation of anaerobic digestion and biomethane plants*.
- F.A.O., 2008. *Poultry in the 21st Century: avian influenza and beyond*, FAO Animal. ed.

- Proceedings of the International Poultry Conference, held 5–7 November 2007, Bangkok, Thailand, Rome.
- Fang-1994-Microbial structure and activity of UASB granules treating different wastewaters.pdf, n.d.
- Fen, C., Gao, Y., Wei, L., Fenwu, L., Wuping, Z., Yushan, B., Xiaomei, L., 2017. Maximal methane potential of different animal manures collected in northwest region of China. *Int. J. Agric. Biol. Eng.* 10, 202–208. <https://doi.org/10.3965/j.ijabe.20171001.2469>
- 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.
- Franke-Whittle, I.H., Insam, H., 2013. Treatment alternatives of slaughterhouse wastes, and their effect on the inactivation of different pathogens: a review. *Crit. Rev. Microbiol.* 39, 139–151. <https://doi.org/10.3109/1040841X.2012.694410>
- Fuchs, W., Wang, X., Gabauer, W., Ortner, M., Li, Z., 2018. Tackling ammonia inhibition for efficient biogas production from chicken manure: Status and technical trends in Europe and China. *Renew. Sustain. Energy Rev.* 97, 186–199. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2018.08.038>
- Gangagni Rao, A., Surya Prakash, S., Joseph, J., Rajashekhara Reddy, A., Sarma, P.N., 2011. Multi stage high rate biomethanation of poultry litter with self mixed anaerobic digester. *Bioresour. Technol.* 102, 729–735. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.08.069>
- Gao, S., Zhao, M., Chen, Y., Yu, M., Ruan, W., 2015. Tolerance response to in situ ammonia stress in a pilot-scale anaerobic digestion reactor for alleviating ammonia inhibition. *Bioresour. Technol.* 198, 372–379.
- Gelegenis, J., Georgakakis, D., Angelidaki, I., Mavris, V., 2007. Optimization of biogas production by co-digesting whey with diluted poultry manure. *Renew. Energy* 32, 2147–2160. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2006.11.015>
- Gerber, P., Opio, C., Steinfeld, H., 2007. Poultry production and the environment-A review. *Fao* 1–27.
- Glatz, P., Miao, Z., Rodda, B., 2011. Handling and treatment of poultry hatchery waste: A review. *Sustainability* 3, 216–237. <https://doi.org/10.3390/su3010216>
- González-Fernández, C., García-Encina, P.A., 2009. Impact of substrate to inoculum ratio

- in anaerobic digestion of swine slurry. *Biomass and Bioenergy* 33, 1065–1069. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2009.03.008>
- Greger, M., Koneswaran, G., 2010. The public health impacts of concentrated animal feeding operations on local communities. *Fam. Community Health* 33, 11–20.
- Gu, Y., Chen, X., Liu, Z., Zhou, X., Zhang, Y., 2014. Effect of inoculum sources on the anaerobic digestion of rice straw. *Bioresour. Technol.* 158, 149–155. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.02.011>
- 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>
- Guo, Q., Majeed, S., Xu, R., Zhang, K., Kakade, A., Khan, A., Hafeez, F.Y., Mao, C., Liu, P., Li, X., 2019. Heavy metals interact with the microbial community and affect biogas production in anaerobic digestion: A review. *J. Environ. Manage.* 240, 266–272. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2019.03.104>
- Hadj, B.E., Astals, S., Galí, A., Mace, S., Mata-Álvarez, J., 2009. Ammonia influence in anaerobic digestion of OFMSW. *Water Sci. Technol.* 59, 1153–1158. <https://doi.org/10.2166/wst.2009.100>
- Hansen, K.H., Angelidaki, I., Ahring, B.K., 1998. Anaerobic digestion of swine manure: Inhibition by ammonia. *Water Res.* 32, 5–12. [https://doi.org/10.1016/S0043-1354\(97\)00201-7](https://doi.org/10.1016/S0043-1354(97)00201-7)
- Hartley, K., Lant, P., 2006. Eliminating non-renewable CO₂ emissions from sewage treatment: An anaerobic migrating bed reactor pilot plant study. *Biotechnol. Bioeng.* 95, 384–398.
- Hashimoto, A.G., 1989. Effect of Inoculum [Substrate Ratio on Methane Yield and Production Rate from Straw Experiment design. *Biol. Wastes* 28, 247–255. [https://doi.org/10.1016/0269-7483\(89\)90108-0](https://doi.org/10.1016/0269-7483(89)90108-0)
- He, Z., Zhang, H., 2014. Applied manure and nutrient chemistry for sustainable agriculture and environment. Springer Science+Business Media Dordrecht, New Orleans, USA. <https://doi.org/10.1007/978-94-017-8807-6>
- Hejnfelt, A., Angelidaki, I., 2009. Anaerobic digestion of slaughterhouse by-products. *Biomass and Bioenergy* 33, 1046–1054. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2009.03.004>
- Herrmann, C., Heiermann, M., Idler, C., 2011. Effects of ensiling, silage additives and storage period on methane formation of biogas crops. *Bioresour. Technol.* 102,

5153–5161.

- Hinrichsen, L.K., Labouriau, R., Engberg, R.M., Knierim, U., Sørensen, J.T., 2016. Helminth infection is associated with hen mortality in Danish organic egg production. *Vet. Rec.* 179, 196. <https://doi.org/10.1136/vr.103614>
- Ho, L., Ho, G., 2012. Mitigating ammonia inhibition of thermophilic anaerobic treatment of digested piggery wastewater: Use of pH reduction, zeolite, biomass and humic acid. *Water Res.* 46, 4339–4350. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2012.05.016>
- Holliger, C., Alves, M., Andrade, D., Angelidaki, I., Astals, S., Baier, U., Bougrier, C., Buffière, P., Carballa, M., de Wilde, V., Ebertseder, F., Fernández, B., Ficara, E., Fotidis, I., Frigon, J.-C., de Lacroix, H.F., Ghasimi, D.S.M., 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., Paus, A., Pommier, S., Porqueddu, I., Raposo, F., Ribeiro, T., Rüsche Pfund, F., Strömberg, S., Torrijos, M., van Eekert, M., van Lier, J., Wedwitschka, H., Wierinck, I., 2016. Towards a standardization of biomethane potential tests. *Water Sci. Technol.* 74, 2515–2522. <https://doi.org/10.2166/wst.2016.336>
- Hribar 2010 Understanding-CAFOs-and-Their-Impact-on-Communities.pdf, n.d. <https://doi.org/Hribar>, C. (2010). Concentrated Animal Feeding Operations and Their Impact on Communities.
- Hribar, C., 2010. Understanding concentrated animal feeding operations and their impact on communities. *Natl. Assoc. Local Boards Heal.*
- Hruby, C.E., Soupir, M.L., Moorman, T.B., Pederson, C., Kanwar, R., 2018. *Salmonella* and fecal indicator bacteria survival in soils amended with poultry manure. *Water. Air. Soil Pollut.* 229, 32. <https://doi.org/10.1007/s11270-017-3667-z>
- Hu, Y., Cheng, H., Tao, S., 2017. Environmental and human health challenges of industrial livestock and poultry farming in China and their mitigation. *Environ. Int.* 107, 111–130. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2017.07.003>
- Hussain, A., Dubey, S.K., 2017. Specific methanogenic activity test for anaerobic degradation of influents. *Appl. water Sci.* 7, 535–542.
- Inhat, M., Fernandes, L., 1996. Trace elemental characterization of composted poultry manure 57, 143–156.
- International Egg Commission, 2010. The egg industry 2010. A global view. [WWW Document]. <http://www.internationalegg.com>.
- Islam, M., Doyle, M.P., Phatak, S.C., Millner, P., Jiang, X., 2004. Persistence of

- enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157: H7 in soil and on leaf lettuce and parsley grown in fields treated with contaminated manure composts or irrigation water. *J. Food Prot.* 67, 1365–1370.
- James, A., Chernicharo, C.A.L., Campos, C.M.M., 1990. The development of a new methodology for the assessment of specific methanogenic activity. *Water Res.* 24, 813–825. [https://doi.org/10.1016/0043-1354\(90\)90131-O](https://doi.org/10.1016/0043-1354(90)90131-O)
- Jenkins, S.R., Morgan, J.M., Zhang, X., 1991. Measuring the Usable Carbonate Alkalinity of Operating Anaerobic Digesters. *Res. J. Water Pollut. Control Fed.* 63, 28–34.
- Jiang, J., Wu, J., Poncin, S., Li, H.Z., 2016. Effect of hydrodynamic shear on biogas production and granule characteristics in a continuous stirred tank reactor. *Process Biochem.* 51, 345–351.
- Jiang, Y., Banks, C., Zhang, Y., Heaven, S., Longhurst, P., 2018. Quantifying the percentage of methane formation via acetoclastic and syntrophic acetate oxidation pathways in anaerobic digesters. *Waste Manag.* 71, 749–756. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2017.04.005>
- Jijai, S., Srisuwan, G., O-thong, S., Ismail, N., Siripatana, C., Sukosol, T., 2014. (ENRIC 2014) The 1 st Environment and Natural Resources International Conference Specific Methanogenic Activities (SMA) and Biogas Production of Different Granules Size and Substrates (ENRIC 2014) The 1 st Environment and Natural Resources Internati 7–10.
- Jimenez, J., Latrille, E., Harmand, J., Robles, A., Ferrer, J., Gaida, D., Wolf, C., Mairet, F., Bernard, O., Alcaraz-Gonzalez, V., Mendez-Acosta, H., Zitomer, D., Totzke, D., Spanjers, H., Jacobi, F., Guwy, A., Dinsdale, R., Premier, G., Mazhegrane, S., Ruiz-Filippi, G., Seco, A., Ribeiro, T., Pauss, A., Steyer, J.P., 2015. Instrumentation and control of anaerobic digestion processes: a review and some research challenges. *Rev. Environ. Sci. Biotechnol.* 14, 615–648. <https://doi.org/10.1007/s11157-015-9382-6>
- Jun, D., Yong-sheng, Z., Mei, H., Wei-hong, Z., 2009. Influence of alkalinity on the stabilization of municipal solid waste in anaerobic simulated bioreactor. *J. Hazard. Mater.* 163, 717–722. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2008.07.066>
- Kafle, G.K., Chen, L., 2016. Comparison on batch anaerobic digestion of five different livestock manures and prediction of biochemical methane potential (BMP) using different statistical models. *Waste Manag.* 48, 492–502.

- Kayhanian, M., 1999. Ammonia inhibition in high-solids biogasification: an overview and practical solutions. *Environ. Technol.* 20, 355–365.
- Kayranli, B., Ugurlu, A., 2012. Assessment of methanogenic activity and kinetics of anaerobic granular sludge. *Fresenius Environ. Bull.* 21, 2394–2398.
- Kelleher, B.P., Leahy, J.J., Henihan, a M., O’Dwyer, T.F., Sutton, D., Leahy, M.J., 2002. Advances in poultry litter disposal technology--a review. *Bioresour. Technol.* 83, 27–36. [https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(01\)00133-X](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(01)00133-X)
- Khanal, S.K., 2008. *Anaerobic Biotechnology for Bioenergy Production* Anaerobic Biotechnology for Bioenergy Production.
- Koch, K., Lippert, T., Drewes, J.E., 2017. The role of inoculum’s origin on the methane yield of different substrates in biochemical methane potential (BMP) tests. *Bioresour. Technol.* 243, 457–463. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.06.142>
- Krishna, G., Chen, L., 2015. Comparison on batch anaerobic digestion of five different livestock manures and prediction of biochemical methane potential (BMP) using different statistical models. *WASTE Manag.* <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2015.10.021>
- Kumar, A.K., Sharma, S., 2017. Recent updates on different methods of pretreatment of lignocellulosic feedstocks: a review. *Bioresour. Bioprocess.* 4. <https://doi.org/10.1186/s40643-017-0137-9>
- Kumar, K.V., Sridevi, V., Rani, K., Sakunthala, M., Kumar, C.S., 2013. A review on production of biogas, fundamentals, applications & its recent enhancing techniques. *Elixir Int. J.* 57, 14073–14079.
- Kumar, S., Bohutskyi, P., Bouwer, E., 2013. *Advanced Biofuels and Bioproducts*, *Advanced Biofuels and Bioproducts.* <https://doi.org/10.1007/978-1-4614-3348-4>
- 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.
- 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 Biochem.* 45, 431–440.

<https://doi.org/10.1016/j.procbio.2009.11.018>

- Lettinga, G., Roersma, R., Grin, P., 1983. Anaerobic treatment of raw domestic sewage at ambient temperatures using a granular bed UASB reactor. *Biotechnol. Bioeng.* 25, 1701–1723. <https://doi.org/10.1002/bit.260250703>
- Li, C., Strömberg, S., Liu, G., Nges, I.A., Liu, J., 2017. Assessment of regional biomass as co-substrate in the anaerobic digestion of chicken manure: Impact of co-digestion with chicken processing waste, seagrass and *Miscanthus*. *Biochem. Eng. J.* 118, 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2016.11.008>
- Li, H., Xin, H., Burns, R.T., Roberts, S.A., Li, S., Kliebenstein, J., Bregendahl, K., 2012. Reducing ammonia emissions from laying-hen houses through dietary manipulation. *J. Air Waste Manag. Assoc.* 62, 160–169. <https://doi.org/10.1080/10473289.2011.638414>
- 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>
- Li, R., Duan, N., Zhang, Y., Liu, Z., Li, B., Zhang, D., Dong, T., 2017. Anaerobic co-digestion of chicken manure and microalgae *Chlorella* sp.: Methane potential, microbial diversity and synergistic impact evaluation. *Waste Manag.* 68, 120–127. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2017.06.028>
- Li, Y., Feng, L., Zhang, R., He, Y., Liu, X., Xiao, X., Ma, X., Chen, C., Liu, G., 2013a. Influence of inoculum source and pre-incubation on bio-methane potential of chicken manure and corn stover. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 171, 117–127. <https://doi.org/10.1007/s12010-013-0335-7>
- Li, Y., Zhang, R., Chen, C., Liu, G., He, Y., Liu, X., 2013b. Bioresource Technology Biogas production from co-digestion of corn stover and chicken manure under anaerobic wet , hemi-solid , and solid state conditions. *Bioresour. Technol.* 149, 406–412. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.09.091>
- Li, Y., Zhang, Y., Sun, Y., Wu, S., Kong, X., Yuan, Z., Dong, R., 2017. The performance efficiency of bioaugmentation to prevent anaerobic digestion failure from ammonia and propionate inhibition. *Bioresour. Technol.* 231, 94–100. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.01.068>
- Liang, Y., Xin, H., Li, H., Wheeler, E.F., Zajackowski, F.J., 2005. Ammonia emissions from U.S. laying hen houses in Iowa and Pennsylvania. *Trans. ASAE* 48, 1927–1941. <https://doi.org/10.13031/2013.20002>

- Liangwei, D., 2018. Introduction to large or medium sized biogas plants, in: Training Course on Biogas Technology in the Treatment and Utilization of Agricultural Waste for Developing Countries. (BIOMA), Biogas Institute of Ministry of Agriculture and Rural, Chengdu, China, pp. 100–146.
- Lin, L., Yan, R., Liu, Y., Jiang, W., 2010. In-depth investigation of enzymatic hydrolysis of biomass wastes based on three major components: Cellulose, hemicellulose and lignin. *Bioresour. Technol.* 101, 8217–8223. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.05.084>
- 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.
- Liu, G., Zhang, R., El-Mashad, H.M., Dong, R., 2009. Effect of feed to inoculum ratios on biogas yields of food and green wastes. *Bioresour. Technol.* 100, 5103–5108. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.03.081>
- Lu, X., Zhen, G., Ni, J., Hojo, T., Kubota, K., Li, Y.-Y., 2016. Effect of influent COD/SO₄²⁻ ratios on biodegradation behaviors of starch wastewater in an upflow anaerobic sludge blanket (UASB) reactor. *Bioresour. Technol.* 214, 175–183.
- Lukehurst, C., Frost, P., Seadi, T. Al, 2010. Utilisation of digestate from biogas plants as biofertiliser. *IEA Bioenergy* 1–36.
- Ma, J., Frear, C., Wang, Z.W., Yu, L., Zhao, Q., Li, X., Chen, S., 2013. A simple methodology for rate-limiting step determination for anaerobic digestion of complex substrates and effect of microbial community ratio. *Bioresour. Technol.* 134, 391–395. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.02.014>
- Maisonnave, R., Lamelas, K., Mair, G., 2015. Buenas Prácticas de Manejo y Utilización de Cama de Pollo y Guano. *Secr. Agric. Ganad. y Pesca. Minist. agroindustria. Pres. la nación.* 43.
- Maltais-Landry, G., Neufeld, K., Poon, D., Grant, N., Nesic, Z., Smukler, S., 2018. Protection from wintertime rainfall reduces nutrient losses and greenhouse gas emissions during the decomposition of poultry and horse manure-based amendments. *J. Air Waste Manag. Assoc.* 68, 377–388. <https://doi.org/10.1080/10962247.2017.1409294>
- 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>
- Marron, N., 2015. Agronomic and environmental effects of land application of residues

- in short-rotation tree plantations: A literature review. *Biomass and Bioenergy* 81, 378–400. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2015.07.025>
- Martens, W., Böhm, R., 2009. Overview of the ability of different treatment methods for liquid and solid manure to inactivate pathogens. *Bioresour. Technol.* 100, 5374–5378. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.01.014>
- Martinez, J.L., 2009. Environmental pollution by antibiotics and by antibiotic resistance determinants. *Environ. Pollut.* 157, 2893–2902. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2009.05.051>
- Masse, D.I., Masse, L., Croteau, F., 2003. The effect of temperature fluctuations on psychrophilic anaerobic sequencing batch reactors treating swine manure. *Bioresour. Technol.* 89, 57–62.
- Mata-Alvarez, J., Dosta, J., Macé, S., Astals, S., 2011. Codigestion of solid wastes: a review of its uses and perspectives including modeling. *Crit. Rev. Biotechnol.* 31, 99–111.
- Mata-Alvarez, J., Dosta, J., Romero-Güiza, M.S., Fonoll, X., Peces, M., Astals, S., 2014. A critical review on anaerobic co-digestion achievements between 2010 and 2013. *Renew. Sustain. Energy Rev.* 36, 412–427. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2014.04.039>
- Matheri, A.N., Ndiweni, S.N., Belaid, M., Muzenda, E., Hubert, R., 2017. Optimising biogas production from anaerobic co-digestion of chicken manure and organic fraction of municipal solid waste. *Renew. Sustain. Energy Rev.* 80, 756–764. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2017.05.068>
- 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>
- Mekuria, S., Bayessa, M., 2017. Gastrointestinal helminths and their predisposing factors in different poultry management systems; Haromaya, Ethiopia. *Ethiop. Vet. J.* 21, 40–43.
- Mench, J.A., Sumner, D.A., Rosen-Molina, J.T., 2011. Sustainability of egg production in the United States-the policy and market context. *Poult. Sci.* 90, 229–240. <https://doi.org/10.3382/ps.2010-00844>
- Molaey, R., Bayrakdar, A., Sürmeli, R.Ö., Çalli, B., 2018. Anaerobic digestion of chicken manure: Mitigating process inhibition at high ammonia concentrations by selenium supplementation. *Biomass and Bioenergy* 108, 439–446.

- <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2017.10.050>
- Molinuevo-Salces, B., Gómez, X., Morán, A., García-González, M.C., 2013. Anaerobic co-digestion of livestock and vegetable processing wastes: Fibre degradation and digestate stability. *Waste Manag.* 33, 1332–1338. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2013.02.021>
- Moriarty, K., Moriarty, K., Ouwens, D., 2013. Characteristics and availability of biomass waste and residues in the Netherlands for gasification . *Biomass and Bioenergy e r g a m o n*. <https://doi.org/10.1016/S0961-9534>
- Neves, L., Oliveira, R., Alves, M.M., 2004. Influence of inoculum activity on the biomethanization of a kitchen waste under different waste/inoculum ratios. *Process Biochem.* 39, 2019–2024. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2003.10.002>
- Nie, H., Jacobi, H.F., Strach, K., Xu, C., Zhou, H., Liebetrau, J., 2015. Mono-fermentation of chicken manure: Ammonia inhibition and recirculation of the digestate. *Bioresour. Technol.* 178, 238–246. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.09.029>
- Nielsen, H., Angelidaki, I., 2008. Strategies for optimizing recovery of the biogas process following ammonia inhibition. *Bioresour. Technol.* 99, 7995–8001.
- Nkoa, R., 2014. Agricultural benefits and environmental risks of soil fertilization with anaerobic digestates: A review. *Agron. Sustain. Dev.* 34, 473–492. <https://doi.org/10.1007/s13593-013-0196-z>
- Nurandani, H., Sudarno, U., Angelica, O., Katrin, S., Junaidi, J., 2018. Effect of COD/SO₄²⁻ Supply ratio variations of sulfate. Reducing Bacteria of sulphood raise in acid mine drainage. *E3S Web Conf.* 73, 05009. <https://doi.org/10.1051/e3sconf/20187305009>
- Ogunwande, G.A., Osunade, J.A., 2011. Passive aeration composting of chicken litter: Effects of aeration pipe orientation and perforation size on losses of compost elements. *J. Environ. Manage.* 92, 85–91. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2010.08.026>
- Ogunwande, G.A., Osunade, J.A., Adekalu, K.O., Ogunjimi, L.A.O., 2008. Nitrogen loss in chicken litter compost as affected by carbon to nitrogen ratio and turning frequency. *Bioresour. Technol.* 99, 7495–7503. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2008.02.020>
- Owen, W.F., Stuckey, D.C., Healv, J.B., Young, L.Y., Mccagr, P.L., 1979. Bioassay for monitoring biochemical methane potential and anaerobic toxicity 13.

- Ozbayram, E.G., Arikan, O., Ince, B., Cetecioglu, Z., Aydin, S., Ince, O., 2015. Acute effects of various antibiotic combinations on acetoclastic methanogenic activity. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 22, 6230–6235. <https://doi.org/10.1007/s11356-014-3841-4>
- Parra-Orobio, B.A., Donoso-Bravo, A., Ruiz-Sánchez, J.C., Valencia-Molina, K.J., Torres-Lozada, P., 2018. Effect of inoculum on the anaerobic digestion of food waste accounting for the concentration of trace elements. *Waste Manag.* 71, 342–349.
- PAS 110, 2010. 110: 2010 specification for whole digestate, separated liquor and separated fibre derived from the anaerobic digestion of source-segregated biodegradable materials. Br. Stand. Institution, London.
- Peters, J., Combs, S., Hoskins, B., Jarman, J., Kovar, J., Watson, M., Wolf, A., Wolf, N., 2003. Recommended Methods of Manure Analysis 1–58. [https://doi.org/Recommended Methods of Manure Anaysis \(A3769](https://doi.org/Recommended%20Methods%20of%20Manure%20Analysis%20(A3769))
- Prida, J., 2018. Sector de Postura de Argentina y sus Desafíos. *Revista Avinews. Marketing & Economía* [WWW Document]. URL <https://avicultura.info/javier-prida-sector-de-postura-de-argentina-y-sus-desafios>. (accessed 2.2.19).
- Prida, J., 2017. Producción del huevo en Argentina. *Revista Motivar. Edición N° 172.* [WWW Document]. URL <https://www.motivar.com.ar/2017/04/es-la-proteina-mas-barata-en-todo-el-mundo>. (accessed 3.15.19).
- Programme, S.F., 2010. SEVENTH FRAMEWORK PROGRAMME THEME ENERGY.2009.3.2.2 Biowaste as feedstock for 2nd generation 1–8.
- Quan, T.H., Benjakul, S., 2019. Duck egg albumen: physicochemical and functional properties as affected by storage and processing. *J. Food Sci. Technol.* 56, 1104–1115. <https://doi.org/10.1007/s13197-019-03669-x>
- Queenan, K., Burton, C.H., Bechir, C., 1996. Development of a centrifuge-based procedure to analyse agricultural effluents for total and volatile suspended solids 57, 259–263.
- Quiroga, G., Castrillón, L., Fernández-Nava, Y., Marañón, E., 2010. Physico-chemical analysis and calorific values of poultry manure. *Waste Manag.* 30, 880–884. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2009.12.016>
- Rahman, M.A., Møller, H.B., Saha, C.K., Alam, M.M., Wahid, R., Feng, L., 2017. Optimal ratio for anaerobic co-digestion of poultry droppings and lignocellulosic-rich substrates for enhanced biogas production. *Energy Sustain. Dev.* 39, 59–66.

<https://doi.org/10.1016/j.esd.2017.04.004>

- Rajagopal, R., Massé, D.I., Singh, G., 2013. Bioresource Technology A critical review on inhibition of anaerobic digestion process by excess ammonia. *Bioresour. Technol.* 143, 632–641. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.06.030>
- 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 Biochem.* 41, 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. *Renew. Sustain. Energy Rev.* 16, 861–877. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2011.09.008>
- Raposo, F., Fernández-Cegrí, V., de la Rubia, M.A., Borja, R., Béline, F., Cavinato, C., Demirer, G., Fernández, B., Fernández-Polanco, M., Frigon, J.C., Ganesh, R., Kaparaju, P., Koubova, J., Méndez, R., Menin, G., Peene, A., Scherer, P., Torrijos, M., Uellendahl, H., Wierinck, I., de Wilde, V., 2011. Biochemical methane potential (BMP) of solid organic substrates: Evaluation of anaerobic biodegradability using data from an international interlaboratory study. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 86, 1088–1098. <https://doi.org/10.1002/jctb.2622>
- Regueiro, L., Veiga, P., Figueroa, M., Alonso-gutierrez, J., Stams, A.J.M., Lema, J.M., Carballa, M., 2012. Relationship between microbial activity and microbial community structure in six full-scale anaerobic digesters. *Microbiol. Res.* 167, 581–589. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2012.06.002>
- Ren, Y., Yu, M., Wu, C., Wang, Q., Gao, M., Huang, Q., Liu, Y., 2018. A comprehensive review on food waste anaerobic digestion: Research updates and tendencies. *Bioresour. Technol.* 247, 1069–1076. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.09.109>
- Res. 19/19, 2019. Norma técnica para la aplicación agrícola de digerido proveniente de plantas de digestión anaeróbica. Secretaría de Gobierno de Ambiente y Desarrollo Sustentable, Argentina.
- Ripley, A.L.E., Boyle, W.C., Converse, J.C., 2012. alkalimetric Improved for anaerobic digestion wastes monitoring of. *Water Pollut. Contron Fed.* 58, 406–411. <https://doi.org/10.2307/25042933>
- Rizzo, P.F., Torre, V. Della, Riera, N.I., Crespo, D., Barrena, R., Sánchez, A., 2013. Co-composting of poultry manure with other agricultural wastes: process performance

- and compost horticultural use. *J. Mater. Cycles Waste Manag.* 17, 42–50. <https://doi.org/10.1007/s10163-013-0221-y>
- Roberts, F.H.S., O'sullivan, P.J., 1950. Methods for egg counts and larval cultures for strongyles infesting the gastro-intestinal tract of cattle. *Aust. J. Agric. Res.* 1, 99–102.
- Rocha, M.A.G. da, Florencio, L., Kato, M.T., Silva, A.M.R.B. da, 2001. Avaliação E Comparação Entre a Atividade Metanogênica Específica De Lodos De Esgotos Doméstico E Industriaria. 21º Congr. Bras. Eng. Sanitária e Ambient. II-115 1–8. <https://doi.org/10.1109/ICEPT.2011.6067037>
- Rodríguez, F., Godano, E., Bueno, D., 2016. América del Sur y producción de huevo: Argentina, Bolivia, Brasil y Chile (Parte 1). *CAPIA Inf.* N° 276. 26–35.
- Rosemarie, D., Albertson, O.E., 1961. Volatile Acids By Direct Titration. *Water Pollut. Control Fed.* 33, 356–365. <https://doi.org/10.2307/25034391>
- Rozzi, A., Remigi, E., 2004. Methods of assessing microbial activity and inhibition under anaerobic conditions, a literature review 93–115. <https://doi.org/10.1007/s11157-004-5762-z>
- Sadzawka, A., Carrasco, M.A, Grez, R., Mora, M., 2005. Métodos de análisis de compost Revisión 2005. Instituto Investig. Agropecu. Ser. Actas N°30, Santiago, Chile 142 p. <https://doi.org/10.1016/j.giq.2015.07.003>
- Sakar, S., Yetilmezsoy, K., Kocak, E., 2009. Anaerobic digestion technology in poultry and livestock waste treatment--a literature review. *Waste Manag. Res.* 27, 3–18. <https://doi.org/10.1177/0734242X07079060>
- Schnurer, A., Jarvis, A., 2010. Microbiological handbook for biogas plants. *Swedish Waste Manag. U* 2009, 1–74.
- Secretaria de Agroindustria, M. de P. y T., 2018. Guano de gallina. Valor agronómico. SENASA, 2019. Cadena Animal. Industria [WWW Document]. URL <http://www.senasa.gob.ar/cadena-animal/aves/industria>. (accessed 2.2.19).
- Sindhoj, E., Rodhe, L., 2013. Manure handling techniques on case-study farms in Baltic Sea Region 151.
- Soria, M.C., Soria, M.A., Bueno, D.J., Godano, E.I., Gómez, S.C., ViaButron, I.A., Padin, V.M., Rogé, A.D., 2017. *Salmonella* spp. contamination in commercial layer hen farms using different types of samples and detection methods. *Poult. Sci.* 96, 2820–2830. <https://doi.org/10.3382/ps/pex053>
- Souto, T.F., Aquino, S.F., Silva, S.Q., Chernicharo, C.A.L., 2010. Influence of incubation

- conditions on the specific methanogenic activity test. *Biodegradation* 21, 411–424.
<https://doi.org/10.1007/s10532-009-9311-x>
- Speece, R., 1996. *Anaerobic biotechnology for industrial wastewaters*. Nashville.
- Strauch, D., 2016. Survival of pathogenic micro-organisms and parasites in excreta, manure and sewage sludge. *Rev. Sci. Tech. l'OIE* 10, 813–846.
<https://doi.org/10.20506/rst.10.3.565>
- Strik, D.P.B.T.B., Domnanovich, A.M., Holubar, P., 2006. A pH-based control of ammonia in biogas during anaerobic digestion of artificial pig manure and maize silage. *Process Biochem.* 41, 1235–1238.
<https://doi.org/10.1016/j.procbio.2005.12.008>
- Strömberg, S., Nistor, M., Liu, J., 2014. Towards eliminating systematic errors caused by the experimental conditions in Biochemical Methane Potential (BMP) tests. *Waste Manag.* 34, 1939–1948. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2014.07.018>
- Sun, C., Cao, W., Banks, C.J., Heaven, S., Liu, R., 2016. Biogas production from undiluted chicken manure and maize silage: A study of ammonia inhibition in high solids anaerobic digestion. *Bioresour. Technol.* 218, 1215–1223.
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.07.082>
- Symsaris, E.C., Fotidis, I.A., Stasinakis, A.S., Angelidaki, I., 2015. Effects of triclosan, diclofenac, and nonylphenol on mesophilic and thermophilic methanogenic activity and on the methanogenic communities. *J. Hazard. Mater.* 291, 45–51.
<https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2015.03.002>
- 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>
- Tale, V.P., Maki, J.S., Struble, C.A., Zitomer, D.H., 2011. Methanogen community structure-activity relationship and bioaugmentation of overloaded anaerobic digesters. *Water Res.* 45, 5249–5256. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2011.07.035>
- Tchobanoglous, G., Burton, F.L., Stensel, H.D., 2003. *Wastewater engineering: treatment, disposal and reuse, International Edition*. McGrawHill. Metcalf and Eddy Inc, New York, USA.
- Terzich, M., Pope, M.J., Cherry, T.E., Hollinger, J., 2000. Survey of pathogens in poultry litter in the United States. *J. Appl. Poult. Res.* 9, 287–291.
- Thamsborg, S.M., Roepstorff, A., Larsen, M., 1999. Integrated and biological control of

- parasites in organic and conventional production systems. *Vet. Parasitol.* 84, 169–186. [https://doi.org/10.1016/S0304-4017\(99\)00035-7](https://doi.org/10.1016/S0304-4017(99)00035-7)
- Tian, H., Fotidis, I.A., Mancini, E., Angelidaki, I., 2017. Different cultivation methods to acclimatise ammonia-tolerant methanogenic consortia. *Bioresour. Technol.* 232, 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.02.034>
- Tian, H., Fotidis, I.A., Mancini, E., Treu, L., Mahdy, A., Ballesteros, M., González-Fernández, C., Angelidaki, I., 2018. Acclimation to extremely high ammonia levels in continuous biomethanation process and the associated microbial community dynamics. *Bioresour. Technol.* 247, 616–623. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.09.148>
- U.S.E.P.A., 2017. Inventory of U.S. Greenhouse Gas Emissions and Sinks 1990–2015, EPA 430-P-17-001. USEPA, Washing, DC., USA.
- USDA, USCC, 2001. Test Methods for the examination of composting and compost. Edaphos International, Department of Agriculture and Composting Council, USA.
- V.D.I., 2006. VDI 4630: Fermentation of organic materials. Characterization of the substrate, sampling, collection of material data, fermentation tests. Düsseldorf, Germany.
- Valcke, D., Verstraete, W., 2013. Practical the Acetoclastic in Method To Estimate Biomass Methanogenic Anaerobic Sludges 55, 1191–1195.
- Voća, N., Krička, T., Ćosić, T., Rupiće, V., Jukić, Ž., Kalambura, S., 2005. Digested residue as a fertilizer after the mesophilic process of anaerobic digestion. *Plant, Soil Environ.* 51, 262–266.
- Wandera, S.M., Qiao, W., Algapani, D.E., Bi, S., Yin, D., Qi, X., Liu, Y., Dach, J., Dong, R., 2018. Searching for possibilities to improve the performance of full scale agricultural biogas plants. *Renew. energy* 116, 720–727.
- Wang, M., Sun, X., Li, P., Yin, L., Liu, D., Zhang, Y., Li, W., Zheng, G., 2014. A novel alternate feeding mode for semi-continuous anaerobic co-digestion of food waste with chicken manure. *Bioresour. Technol.* 164, 309–314.
- Wang, Q., Peng, L., Su, H., 2013. The effect of a buffer function on the semi-continuous anaerobic digestion. *Bioresour. Technol.* 139, 43–49.
- Wang, X., Lu, X., Li, F., Yang, G., 2014. Effects of temperature and Carbon-Nitrogen (C/N) ratio on the performance of anaerobic co-digestion of dairy manure, chicken manure and rice straw: Focusing on ammonia inhibition. *PLoS One* 9, 1–7. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0097265>

- Wang, X., Yang, G., Feng, Y., Ren, G., Han, X., 2012. Optimizing feeding composition and carbon–nitrogen ratios for improved methane yield during anaerobic co-digestion of dairy, chicken manure and wheat straw. *Bioresour. Technol.* 120, 78–83. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.06.058>
- Watcharasukarn, M., Kaparaju, P., Steyer, J.P., Krogfelt, K.A., Angelidaki, I., 2009. Screening *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*, and *Clostridium perfringens* as indicator organisms in evaluating pathogen-reducing capacity in biogas plants. *Microb. Ecol.* 58, 221–230. <https://doi.org/10.1007/s00248-009-9497-9>
- Weiland, P., 2010. Biogas production: Current state and perspectives. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 85, 849–860. <https://doi.org/10.1007/s00253-009-2246-7>
- Werner, J.J., Garcia, M.L., Perkins, S.D., Yarasheski, K.E., Smith, S.R., Muegge, B.D., Stadermann, F.J., DeRito, C.M., Floss, C., Madsen, E.L., 2014. Microbial community dynamics and stability during an ammonia-induced shift to syntrophic acetate oxidation. *Appl. Environ. Microbiol.* 80, 3375–3383.
- Wiedemann, S., McGahan, E., Burger, M., 2008. Layer hen manure analysis report, Australian Egg Corporation Limited. North Sydney.
- Williams, C.M., 2013. Gestión de residuos de aves de corral en los países en desarrollo. Revisión del desarrollo avícola. FAO, 48 p. F.A.O 48.
- Windhorst, H., 2018. Contours of change-global egg and poultry meat production in retrospect. *Revista zootecnica internacional*. [WWW Document]. URL <https://zootecnicainternational.com/focus-on/contours-change-global-egg-poultry-meat-production-retrospect/>. (accessed 3.15.19).
- Wu, S., Ni, P., Li, J., Sun, H., Wang, Y., Luo, H., Dach, J., Dong, R., 2016. Integrated approach to sustain biogas production in anaerobic digestion of chicken manure under recycled utilization of liquid digestate: Dynamics of ammonium accumulation and mitigation control. *Bioresour. Technol.* 205, 75–81. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.01.021>
- Xiangwen, S., Dangcong, P., Zhaohua, T., Xinghua, J., 2008. Treatment of brewery wastewater using anaerobic sequencing batch reactor (ASBR) 99, 3182–3186. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2007.05.050>
- Yadvika, Yadav, A.K., Sreekrishnan, T.R., Satya, S., Kohli, S., 2006. A modified method for estimation of chemical oxygen demand for samples having high suspended solids. *Bioresour. Technol.* 97, 721–726. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2005.04.013>

- Yap, S.D., Astals, S., Lu, Y., Peces, M., Jensen, P.D., Batstone, D.J., Tait, S., 2018. Humic acid inhibition of hydrolysis and methanogenesis with different anaerobic inocula 80, 130–136. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2018.09.001>
- Yenigün, O., Demirel, B., 2013. Ammonia inhibition in anaerobic digestion: A review. *Process Biochem.* 48, 901–911. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2013.04.012>
- Yoon, Y.M., Kim, S.H., Shin, K.S., Kim, C.H., 2014. Effects of substrate to inoculum ratio on the biochemical methane potential of piggery slaughterhouse wastes. *Asian-Australasian J. Anim. Sci.* 27, 600–607. <https://doi.org/10.5713/ajas.2013.13537>
- Yuan, H., Zhu, N., 2016. Progress in inhibition mechanisms and process control of intermediates and by-products in sewage sludge anaerobic digestion. *Renew. Sustain. Energy Rev.* 58, 429–438. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2015.12.261>
- Zhang, B., Chen, Z.M., Qiao, H., Chen, B., Hayat, T., Alsaedi, A., 2015. Ecological informatics China's non-CO₂ greenhouse gas emissions: Inventory and input – output analysis. *Ecol. Inform.* 26, 101–110. <https://doi.org/10.1016/j.ecoinf.2014.01.009>
- Zhang, C., Su, H., Baeyens, J., Tan, T., 2014. Reviewing the anaerobic digestion of food waste for biogas production. *Renew. Sustain. Energy Rev.* 38, 383–392. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2014.05.038>
- Zhang, C., Su, H., Tan, T., 2013. Batch and semi-continuous anaerobic digestion of food waste in a dual solid–liquid system. *Bioresour. Technol.* 145, 10–16.
- Zhao, Y., Shepherd, T.A., Swanson, J.C., Mench, J.A., Karcher, D.M., Xin, H., 2014. Comparative evaluation of three egg production systems: Housing characteristics and management practices 475–484.
- Zhou, D.-M., Hao, X.-Z., Wang, Y.-J., Dong, Y.-H., Cang, L., 2004. Copper and Zn uptake by radish and pakchoi as affected by application of livestock and poultry manures. *Chemosphere* 59, 167–175. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2004.11.008>

10. Anexos

10.1. Anexo 1: Abreviaturas

% R= porcentaje de remoción

AGV/AT= relación entre los ácidos grasos volátiles y la alcalinidad total

AGV= ácidos grasos volátiles

Alfa= relación entre la alcalinidad parcial y la total (AP/AT)

AME= actividad metanogénica específica

AP= alcalinidad parcial

AT= alcalinidad total

CE= conductividad eléctrica

DA= digestión anaeróbica

DQOs= demanda química de oxígeno soluble

DQOt= demanda química de oxígeno total

FV= residuos de frutas y verduras

G= guano

G1= lodo de guano 1

G2= lodo de guano 2

G-FV= mezcla de guano con residuos de frutas y verduras

GFV25= guano co-digerido con 25% de residuos de frutas y verduras

GFV50= guano co-digerido con 50% de residuos de frutas y verduras

GV25= guano co-digerido con 25% de estiércol vacuno

GV50= guano co-digerido con 50% de estiércol vacuno

I= inóculo sin adaptación

IA= inóculo aclimatado al sustrato

IB= índice de biodegradabilidad

IC= internal recirculation

IL= lodo de una laguna para el tratamiento de la industria láctea

NAL= nitrógeno amoniacal libre

NAT= nitrógeno amoniacal total

NTK= nitrógeno total kjeldhal

PBE= producción de biogás específica

PBM= potencial bioquímico metanogénico

PC1, PC2, PC3= lodos de diferentes reactores de la producción cervecera

PF= lodo de efluente porcino y forraje

PME= producción de metano específica

RC= lodo de residuos cítricos

SA= Sistema automatizado de manejo de la producción avícola

SC= sistema convencional de manejo de la producción avícola

SST= sólidos suspendidos totales

SSV= sólidos suspendidos volátiles

ST= sólidos totales

SV= sólidos volátiles

TOC= total organic carbon

TRH= tiempo de retención hidráulico

UASB= upflow anaerobic sludge blanket

VCO= velocidad de carga orgánica

10.2. Anexo 2: Publicaciones

Publicaciones derivadas de la tesis

Bres P, Beily M.E; Butti M.; Young B.; Gasulla J.; Crespo D.; Candal R., Dimitrios Komilis. (2018). Performance of semi-continuous anaerobic co-digestion of poultry manure with fruit and vegetable waste and analysis of digestate quality: A bench scale study. *Waste Management* 82, 276–284.

P. Bres; M. E. Beily; S. Costa; J. L. Avila; R. Candal and D. Crespo. (2017). Chapter 1.11. Ensayo de Actividad Metanogénica Específica: una herramienta clave para evaluar la eficiencia en reactores anaeróbicos. In: Candal, R.; Curutchet, G.; Domínguez-Montero, L.; Macarie, H.; Poggi-Varaldo, H.; Vázquez, S. and Sastre, I. (Editors): *Environmental Biotechnology and Engineering. ISEBE Advances 2016*, pages 91-100. Ed. Cinvestav, Mexico City, Mexico.

Publicaciones y artículos de divulgación en temas relacionados

Mortola N., Romaniuk R., Cosentino V., Eiza M., Carfagno P., Rizzo P., **Bres P.**, Riera N., Roba M., Butti M., Sainz D., Brutti L. (2019). Potential use of a poultry manure digestate as a biofertiliser: Evaluation of soil properties and *Lactuca sativa* growth. *Pedosphere*, 29, 1, 60-69.

Bres, P. Biogás: avanza la normativa que regula el uso y venta del digerido. *Clarín Rural*. 14-07-18.

Beily M.E., Crespo D y **Bres P.** 2016. Desperdicios no, Energía. Artículo de Divulgación. *Revista Súper Campo*. ISSN 0328-4247.

Beily M.E., **Bres P** y Vallejo J. 2015. Energía limpia, para un ambiente sano. Artículo de Divulgación. *Boletín de Noticias INTA*. 13/06/15.

Trabajos presentados a Congresos

Bres, P., Prieto, M., Young B., Rizzo, P., Karlanian, M y Crespo, D. Análisis de los productos digeridos provenientes de plantas de digestión anaeróbica

de diferentes materias primas. Simposio de residuos agropecuarios y agroindustriales del NOA. 3 al 5 de octubre de 2018.

Bres P. *, Beily M.E, Costa S., Avila J.L., Candal R., Crespo D. Specific Methanogenic Activity Test: a key tool to assess the efficiency of anaerobic reactors. The Fifth International Symposium on environmental biotechnology and engineering. UNSAM, San Martin. 25 al 29/07/2016.

P.A. Bres, M. E. Beily, M. Butti; M. Prieto, D. E. R. Candal; D. Crespo Performance evaluation of anaerobic digestion and co-digestion of solid organic wastes in semicontinuous reactors. Word Congress on Anaerobic Digestion. Viña del Mar, Chile. 14-18 de nov de 2015.

Bres, P.; Rizzo, P.; Riera, N.; Beily, M. E.; Candal, R.; Crespo, D. Nutrientes y potenciales contaminantes en el guano de aves ponedoras. II Congreso Internacional de Ciencia y Tecnología Ambiental. II Congreso Nacional de la Sociedad Argentina de Ciencia y Tecnología Ambiental. CABA, Argentina. 30/11 al 4/12/2015.

P. Rizzo, **P. Bres**, N. Riera, V. Della Torre, D. Crespo. Caracterización de guano de aves ponedoras en sistemas de producción tradicional y automático. Jornada de ciencia y tecnología Universidad de Morón. 2014.

Disertaciones, capacitación y difusión brindada

- Integrante de la comitiva para la generación de una normativa del producto digerido proveniente de la digestión anaeróbica de residuos orgánicos. Organizada por: Secretaria de Ambiente y Desarrollo Sustentable. Subsecretaria de Monitoreo y Control. Reuniones mensuales. 2016-2018.

- Disertación: “Los residuos orgánicos y su potencial energético: consideraciones para asegurar el éxito de la digestión anaeróbica”. Feria Nacional del Biogás y Energías Renovables. 3 y 4 de noviembre de 2017. Cerrito, Entre Ríos. 3/11/17.

- Disertación “Estudios de pre factibilidad, análisis de biodegradabilidad y potencial metanogénico”. Curso Introductorio en el 9º Encuentro REDBIOLAC- Biodigestores, suministro estable de energía, biofertilizantes y cuidado ambiental. 6 al 11 de noviembre de 2017. FAUBA-Bolsa de Cereales, CABA. Argentina. 6/11/17.

- Disertación: “Casos de estudio en Argentina”. Curso Introductorio en el 9° Encuentro REDBIOLAC-Biodigestores, suministro estable de energía, biofertilizantes y cuidado ambiental. 6 al 11 de noviembre de 2017. FAUBA-Bolsa de Cereales, CABA. Argentina. 6/11/17.

- Disertación “La problemática de los residuos agropecuarios y agroindustriales. Alternativas de tratamiento”. Materia: Generación de efluentes industriales, en la Maestría en Gestión Ambiental., de la Facultad de Ingeniería de la Universidad de Buenos Aires (FIUBA). Desde 2016 hasta el año actual 2019.

- Taller “Actualización en Digestión Anaeróbica”. Organizadores: Bres, P. Beily M.E. IMYZA-Castelar. 3 y 4/12/15.

- Charlas sobre la problemática de los residuos y la digestión anaeróbica como tecnología de tratamiento de residuos orgánicos, de origen agropecuario y agroindustrial. a diferentes escuelas (más de 25 escuelas, 2013-2019).

- Disertación sobre “Avances en la digestión anaeróbica de residuos orgánico”. Segunda Jornada Nacional de Residuos. INTA-Oliveros. Nov 2014.

- Asesoramiento técnico para la puesta en marcha y período de adaptación de un reactor anaeróbico para el tratamiento de la Vinaza (INTA-Famaillá, Tucumán). 2013-2014.

- Disertación sobre " Avances en la biodigestión anaeróbica de residuos orgánicos" en CPIA. 15 de abril de 2014.