

UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA

LA MOLINA

FACULTAD DE CIENCIAS



**“EVALUACIÓN DEL MÉTODO DE ENSILADO DE EXCRETAS DE
CERDO EN LA GENERACIÓN DE BIOGÁS Y BIOL MEDIANTE
BIODIGESTORES”**

PRESENTADO POR:

SHIRAKAWA APAC, ALFREDO YOSHIMI

TESIS PARA OPTAR AL TÍTULO DE

INGENIERO AMBIENTAL

Lima - Perú

2016

A mis padres, Masami e Idelsa,
que me apoyaron incansablemente
para la realización de esta tesis.

Este logro es suyo.

AGRADECIMIENTOS

A mis padres por su apoyo durante mi vida universitaria y confiaron en mi para realizar la presente tesis.

A Amparo, por su apoyo y consejos en los momentos más críticos, que me animaron y fortalecieron para culminar la investigación.

A mi amigo Joel, quien en conjunto trabajamos para apoyarnos paralelamente en nuestras investigaciones.

Al ingeniero Lawrence Quipuzco, asesor de la presente tesis y docente del Departamento de Ingeniería Ambiental, Física y Meteorología, por su constante asesoría, consejos y oportunidades brindadas desde el desarrollo del proyecto.

A la ingeniera Carmen Álvarez Sacio, Jefe de la Unidad Experimental en Cerdos por brindar el permiso para el uso de las excretas. Asimismo, a los señores Joel Alvites Villar y Jaime Cancho Bautista, quienes apoyaron en el retiro de excretas de las instalaciones de la granja.

Al técnico del laboratorio de Ingeniería Ambiental, el Sr. Edgar Giraldo, quien me asesoró y apoyó en el manejo de los equipos y uso de los ambientes del laboratorio.

Al Laboratorio de Ingeniería Ambiental, como apoyo en la realización de la tesis, uso de equipos y terrenos aledaños hasta su culminación.

I. ÍNDICE

II.	RESUMEN	6
III.	INTRODUCCIÓN.....	8
IV.	REVISIÓN DE LITERATURA	10
4.1.	DIGESTIÓN ANAEROBIA.....	10
4.1.1.	ETAPAS	10
4.1.2.	BIODIGESTOR	13
4.1.3.	REGÍMENES DE ALIMENTACIÓN	13
4.1.4.	PARÁMETROS:	14
4.1.5.	PRODUCTOS FINALES	16
4.1.6.	MATERIA PRIMA PARA PRODUCIR BIOGÁS	19
4.2.	ENSILAJE	21
4.2.1.	PROCESO DEL ENSILADO	22
4.2.2.	FACTORES QUE AFECTAN EL PROCESO DE FERMENTACIÓN..	24
4.3.	BIOENSAYOS DE TOXICIDAD.....	27
4.3.1.	GERMINACIÓN DE LAS SEMILLAS	28
4.3.2.	EVALUACIÓN DE LA TOXICIDAD	28
V.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	30
5.1.	MATERIALES	30
5.2.	METODOLOGÍA	32
5.2.1.	ETAPA PREVIA	32
5.2.2.	ELABORACIÓN DE LA MEZCLA EN ENSILADO	34
5.2.3.	ETAPA LABORATORIO.....	35
5.2.4.	ETAPA PILOTO	37
5.2.5.	EVALUACIÓN DE PRODUCTOS:.....	38
VI.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	41
6.1.	ETAPA PREVIA	41
6.2.	ELABORACIÓN DE LA MEZCLA EN ENSILADO	45

6.3.	ETAPA LABORATORIO	48
6.4.	ETAPA PILOTO	51
6.5.	EVALUACIÓN DE PRODUCTOS:	53
6.5.1.	VOLUMEN DE BIOGÁS PRODUCIDO EN ETAPA PILOTO:	53
6.5.2.	COMPOSICIÓN DEL BIOGÁS PRODUCIDO EN ETAPA PILOTO. .	55
6.5.3.	ANÁLISIS DE NUTRIENTES DEL BIOL.....	57
6.5.4.	ENSAYO DE TOXICIDAD AGUDA DEL BIOL.....	60
6.5.5.	ÍNDICE DE GERMINACIÓN DE LAS SEMILLAS	62
VII.	CONCLUSIONES.....	65
VIII.	RECOMENDACIONES	66
IX.	REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	67
X.	ANEXOS.....	72

Índice de Tablas

Tabla 1: Composición del biogás	17
Tabla 2: Análisis macronutrientes del biol de diferentes insumos	18
Tabla 3: Composición y rendimiento de biogás de diferentes materias primas	19
Tabla 4: Composición química de excretas porcinas por etapa productiva	20
Tabla 5: Análisis de microorganismos en la excreta de cerdo	21
Tabla 6: Rango de concentración de metales pesados en la cerdaza.....	21
Tabla 7: Composición nutricional de la melaza en base seca.....	25
Tabla 8: Métodos empleados en el análisis de la materia orgánica.....	38
Tabla 9: Análisis de nutrientes y humedad de las materias primas	41
Tabla 10: Porcentaje en peso húmedo de la mezcla en ensilado	42
Tabla 11: Recuento de <i>Lactobacillus sp.</i> de materias primas de la mezcla en ensilado	44
Tabla 12: Estimación de la cantidad de sustrato necesario en laboratorio	46
Tabla 13: Estimación de la cantidad de sustrato necesario en etapa piloto.....	47
Tabla 14: Determinación de la cantidad de sustrato necesario en laboratorio	49
Tabla 15: Porcentaje de metano en biogás en etapa laboratorio.....	51
Tabla 16: Rendimiento de biogás en etapa laboratorio	51
Tabla 17: Rendimiento de biogás en etapa piloto.....	54
Tabla 18: Comparación de rendimientos de biogás.....	55
Tabla 19: Comparación de parámetros físicos del biol	57
Tabla 20: Comparación de macronutrientes del biol.....	58
Tabla 21: Comparación de micronutrientes del biol	59
Tabla 22: Comparación de coliformes del biol	59
Tabla 23: Germinación de semillas por dilución del biol.....	60
Tabla 24: Comparación de Índices de Germinación	64

Índice de Figuras

Figura 1: Reacciones presentes en la acetogénesis.....	12
Figura 2: Morfología de la semilla y la plántula de lechuga <i>Lactuca sativa</i>	27
Figura 3: Configuración para la determinación de la AME	34
Figura 4: Configuración modificada para la producción de metano en laboratorio	36
Figura 5: Configuración modificada para la producción de biogás en laboratorio	36
Figura 6: Comportamiento del pH en la mezcla en ensilado.....	47
Figura 7: Producción de biogás (mL) en laboratorio.....	50
Figura 8: Producción de metano (mL) laboratorio	50
Figura 9: Monitoreo de pH en la etapa piloto.....	53
Figura 10: Cantidad promedio de biogás (L) producido en piloto	54
Figura 11: Porcentaje promedio de metano en etapa piloto	56
Figura 12: Porcentaje de dióxido de carbono en etapa piloto.....	56
Figura 13: Inhibición de la radícula de cada dilución	61
Figura 14: Inhibición de la hipocótilo de cada dilución	62
Figura 15: Índice de germinación vs dilución	63

Índice de Anexos

Anexo 1. Informes de Carbono, Nitrógeno y Humedad del Laboratorio de Análisis de Suelos, Plantas, Agua y Fertilizantes.....	72
Anexo 2. Determinación de la pendiente en la Actividad Metanogénica Específica.....	74
Anexo 3. Informe de recuento de <i>Lactobacillus sp.</i>	75
Anexo 4. Monitoreo de pH en la mezcla en ensilado.....	77
Anexo 5. Volumen de metano y biogás generados en laboratorio	78
Anexo 6. Monitoreo de pH en escala piloto	81
Anexo 7. Volumen del biogás generado en escala piloto.....	82
Anexo 8. Composición del biogás en escala piloto.....	83
Anexo 9. Informe de análisis de micro y macro nutrientes del biol.....	84
Anexo 10. Informes de análisis de coliformes totales y fecales.....	85
Anexo 11. Carta control del control positivo	86
Anexo 12. Datos y cálculos de análisis de toxicidad	88
Anexo 13. Pruebas estadísticas del ensayo de toxicidad aguda	92
Anexo 14. Cálculos del índice de germinación.....	97
Anexo 15. Registro fotográfico	98

II. RESUMEN

Las excretas de cerdo, tienen nutrientes que pueden ser utilizados para la generación de energía y abonos. En la presente investigación se evaluó el tratamiento de excretas de cerdos de la granja de cerdos de la UNALM con ensilado como una opción de tratamiento previo mediante biodigestores, con concentraciones de 3, 5 y 8 por ciento en la producción de biogás y biol a escala laboratorio y piloto. En la etapa laboratorio, se comparó las concentraciones mostrando que la concentración de 3 y 8 generan menor cantidad de biogás y metano que el 5 por ciento, que presenta la mejor relación de porcentaje de metano en el biogás, con 53.83 por ciento, y rendimiento de 45.3 mL/g. En la etapa piloto, se instalaron tres biodigestores de 60 litros de capacidad, donde se generaron 1384 litros en condiciones ambientales, llegando a un promedio máximo de 45 por ciento de metano en el biogás en la semana 7, en condiciones normales. Entre los días 39 y 42 se alcanzó el rendimiento promedio de 45 mL CH₄/g. Se pudo observar que el tiempo de retención se encuentra entre los 32 y 41 días, tiempo en el cual la generación y composición del biogás es la óptima. El abono orgánico resultante, logró tener la composición necesaria para poder abonar cualquier cultivo, sin embargo, presenta cierto nivel de toxicidad debido a la naturaleza de la materia prima. Según los ensayos de toxicidad aguda e índice de germinación, se deben realizar diluciones que no superen el 10 por ciento para evitar los efectos adversos de la toxicidad, y con una dilución óptima de 1%, donde el biol sirve de aditivo al agua para suplir las necesidades nutricionales de los cultivos.

Palabras clave: biogas, biol, abono, cerdo, biodigestor, ensilaje

Abstract

Pig manure, still have nutrients that can be used for generation and making fertilizers. In this research the treatment of silage of pig manure from the UNALM pig's farm as an option pretreatment by biodigesters, with concentrations of 3, 5 and 8 percent in biogas and foliar fertilizer production was evaluated in laboratory and pilot scale. In the laboratory stage, the experiment showed evidence that the concentration of 3 and 8 percent generate less biogas and methane than the 5 percent, which has the best ratio of percentage of methane in landfill gas, with 53.83 percent, and performance 45.3 mL/g. In the pilot stage, three 60 liters biodigesters were installed, 1384 liters of biogas were generated under ambient conditions, reaching a maximum average of 45 percent methane in the biogas in seven weeks, under normal conditions. Between days 39 and 42 the average yield of 45 mL CH₄/g was reached. It was observed that the retention time is between 32 and 41 days, at which time generation and biogas composition is optimal. The resulting foliar fertilizer, have the necessary composition to impregnate any crop, however, presents some level of toxicity due to the nature of the raw material. According to tests and acute toxicity germination rate, must be made dilutions of no more than 10 percent to avoid adverse effects of toxicity, and with an optimal dilution of 1%, where the biological serves as additive to water supply the nutritional needs of crops.

Key words: biogas, manure, pig, silage, biodegester

III. INTRODUCCIÓN

Un problema importante que enfrentan las granjas porcinas es el manejo de las excretas, debido a que se producen en gran cantidad y generan problemas de almacenamiento en los corrales y demás instalaciones donde se alojan los cerdos (Ninabanda, 2012).

El problema de la disposición sanitaria de los desechos de las explotaciones porcinas es de gran magnitud. Es necesario tener en cuenta que aproximadamente dos tercios de los alimentos suministrados a los cerdos se convierten en desechos, de los cuales el 60% es concentrado que se puede aprovechar. Seguir arrojándolas sin ningún control, implica no solo un deterioro del ambiente sino una pérdida de energía y nutrientes lo cual significa pérdida de una oportunidad económica (Valencia, 2009). Las excretas porcinas pueden generar recursos muy valiosos mediante su procesamiento al reciclarse parte de la energía y de sus nutrientes, contribuyen a convertir la producción porcina en sostenible (Aldana, 2008).

La acumulación de las excretas, si no se usan procedimientos adecuados, contamina los mantos acuíferos, ríos, lagos y superficie del suelo. Aunque se han desarrollado sistemas de eliminación y tratamiento de excretas, su alto costo ha limitado su adopción por las granjas porcinas (Ninabanda, 2012). Una alternativa de bajo costo, es su reciclaje para usarlas en generación de energía como gas y generación de abono.

La biomasa tiene múltiples clasificaciones pero la que nos interesa mencionar es la biomasa residual húmeda, que en ausencia de oxígeno es descompuesta por agentes bacteriológicos generándose un gas de alto poder calorífico denominado biogás y otros residuos aprovechables como abono (Bautista, 2010).

Así tenemos como principales problemas: la excesiva cantidad de nutrientes (nitratos, zinc, fósforo, etc.) o de materia orgánica que ocasionan un desbalance en los sistemas ecológicos en el suelo y del agua, en caso de que los lixiviados alcancen el nivel freático, presencia de microorganismos patógenos, impurezas tóxicas (pesticidas), el contenido de sólidos complica los sistemas de filtración y tratamiento de aguas residuales, mal sabor y

olor del agua (la cual tiene poco oxígeno), proliferación de insectos vectores y moscas (Padilla, 2006).

Con un buen manejo o un sistema apropiado de utilización de los remanentes en una granja porcina, se busca mejorar la limpieza y sanidad de los cerdos y con ello obtener un mejor rendimiento productivo y obtener algún provecho de ellos, como para para la generación de energía (Padilla, 2006).

Si bien, el tratamiento de excretas de cerdo mediante ensilaje, se usa para aumentar los nutrimentos en la comida del ganado mediante la acción de los microorganismos benéficos propios del estiércol (Garcés *et al.*, 2012). De esta manera, podemos usar el producto como materia prima para su evaluación en la producción de biogás y biol, dado que es expuesta a reacciones de fermentación.

Esta investigación está basado en el manejo de desechos orgánicos de una granja de cerdos por dos razones, contribuir a mejorar la problemática medioambiental relacionada con el uso de energías no renovables y la otra razón es el aprovechamiento de residuos y efluentes para producir energía, transformando así un problema grave de contaminación en un recurso provechoso y limpio.

Así es como se propuso el objetivo general

- Evaluar el tratamiento de ensilado de excretas de cerdos de la granja de cerdos de la UNALM como una opción de tratamiento previo mediante biodigestores a escala laboratorio y piloto, a diferentes concentraciones de sólidos en la producción de biogás y biol.

Dentro de los ensayos de laboratorio se desarrollaron los objetivos específicos:

- Determinar el mejor porcentaje de metano en el biogás y el mejor rendimiento de biogás con 3, 5 y 8 por ciento de sólidos totales a escala laboratorio.
- Determinar la cantidad y calidad de biogás que se genera en los biodigestores a escala piloto, así como el rendimiento promedio, con la concentración de mejores resultados en la etapa previa.
- Determinar la calidad del biol, mediante análisis fisicoquímicos para constatar su carácter de abono, y evaluación de fitotoxicidad de biol mediante pruebas en el crecimiento de semillas de *Lactuca sativa*.

IV. REVISIÓN DE LITERATURA

4.1. DIGESTIÓN ANAEROBIA

La digestión anaeróbica es uno de los procesos más utilizados, para el tratamiento de purines, en el que la materia orgánica es transformada biológicamente, bajo condiciones anaeróbicas, en metano y dióxido de carbono. Además de esta corriente gaseosa, se produce también una suspensión acuosa de materiales sólidos (lodos), en los que se encuentran los componentes más difíciles de degradar, la mayor parte del nitrógeno y el fósforo y la totalidad de los elementos minerales (Pérez, 2010).

El gas producido puede ser recogido y utilizado como combustible. El fango final estabilizado, que se extrae no es putrescible y su contenido en organismos patógenos es nulo o muy bajo. Esta conversión biológica del sustrato complejo, en el que se encuentra materia orgánica en suspensión o disuelta, se realiza a través de una serie de reacciones bioquímicas que transcurren tanto consecutiva como simultáneamente. Este proceso biológico natural, es realizado por grupos o comunidades de bacterias en recipientes cerrados (Pérez, 2010).

4.1.1. ETAPAS

El proceso de producción del biogás la llevan a cabo microorganismos que coexisten en el biodigestor. Estos son bacterias hidrolíticas-acidogénicas, acetogénicas y metanogénicas (Merced, 2012). Las cuales actúan catalizando cuatro procesos consecutivos:

a) Etapa hidrolítica:

Las bacterias hidrolíticas hidrolizan los polímeros, por medio de enzimas hidrolíticas, resultando en el monómero de cada una. (Merced, 2012). Estas enzimas provienen exclusivamente de bacterias de metabolismo anaeróbico y actúan sobre los polímeros orgánicos u otros materiales complejos despolimerizándolos enzimáticamente en los correspondientes monómeros o fragmentos más sencillos (Pérez, 2010).

Los compuestos orgánicos complejos, como los lípidos, proteínas e hidratos de carbono, son despolimerizados en moléculas solubles y fácilmente degradables, como azúcares, ácidos grasos de cadena larga, aminoácidos, alcoholes, etc. (Bautista, 2010).

La etapa hidrolítica puede ser la etapa limitante de la velocidad del proceso global, sobre todo tratando residuos con alto contenido en sólidos. Incluso en casos donde las fases acidogénica o metanogénica son consideradas como pasos limitantes, la hidrólisis puede afectar el conjunto del proceso. El grado de hidrólisis y la velocidad del proceso dependen de muchos factores, entre otros del pH, de la temperatura, de la concentración de biomasa hidrolítica, del tipo de materia orgánica particulada y del tamaño de partícula. La hidrólisis de los carbohidratos toma lugar en algunas horas, para las proteínas el proceso toma algunos días y en el caso de la ligno celulosa el proceso es muy lento e incompleto (Pérez, 2010).

b) Etapa acidogénica:

Al estar en un proceso anaerobio, las bacterias hidrolíticas necesitan generar energía, que se obtiene por medio del catabolismo de la glucosa (glucólisis), el glicerol y aminoácidos. La glucosa se cataboliza produciendo una molécula de piruvato y 2 moléculas de ATP. Produciendo CO₂, H₂ y ácidos grasos volátiles, a mencionar: ácido propiónico, ácido acético y ácido butírico (Merced, 2012).

La sostenibilidad de esta etapa se basa en que la presencia de microorganismos anaeróbicos consume el oxígeno disuelto en el agua y por ende bajan el potencial redox, lo que es la base para la proliferación de más microorganismos anaeróbicos. (Pérez, 2010).

En estas dos etapas, encontramos bacterias anaerobias facultativas como las enterobacterias, bacterias aerotolerantes como las bacterias del ácido láctico y bacterias anaerobias estrictas como: *Clostridium*, *Propionibacterium*, *Selenomona* (Pérez, 2010).

c) Etapa acetogénica:

Los ácidos grasos volátiles son convertidos a acetato, CO₂ e H₂ por bacterias acetogénicas, pero principalmente por dos familias, a mencionar: bacterias acetogénicas obligadas que producen hidrógeno y bacterias homoacetogénicas, que usan el H₂ para reducir CO₂ en ácido acético (Merced, 2012). La etapa

acetogénica es muy dependiente de las concentraciones de estos productos (Bautista, 2010). En la Figura 1, se muestran las típicas reacciones presentes en esta etapa:

Acido Propiónico	$CH_3(CH_2)COOH + 2H_2O \rightarrow CH_3COOH + CO_2 + 3H_2$
Acido Butírico	$CH_3(CH_2)_2COO^- + 2H_2O \rightarrow 2CH_3COO^- + H^+ + 2H_2$
Acido Valérico	$CH_3(CH_2)_3COOH + 2H_2O \rightarrow CH_3COO^- + CH_3CH_2COOH + H^+ + 2H_2$
Acido Isovalérico	$(CH_3)_2CHCH_2COO^- + HCO_3^- + H_2O \rightarrow 3CH_3COO^- + H_2 + H^+$
Acido Caprónico	$CH_3(CH_2)_4COOH + 4H_2O \rightarrow 3CH_3COO^- + H^+ + 5H_2$
CO ₂ +H ₂	$2CO_2 + 4 H_2 \rightarrow CH_3COO^- + H^+ + 2H_2O$
Glicerina	$C_3H_8O_3 + H_2O \rightarrow CH_3COOH + 3H_2 + CO_2$
Acido Láctico	$CH_3CHOHCOO^- + 2H_2O \rightarrow CH_3COO^- + HCO_3^- + H^+ + 2H_2$
Etanol	$CH_3(CH_2)OH + H_2O \rightarrow CH_3COOH + 2H_2$

Figura 1: Reacciones presentes en la acetogénesis

FUENTE: Pérez, 2010.

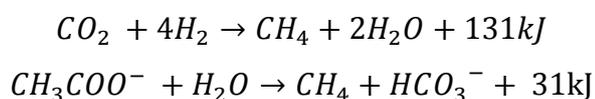
Las bacterias de esta etapa producen necesariamente hidrogeno gaseoso y están en simbiosis constante con los organismos que producen metano. Los organismos metanogénicos pueden sobrevivir solo a altos niveles de presión parcial de hidrógeno, si este nivel baja, el dióxido de carbono, hidrogeno gaseoso y acetato son producidos por bacterias acetogénicas en el caso contrario predomina la formación de ácido propiónico, butírico, valérico y etanol (Pérez, 2010).

d) Etapa metanogénica:

En esta etapa, el metano se genera por la descarboxilación del acetato y la metanización del CO₂ y H₂ por las bacterias metanogénicas (Merced, 2012).

Se distinguen dos tipos principales de microorganismos, los que degradan el ácido acético (bacterias metanogénicas acetoclásicas) y los que consumen H₂ (metanogénicas hidrogenófilas). La principal vía de formación del metano es la primera, con alrededor del 70% del metano producido, de forma general (Bautista, 2010). Los géneros de metano bacterias hidrogenofílicas más frecuentes en reactores anaerobios son: *Methanobacterium*, *Methanospirillum* y *Methanobrevibacter* (Pérez, 2010).

Según Merced (2012), las reacciones que producen el metano son a partir del anhídrido carbónico (CO₂) y acetato (CH₃COO⁻), como se muestra:



4.1.2. BIODIGESTOR

Es un ambiente cerrado herméticamente donde se lleva a cabo la fermentación anaeróbica de la materia orgánica, donde se produce el biogás y el biol. Sus componentes básicos son: área de premezclado, digestor, sistema de captación de biogás y de distribución del biol (Merced, 2012).

4.1.3. REGÍMENES DE ALIMENTACIÓN

Según Bautista (2010), en función de los flujos de entrada y salida, la operación de un biodigestor puede ser de tres modalidades:

a) Lote o discontinuo (Batch):

Se cargan de una vez en forma total, descargándose cuando han dejado de producir biogás o la biomasa está suficientemente degradada. Este sistema es aplicable en situaciones particulares, como de materia orgánica a procesar está disponible en forma intermitente. En estos casos normalmente se usa varios digestores cargados en diferentes tiempos para mantener la continuidad del suministro de gas.

b) Lote alimentado o semicontinuo (Fed-Batch):

Es el tipo de digestores más usado en el medio rural, cuando se trata de sistemas pequeños para uso doméstico. Los que más difusión tuvieron en un principio fueron el tipo Chino y el tipo Hindú. Más adelante se han desarrollado nuevas tecnologías de diversas aplicaciones.

c) Continuo

Empleadas generalmente para la obtención de volúmenes considerables de gas. La gran ventaja es que las bacterias metanogénicas reciben un suministro regular del material orgánico, con lo cual producen el biogás de forma más estable (ONUDI, 2007).

Fueron desarrollados para el tratamiento de aguas negras, extendiéndose su uso, en la actualidad, al manejo de otros sustratos. Este tipo de reactor genera una gran cantidad de biogás el que a su vez es aprovechado en aplicaciones de las grandes industrias o en la demanda de gas de una población, colocándolos dentro de la red de la ciudad.

4.1.4. PARÁMETROS

Siendo la digestión anaerobia un proceso bioquímico complejo, es necesario mantener las condiciones óptimas que permitan la realización tanto de las reacciones químicas dentro de la matriz líquida del reactor, como las reacciones bioquímicas intracelulares que dan vida a los organismos en juego.

a) Relación Carbono-Nitrógeno (C:N)

Para el proceso de biodigestión anaerobia, se deberá considerar la relación de nutrientes encontrada en el influente. Esta puede expresarse en función de la relación carbono-nitrógeno.

Cuando esta relación es alta ($C:N > 30:1$), existirá en el sistema una gran concentración de Ácidos Grasos Volátiles que inhibirán las etapas microbiológicas del sistema. En caso contrario ($C:N < 20:1$), la alta concentración de compuestos nitrogenados, también inhibirá la producción de biogás. Por ello, para este tipo de procesos, se considera una relación entre 20:1 y 30:1 (SEMARNAT, 2010).

b) Temperatura:

Aunque la gama de temperaturas dentro de las cuales se puede realizar la metanogénesis es amplia, el proceso puede tener lugar entre 5 y 65°C; sin embargo, es óptimo sólo en dos zonas de temperatura: 35°C (mesofílica) y 60 °C (termofílica) (Pascual, 2011).

La temperatura determina el tiempo de retención para la digestión y degradación de la materia orgánica dentro del digester, además se incrementa la producción de biogás. La mayoría de los biodigestores convencionales funcionan en la gama mesofílica, es decir, entre 12 y 35° C, optimizándose el proceso entre los 29 y 33°C. Aunque la digestión anaerobia puede ocurrir en la gama termofílica de entre 37-65 °C, con un óptimo en las proximidades de los 55°C, de tal manera que la digestión termofílica permite una permanencia menor en los tanques, pero, debido a su excepcional sensibilidad a los cambios de temperatura, exige un gran control y no es aconsejable (Bautista, 2010).

c) Valor de pH:

El pH representa el grado de acidez presente en el biodigestor, su valor óptimo oscila entre 6,6 y 7,6 cuyo rango es el adecuado para que el reactor opere correctamente, valores de pH por debajo de 5 y por encima de 8 se corre el riesgo de inhibir el proceso de fermentación o incluso detenerlo.

Los organismos que en cada fase son diferentes, y debe establecerse un equilibrio entre la producción de ácidos y su regresión, para que ambos tipos de organismos puedan coexistir dentro del digestor y encuentren las posibilidades ambientales para su desarrollo (Bautista, 2010).

Según Pérez (2010), dependiendo del tipo de bacterias, debe cuidar el valor del pH desde 5.2 hasta 7.5. El pH normalmente se encuentra entre 6-8, con un valor próximo a 7 para la actividad óptima. Los ácidos grasos disminuyen la alcalinidad a menos que la alcalinidad bicarbonatada sea suficiente para neutralizar dichos ácidos. El bicarbonato se forma a partir de dióxido de carbono, iones bicarbonato (HCO_3^-), es importante que haya suficiente alcalinidad todo el tiempo, para mantener una amortiguación suficiente.

En general, los biodigestores que funcionan con excrementos animales, no presentan problemas de pH; en cambio muchos desechos vegetales pueden ocasionar bajas drásticas de los valores óptimos de pH (Pascual, 2011).

d) El factor de mezclado:

Las instalaciones de digestión convencionales consisten exclusivamente en un depósito de fangos cerrado a la atmósfera. En él se produce una estratificación que de abajo hacia arriba se puede interpretar de la siguiente manera: fango digerido, fango de digestión, sobrenadante, capa de espumas y gases de digestión.

Al desarrollarse el proceso y llegar a la denominada digestión de alta carga, se estableció que era fundamental que el contenido del digestor fuera mezclado completamente de una forma más o menos continua. Con ello, se conseguía reducir sustancialmente el tiempo de digestión (Bautista, 2010).

e) Ácidos volátiles:

Los ácidos acético, propiónico y butírico son precursores del metano dentro del biodigestor, mediante la conversión directa del acetato o mediante los pasos intermedios de formación de Hidrógeno y dióxido de Carbono (Pascual, 2011).

La concentración de estos ácidos volátiles, producto de fermentación, tiene una gran importancia en el proceso de la digestión, pues puede llegar a acidificar el fango provocando el fallo del proceso. El aumento de la concentración de ácidos volátiles puede venir producido por sobrecarga de alimentación, o por una inhibición de las bacterias metanogénicas. A su vez, una gran concentración puede provocar la rotura de la capacidad tampón del fango, disminución del pH y, en consecuencia, inhibición de las bacterias formadoras de metano (Bautista, 2010).

f) Agentes promotores e inhibidores de la fermentación:

Los agentes promotores son materiales que fomentan la degradación de la materia orgánica y aumentar la producción de biogás, entre ellos existen enzimas, sales inorgánicas, se puede emplear urea para acelerar la producción de metano y la degradación del material, carbonato de calcio para la generación de gas y para aumentar el contenido de metano en el gas, mediante estabilización de pH.

Concentraciones elevadas de amoníaco y nitrógeno, sales minerales como los iones metálicos y algunas sustancias orgánicas como detergentes, desinfectantes y químicos agrícolas, que aparte del oxígeno, inhiben la digestión por que destruyen las bacterias metanogénicas (Bautista, 2010).

4.1.5. PRODUCTOS FINALES

El biogás y el biol son los principales productos de la digestión anaeróbica.

a) Producción de biogás:

El denominado biogás es una mezcla gaseosa que se obtiene de la descomposición de la materia orgánica en condiciones anaeróbicas y cuyos principales componentes son el metano y el anhídrido carbónico. En menor proporción, nitrógeno, hidrógeno, oxígeno y trazas de sulfuro de hidrógeno (Bautista, 2010). Su composición es como se muestra en la Tabla 1.

Tabla 1: Composición del biogás

Componente	Porcentaje (%)
Metano (CH ₄)	50 a 80
Anhidro carbónico (CO ₂)	20 a 50
Nitrógeno (N ₂)	< 1
Hidrógeno (H ₂)	< 1
Amoníaco (NH ₃)	< 1
Sulfuro de hidrógeno (H ₂ S)	< 1

FUENTE: (Merced, 2012).

El biogás del digester (debido al CH₄) posee un poder calorífico aproximado de 4,500 a 5,600 Kcal/m³. El poder calorífico del biogás está determinado por la concentración de metano, pudiéndose aumentar eliminando todo o parte del CO₂ presente en el biogás. La producción total de gas depende fundamentalmente del sustrato consumido por las bacterias (Bautista, 2010).

El biogás producido se puede utilizar en forma: calor, motores de ignición de gas, electricidad, turbinas de gas y combustible de un automóvil. Para el 2020, se predice que el mayor volumen de producción de biogás será a partir de granjas y de los sistemas de co-generación, entre el sector agrícola y el procesamiento de alimentos (Merced, 2012).

b) Biol:

La fermentación anaerobia de la materia orgánica produce una fracción líquida resultante del fango proveniente del biodigester con excelentes propiedades físicas, ricos en nitrógeno, fósforo y potasio, además de generar gas combustible (Bautista, 2010). Este “fango” es decantado o sedimentado obteniéndose una parte líquida a la cual se le llama “biol”. Aproximadamente, el 90% del material que ingresa al biodigester se transforma a Biol. Esto depende naturalmente del tipo de material a fermentar y de las condiciones de fermentación (Aparcana, 2008).

El uso del biol se da como una enmienda orgánica, es promotor y fortalecedor del crecimiento de la planta, raíces y frutos, gracias a la producción de hormonas vegetales, las cuales son desechos del metabolismo de las bacterias típicas de este tipo de fermentación anaeróbica, que no se presentan en el compost (Aparcana, 2008). El biol no deja residuos tóxicos en el suelo, eleva la calidad del mismo y se considera como un buen abono que puede competir o complementarse con los fertilizantes químicos (Bautista, 2010).

Los elementos esenciales para el crecimiento de las plantas provienen del aire y el suelo. Estos elementos químicos o nutrientes pueden clasificarse en: macroelementos y microelementos:

- i. Macroelementos: son necesarios en grandes cantidades, por lo que estas grandes cantidades son aportadas al suelo, cuando éste es deficiente en alguno o varios de ellos. Los principales son N, P, K, Ca, Mg, S y se expresan en porcentaje en g / 100 g.
- ii. Microelementos: son requeridos en pequeñas cantidades para el crecimiento del cultivo y son agregados en pequeñas cantidades cuando no puedan ser provistos por el propio suelo. Los principales son: Fe, Zn, Cu, Mn, Mo, B, Cl y se expresan en ppm.

En la Tabla 2, se observan la concentración de macronutrientes de diferentes fuentes e investigaciones.

Tabla 2: Análisis macronutrientes del biol de diferentes insumos

Origen	pH	N Total (mg/L)	P Total (mg/L)	K Total (mg/L)	FUENTE
Codornaza	7.15	646	173	1615	Castillo, 2012
Gallinaza	7.10	1008	309.4	2183	
Estiércol Vacuno	7.15	1194.7	335.6	1594.2	Torres, 2013
Estiércol de cuy	7.80	900	120	900	
Estiércol porcino	7.89	1876	71.2	1940	Carhuancho, 2012
La Calera	7.20	1700	3800	5200	
Fast Biol 20	3.72	4200	744.2	17200	Peralta, 2010

c) Biosol:

El biosol es el resultado de separar la parte sólida del “fango” resultante de la fermentación anaeróbica dentro del biodigestor. Dependiendo de la tecnología a emplear, este biosol tratado puede alcanzar entre 25% a sólo 10% de humedad (la humedad es principalmente biol residual). Su composición depende mucho de los residuos que se emplearon para su fabricación. Se puede emplear sólo o en conjunto con compost o con fertilizantes químicos (Aparcana, 2008).

Según Meza (2014), se puede prensar para extraer todo el biol posible. Constituye una buena fuente de carbohidratos y de energía como alimento para el ganado o abono para el suelo, dependiendo de la materia prima usada en su elaboración.

En el Fundo La Calera (MIMAM, 2011), el biosol es empleado como abono para suelos agrícolas y/o como fuente de calcio y fósforo en las raciones de alimentación de las gallinas de la granja. El biol sirve también como fertilizante orgánico por lo que es inyectado al sistema de riego presurizado de los campos agrícolas.

4.1.6. MATERIA PRIMA PARA PRODUCIR BIOGÁS

Se consideran fuentes de bioenergía los cultivos energéticos, residuos post-cosecha, subproductos y desechos orgánicos; y éstos se pueden transformar en biocombustibles en estado sólido, líquido o gaseoso. Como materia prima se puede considerar la gallinaza, el estiércol de vaca y de cerdo; aunque hoy en día se le puede adicionar substratos como: desechos vegetales, sub-productos de animales, ensilaje de maíz y de pasto (Merced, 2012). En la Tabla 3 se muestra la composición y rendimiento de biogás de algunas materias primas.

Tabla 3: Composición y rendimiento de biogás de diferentes materias primas

Materia Prima	Materia Seca (%)	Materia Orgánica (% MS)	Rendimiento de Biogás (m ³ /Ton MOS)	Rendimiento Biogás (m ³ /Ton Húmeda)
Cultivos energéticos (c)	-	-	550 a 750	-
Desechos agroindustriales(b)	-	-	400 a 800	-
Estiércol de vaca	7 a 15	65 a 85	200 a 400	9 a 51
Estiércol de puerco	3 a 13	65 a 85	350 a 550	7 a 61
Fracción orgánica de los RSM's	-	-	400 a 600	-
Gallinaza	10 a 20	70 a 80	350 a 550	24 a 88
Lodos de las aguas residuales	-	-	250 a 350	
Residuos de cultivos	-	-	300 a 400	-
RRSS de industria de carne	-	-	550 a 1,110	-
Desechos vegetales (a)	10 a 20	65 a 85	400 a 700	25 a 120
Ensilaje de maíz (a)	15 a 40	75 a 95	500 a 900	55 a 340
Ensilaje de pasto (a)	8 a 50	70 a 90	600 a 1,300	30 a 585

(a) Puede variar de acuerdo al lugar, tratamiento, proceso y almacenaje

(b) Como aguas residuales de la industria láctea y de la molienda de los aceites, residuos de la cerveza y de destilerías

(c) Como maíz, sorgo, etc.

FUENTE: Adaptada de Merced, 2012.

a) Excretas de cerdo

Las excretas de cerdo o cerdaza son una mezcla de material fecal y alimento rechazado, contiene además orina, material piloso y de descamación dependiendo del contenido y de la digestibilidad del alimento proporcionado (Ninabanda, 2012).

Según Castrillón (2012), existen diferencias en la composición de la cerdaza según la etapa productiva y el método de recolección y procesamiento, como es mostrado en la Tabla 4. La cerdaza proveniente de animales de pesos inferiores (inicio, desarrollo y engorde) presentan un mayor contenido de proteína cruda, extracto etéreo, carbohidratos no estructurales (CNE) y energía y un menor contenido de cenizas, calcio, fósforo, fibras neutro detergentes (FND) y fibras ácido detergentes (FAD) que la cerdaza de los animales reproductores (gestantes y lactantes) como consecuencia de diferencias en la composición de la dietas y a una menor utilización de los nutrimentos de la dieta por parte de los cerdos jóvenes. Los mayores valores de FND y FAD observados en la cerdaza de gestación son debidas a un incremento en el nivel de fibra en la dieta de estos animales.

Tabla 4: Composición química de excretas porcinas por etapa productiva

Composición		Inicio	Desarrollo	Engorde	Gestante	Lactante
Humedad	%	80.51	78.67	78.55	80.73	72.52
Proteína cruda	%	26.92	26.27	23.38	16.49	15.8
Extracto etéreo	%	7.1	9.83	6.47	3.85	8.64
Cenizas	%	14.28	15.97	16.44	20.34	20.08
FND	%	28.42	30.89	37.04	40.2	30.65
FAD	%	7.96	9.81	11.35	15.54	11.79
CNE	%	23.26	17.02	18.24	19.11	16.22
Calcio	%	2.51	3.36	2.96	3.93	5.01
Fósforo	%	0.19	0.21	0.22	0.29	0.27
Cobre	ppm	1160.5	445.04	427.64	725.3	920.6

FND: fibras neutro detergentes, FAD: fibras ácido detergentes, CNE: carbohidratos no estructurales
FUENTE: Castrillón *et al.*, 2012

Rojas (1996) realizo el análisis microbiológico de la cerdaza con el propósito de conocer el contenido de microorganismos presentes en el material de investigación, con resultados en la Tabla 5:

Tabla 5: Análisis de microorganismos en la excreta de cerdo

Microorganismos	Unidad	Cantidad
Bacterias mesófilas aerobias	UFC/g mtra	10 x 10 ⁷
Coliformes totales	NMP/100 g	1100
<i>E. coli</i>	NMP/100g	3
<i>Lactobacillus sp.</i>	UFC/g mtra	40 x 10 ⁴
Mohos	UFC/g mtra	15 x 10 ⁶
Levaduras	UFC/g mtra	13 x 10 ⁷

FUENTE: Rojas, 1996

Según Coma y Bonet (2004), la cerdaza contiene metales pesados que afectaran como contaminación si no se trata de manera adecuada, de la misma manera afectará al biol resultante. Los rangos de concentración de metales se muestran en la Tabla 6:

Tabla 6: Rango de concentración de metales pesados en la cerdaza

Metales Pesados	mg/kg MS
Cobre	250 - 759
Zinc	691 - 1187
Cadmio	0.5 - 1.8
Cromo	2.2 - 14.0
Níquel	11.0 - 32.5
Plomo	7.0 - 18.0

FUENTE: Coma y Bonet, 2004

4.2. ENSILAJE

El ensilaje es una técnica usada para la preservación de forraje que se logra por medio de una fermentación láctica bajo condiciones anaeróbicas. Las bacterias de ácido láctico fermentan carbohidratos hidrosolubles produciendo ácido láctico y en menor cantidad, ácido acético. Al generarse estos ácidos, el pH del material ensilado baja a un nivel que inhibe la presencia de microorganismos que inducen la putrefacción (Oude et al., 2001).

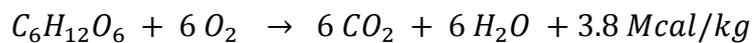
Basándose en las mismas técnicas de ensilaje, este proceso ha sido utilizado para reciclar excreta animales y ha demostrado ser un método efectivo para el control biológico de microorganismos indeseables. Diversos estudios han demostrado que el pH ácido generado por los procesos de ensilaje elimina *Salmonella*, huevos de nematodos y larvas, coliformes totales, y fecales (Iñiguez y Varela, 1999). La falta de oxígeno evita el crecimiento de los mohos y levaduras y el pH bajo evita el crecimiento de la mayoría de las bacterias después de que ha terminado la fermentación, así, el ensilado puede conservarse por periodos prolongados si prevalecen estas condiciones (Alaniz, 2008).

4.2.1. PROCESO DEL ENSILADO

Según Oude (2001) y Wattiaux (2000), el proceso deseado que tiene lugar en el silo, puede ser descrito en una secuencia de cuatro etapas:

a) Fase 1 - Respiración

En esta fase -que dura sólo pocas horas- el oxígeno atmosférico presente en la masa vegetal disminuye rápidamente debido a la respiración de los microorganismos aeróbicos y aeróbicos facultativos como las levaduras y las enterobacterias. Las células pierden su estructura y continúan consumiendo oxígeno de acuerdo a la siguiente ecuación:



Esta ecuación indica que la respiración convierte el azúcar en dióxido de carbono, agua y calor. Por lo tanto, la respiración resulta en una pérdida de materia seca y energía disponible. Sumado a ello, el calor liberado por respiración aumenta la temperatura del forraje. La rápida expulsión de oxígeno es deseable por que disminuye tanto el largo de la fase de respiración como las pérdidas asociadas de nutrientes (Wattiaux, 2000).

Normalmente, la respiración continúa por uno o dos días mientras haya oxígeno en el ensilaje. Por lo tanto, compactar el ensilaje para remover el aire lo más rápidamente posible restringirá las pérdidas por respiración.

b) Fase 2 – Fermentación enterobacteriana

A medida que el oxígeno es consumida y la fermentación comienza, las bacterias que se vuelven predominante son las anaeróbicas facultativas, que convierten azúcares en una variedad de ácidos orgánicos (ácido fórmico, ácido acético, ácido láctico y algunas veces ácido butírico), dióxido de carbono e hidrógeno (H₂). Estos ácidos son responsables por la disminución temprana del pH. A medida que la fermentación prosigue, las enterobacterias se vuelven menos competitivas por ser particularmente sensitiva a la disminución de pH. El crecimiento de bacterias es inhibida cuando el pH cae por debajo de 4.5, lo cual usualmente ocurre a los pocos días de ensilaje. Sin embargo, las enterobacterias tienden a persistir por largos períodos en el ensilaje, por el cual el pH desciende lentamente en el caso del ensilaje seco. Por lo tanto, la disminución de oxígeno

en el ensilaje, resulta en una “selección natural” y una disminución en las bacterias que necesitan oxígeno para su crecimiento.

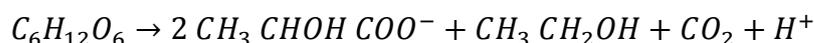
c) Fase 3 - Fermentación de bacteria ácido lácticas

Las bacteria ácido-lácticas, que son aerotolerantes, comienzan a dominar el proceso de fermentación, después de que el pH del ensilaje cae a 5.5 - 5.7. La reacción de la fermentación homoláctica es simple, una molécula de azúcar es convertida en dos moléculas de ácido láctico:



Es un proceso de fermentación presente en muchas bacterias del grupo láctico: *Streptococcus* (grupo de enterococos), *Pediococcus* y varios grupos de *Lactobacillus*.

Algunas especies de bacteria ácido-lácticas producen solo ácido láctico, llamadas bacteria homolácticas. Sin embargo, otras especies de bacteria ácido-lácticas, llamadas bacteria heterolácticas producen ácido láctico y otros productos terminales como etanol y dióxido de carbono.



Especies homolácticas son preferibles en el ensilaje por que producen ácido láctico que es más fuerte y reduce más que el ácido acético. Actualmente, mientras el pH cae, el ácido láctico se vuelve un producto terminal predominante en la fermentación.

d) Fase 4 – Ensilaje estable

Mientras se mantenga el ambiente sin aire, ocurren pocos cambios. La mayoría de los microorganismos de la Fase 2 lentamente reducen su presencia. Algunos microorganismos acidófilos sobreviven este período en estado inactivo; otros, como clostridios y bacilos, sobreviven como esporas (OUDE, 2001).

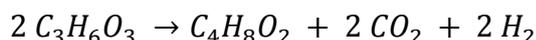
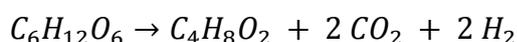
Luego de 14 días de fermentación, un ensilaje bien conservado contiene 1.5 a 2% de ácido láctico y un rango de pH de 3.5 a 4.2. La fuerte acidez creada durante la fase 3, genera una esterilización de la masa de ensilaje en el sentido de que todo crecimiento bacteriano es paralizado y eventualmente el crecimiento de las bacterias ácido-lácticas se inhibe a sí misma. Esta fase estable puede durar

meses (sino años) mientras el silo se mantenga cerrado y protegido de oxígeno (Wattiaux, 2000).

Otras dos fases indeseables pueden tener lugar y causar pérdidas importantes en materia seca y calidad forrajera en un silo:

e) Fermentación indeseable debido a Clostridios (bacteria ácido butíricas)

El hecho de que clostridia viva en ausencia de oxígeno y resiste un pH tan bajo como 4.2, les permite competir con las bacteria ácido lácticas aun después de que el pH descendió hasta 5.0. Algunas especies de clostridia fermentan azúcares y el ácido láctico ($C_3H_6O_3$) producido por las bacterias ácidolácticas en ácido butírico ($C_4H_8O_2$), CO_2 e H_2 :



La producción de dióxido de carbono e hidrógeno gaseoso indica pérdidas de energía digestible. Un ensilaje estropeado por clostridia es fácilmente reconocido debido a su fuerte olor, pH por encima de 5.0, nitrógeno amoniacal mayor a 10% del total de nitrógeno y más ácido butírico que láctico.

f) Deterioro indeseable aeróbico

El deterioro aeróbico en un silo ocurre cuando el oxígeno puede penetrar a la masa empaquetada de silo. Las pérdidas causadas por no proteger el silo del oxígeno en el momento de ensilado son debidas a la continua respiración y la fermentación bacteriana indeseable. Sin embargo, también resultar del desarrollo de otros microorganismos incluyendo hongos y levaduras.

4.2.2. FACTORES QUE AFECTAN EL PROCESO DE FERMENTACIÓN

Según Alaniz (2008), la fermentación es controlada principalmente por:

a) Contenido de carbohidratos hidrosolubles

Los microorganismos usan los carbohidratos hidrosolubles como fuente de energía para su crecimiento. El bajo contenido de carbohidratos hidrosolubles pueden limitar las condiciones de la fermentación (SAGARPA, s.f.).

Se ha demostrado que la melaza de caña de azúcar, constituye un buen aditivo nutritivo para muchos microorganismos. Es el efluente final obtenido en la

preparación del azúcar mediante cristalización repetida. Los rendimientos promedios indican que por cada tonelada de azúcar producida, se generan 310 Kg de melaza (Aldón, 2008).

Es una sustancia muy utilizada en la producción de ácido láctico, por ser un sustrato muy completo al presentar un importante contenido en sacarosa, glucosa, fructosa y nitrógeno. La melaza posee una carga de metales pesados: cadmio, plomo y cromo, que podría generar alguna influencia en las concentraciones de metales pesados encontradas en el biol (Medina, 2013).

En la Tabla 7 se encuentran parámetros físicos comunes de la melaza de caña.

Tabla 7: Composición nutricional de la melaza en base seca

Parámetros físicos	pH	5.5 - 6.5
	Materia seca	76.5%
	Humedad	23.5%
	Materia orgánica	62.5%
	Densidad	1.41 kg/L
Metales	pH	4.9 – 5.4
	Cadmio	0.06 mg/L
	Plomo	2.97 mg/L
Carbohidratos	Cromo	3.00 mg/L
	Azúcares totales	48.3 %
	Azúcares reductores	11.5 %
	Sacarosa	35.9 %
	Fructuosa	5.6 %
Minerales	Glucosa	2.6%
	Calcio	0.8%
	Fosforo	0.08%
	Potasio	4.2 ppm
	Cloro	2.1%
	Magnesio	0.27%
	Azufre	0.78%
	Sodio	0.09%
	Cobre	14 ppm
	Hierro	130 ppm
Manganeso	5 ppm	
Zinc	8ppm	

FUENTE: Medina, 2013; Aldón, 2008.

b) Contenido de humedad

El ensilado debiera tener más de 50 por ciento de humedad de modo que sea fácil de compactar firmemente y así eliminar el aire. Sin embargo, un exceso de humedad, superior a 75 por ciento es dañino ya que afecta las últimas etapas de la fermentación, produciendo un ensilaje ácido que reduce la palatabilidad y el

consumo. Para ajustar el grado de humedad se puede agregar agua o alimentos acuosos o secos, según sea necesario (Chedly y Lee, 2001).

c) La microflora del ensilaje

La microflora del ensilaje juega un papel clave para el éxito del proceso de fermentación. Según Oude, (2001), puede ser dividida en dos grupos principales:

i. Microorganismos benéficos – Bacterias de ácido láctico

Las bacterias que se asocian con el proceso de ensilaje pertenecen a los géneros: *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, *Enterococcus*, *Lactococcus* y *Streptococcus*. Son bacterias Gram+. Todos anaeróbicos facultativos, pero muestran cierta preferencia por la condición anaeróbica. Estas bacterias metabolizan los carbohidratos dando como producto final ácido láctico. El intervalo de temperatura óptimo varía de 35 a 38 °C y pH óptimo de crecimiento se sitúa entre 5.5 a 5.8. Los lactobacilos tienen unas necesidades nutritivas complejas para su crecimiento: carbohidratos, nucleótidos, aminoácidos y vitaminas (Rodríguez, 1994).

ii. Microorganismos indeseables

- **Levaduras:** fermentan azúcares bajo condiciones anaeróbicas produciendo etanol y dióxido de carbono. Bajo condiciones aeróbicas, degradan el ácido láctico en dióxido de carbono y agua. La degradación del ácido láctico eleva el valor del pH del ensilaje, lo cual a su vez permite el desarrollo de otros organismos indeseables.
- **Enterobacterias:** compiten con los benéficos por los azúcares disponibles, y porque además pueden degradar las proteínas. La degradación proteica reduce el valor nutritivo del ensilaje y permite la producción de compuestos tóxicos. No proliferan en ambientes con valores bajos de pH.
- **Clostridios:** fermentar tanto carbohidratos como proteínas, por lo cual disminuyen el valor nutritivo del ensilaje y crean problemas al producir aminas biogénicas. Puede fermentar carbohidratos y degrada el ácido láctico en ácido butírico, hidrogeno gaseoso y dióxido de carbono.
- **Bacterias productoras de ácido acético:** su actividad en el ensilaje es pernicioso porque puede iniciar una deterioración aeróbica, ya que puede oxidar el lactato y el acetato produciendo dióxido de carbono y agua.

- **Bacilos:** Algunos *Bacillus sp.* son capaces de producir sustancias fungicidas, y se los ha usado para inhibir el proceso de deterioro aeróbico en ensilajes. Con la excepción de estas estirpes, el desarrollo de los bacilos en el ensilaje es en general considerado como indeseable. Esto se debe a que los bacilos producen menos ácido láctico y acético, comparado con los benéficos, y en las etapas finales, incrementan la deterioración aeróbica.
- **Mohos:** se desarrollan en cualquier sitio desde el ensilaje donde encuentren oxígeno, inclusive solo trazas. Es fácil identificar un ensilaje infestado por mohos debido a los filamentos de diversos colores y de gran tamaño que producen muchas especies.

4.3. BIOENSAYOS DE TOXICIDAD

En el bioensayo de toxicidad con semillas de lechuga (*Lactuca sativa*) se pueden evaluar los efectos fitotóxicos de compuestos en el proceso de germinación de las semillas y en el desarrollo de las plántulas durante los primeros días de crecimiento.

Para la evaluación de los efectos fitotóxicos, se determina la inhibición en la germinación y la inhibición en la elongación de la radícula y del hipocótilo (Figura 2). Durante el período de germinación y los primeros días de desarrollo de la plántula, ocurren numerosos procesos fisiológicos en los que la presencia de una sustancia tóxica puede interferir alterando la supervivencia y su desarrollo normal, siendo por lo tanto una etapa de gran sensibilidad frente a factores externos adversos (Sobrero y Ronco, 2004).

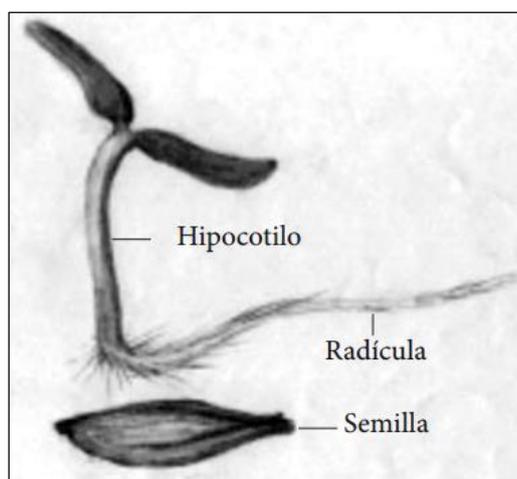


Figura 2: Morfología de la semilla y la plántula de lechuga *Lactuca sativa*
FUENTE: (Sobrero y Ronco, 2004)

4.3.1. GERMINACIÓN DE LAS SEMILLAS

La germinación incluye aquellos eventos que comienzan con la inhibición de las semillas en agua por parte de la semilla seca y quiescente y termina con el comienzo de la elongación del eje embrionario, usualmente la radícula. Los eventos posteriores como la movilización de las reservas se asocian con el crecimiento de la plántula como: cambios estructurales subcelulares, hidratación proteínica, respiración, síntesis macromolecular, etc. Los componentes del proceso de germinación pueden aparecer en la semilla sin haber emergido la radícula, eso se expresa como dormancia.

Para que se inicie se necesitan tres condiciones: (1) la semilla debe estar viable, esto es que el embrión este vivo y tenga la capacidad de germinar; (2) la semilla debe estar expuesta a condiciones ambientales adecuadas de temperatura humedad, oxígeno y, en algunos casos, luz y (3) que cualquier condición de dormancia primaria debe ser superada. Los procesos internos que permiten retirar la dormancia se conocen como procesos de post-maduración y resultan en la interacción del medio ambiente con la condición específica de la dormancia primaria. En algunas ocasiones, las semillas no salen de esta primera dormancia, desencadenando procesos alternos pasando a una dormancia secundaria, como la lechuga que presenta dormancia e la oscuridad.

La germinación puede ser definida como una serie de acontecimientos fisiológicos, metabólicos y morfo-genéticos que sufren las semillas no latentes y que tienen como resultado la transformación de un embrión en una plántula que sea capaz de valerse por sí sola y transformarse en una planta adulta. Algunas semillas comienzan estos cambios por la radícula (germinación hipogea), esta emerge de la ruptura de la testa, en otras semillas el crecimiento comienza por el hipocótilo (germinación epigea). Las semillas de diferentes especies pueden diferenciarse en su germinación, respecto a la superficie del sustrato; en plántulas epigeas los cotiledones emergen del suelo como consecuencia de un considerable crecimiento del hipocótilo formando clorofila y se convierten en órganos fotosintéticos como en la lechuga (Alvarado, 2004).

4.3.2. EVALUACIÓN DE LA TOXICIDAD

La toxicidad se evalúa mediante bioensayos que consisten en exponer organismos vivos a sustancias tóxicas a diferentes concentraciones y registrar los efectos sobre los mismos (IMP, 2006). Se determina para cada concentración el número de organismos afectados, dato con el que se pueden establecer varios parámetros:

- CL50 (Concentración letal media): Concentración de tóxico que mata 50% de los organismos ensayados.
- CE50 (concentración efectiva media). Concentración de tóxico que produce 50% del efecto tomado como indicador de toxicidad.
- Concentración inhibitoria. Concentración de tóxico que inhibe un proceso biológico, tal como la reproducción en un determinado porcentaje.
- NOEC (No Observed Effect Concentration, concentración a la que ningún efecto es observado): Máxima concentración de tóxico para la cual no se observan efectos sobre los organismos ensayados.
- LOEC (Low Observed Effect Concentration, concentración más baja en la que un efecto es observado): Mínima concentración de tóxico en la cual se observan efectos sobre los organismos.

Para todos los parámetros definidos anteriormente, cuanto menor sea el valor de CL 50 para un determinado producto, más elevada será su toxicidad.

4.3.3. TOXICO DE REFERENCIA

Es el compuesto químico orgánico o inorgánico utilizado en pruebas de toxicidad con fines de control de calidad analítica de los organismos a utilizar en las pruebas.

El sulfato de zinc es un compuesto químico cristalino, incoloro y soluble en agua, de fórmula: $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$, su composición química está dividida de la siguiente manera: Zn: 22,54%, S: 12%, O: 21,7% y H_2O : 42,9 con un peso molecular de 287,6 g/mol. Posee una conductividad eléctrica de 1.4 dS/m y pH de 3 a una concentración de 5 por ciento. Es un fertilizante muy utilizado en la fertirrigación. El zinc es un micronutriente esencial en los procesos enzimáticos de la planta, pues estimula la formación de los reguladores más importantes de crecimiento y desarrollo de tejido nuevo, mientras que el azufre, posee un poder neutralizante sobre el sodio, favorece la formación de raíces y participa en la formación de aceites y grasas de los vegetales (Sanchez y Sanchez, 2009).

V. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. MATERIALES

5.1.1. DETERMINACIÓN DE SÓLIDOS VOLÁTILES Y SÓLIDOS TOTALES

- Inóculo: lodo residual de reactor UASB
- Balanza analítica.
- Capsula de fibra de vidrio.
- Estufa para secado a 105 °C.
- Mufla para calentamiento a 550 ± 50 °C.

5.1.2. DETERMINACIÓN DE ACTIVIDAD METANOGENICA ESPECÍFICA

- Inóculo: lodo residual de reactor UASB
- Sustrato: ácido acético; 0.9 mL
- 1 Frasco para laboratorio con rosca BOECO de 500 mL
- 1 Frasco para laboratorio con rosca BOECO de 1 L
- Solución de hidróxido de sodio (1 M)
- 0.5 g de bicarbonato de sodio
- 50 g de agente reductor ($\text{Na}_2\text{S} \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)
- Medidor de pH ADWA, modelo AD12
- Válvula de seguridad
- Tubos de transferencia
- Agitador magnético de placa caliente para laboratorio
- Probeta graduada
- Soporte universal

5.1.3. PRUEBA DE POTENCIA BIOQUÍMICO DE METANO

- 9 Frascos para laboratorio con rosca BOECO de 500 mL
- 9 Frascos para laboratorio con rosca BOECO de 1 L
- Equipo de baño maría MEMMERT
- Medidor de pH ADWA, modelo AD12

- Solución de hidróxido de sodio (NaOH) 1 M
- Solución de ácido sulfúrico (H₂SO₄) 0.5 M
- Manguera de 1/8"
- 18 Corchos universales
- Balanza analítica de 5 Kg
- Precintos
- Probeta de 100 ml
- Botellas de PET de 1 L

5.1.4. MEZCLA EN ENSILADO

- 32.5 Kg de Excretas de cerdo
- 10 Kg de rastrojo de arroz
- 7.5 Kg de melaza
- Balanza capacidad 50 Kg
- 1 bidón de polietileno de 30 L con tapa y seguro

5.1.5. ETAPA DE BIODIGESTIÓN

- 6 Biodigestores Batch
- Manguera de 3/8 para gas (5 m)
- 5 Adaptadores de 3/8" a 1/4" para gas
- 2 Niples espiga terminal 1/4" x 1/2"
- Inóculo de bacterias: Lodos residuales de reactor UASB
- 4 Flotadores Intex de 91 cm de diámetro
- Potenciómetro
- Agua destilada
- Vaso precipitado de 50 mL
- 10 Abrazaderas de 3/8 para manguera
- Válvula esfera de PVC 2"
- Cinta teflón
- Pegamento para PVC
- Galonera de 6 gal
- Balde de 4 L
- Agua

5.1.6. PRUEBA DE FITOTOXICIDAD EN SEMILLAS

- Semillas de lechuga (*Lactuca sativa*)
- Sulfato de Zinc de uso agrícola ($ZnSO_4 \cdot 7H_2O$)
- Papel milimetrado
- Papel filtro
- Placas Petri de 100 mm de diámetro
- Pipeta volumétrica graduada de 1, 2 y 5 mL
- Pinza
- Agua mineral dura

5.2.METODOLOGÍA

5.2.1. ETAPA PREVIA

a) Balance de nutrientes:

Para el balance de nutrientes, se realizaron análisis de determinación del porcentaje de carbono (Método de Walkley & Black), nitrógeno (Método Kjeldahl) y humedad (APHA 2540G) en el Laboratorio de Análisis de Suelos, Plantas, Agua y Fertilizantes de la Universidad Nacional Agraria La Molina, para las excretas de cerdo, el rastrojo de arroz, la melaza y el inóculo.

b) Determinación de sólidos volátiles

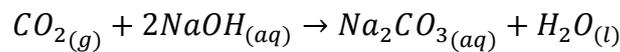
Las concentraciones de sólidos totales (ST), sólidos volátiles (SV) del inóculo se determinaron de acuerdo con los métodos 2540 B y 2540 E, respectivamente, del Standard Methods of Examination of Water and Wastewater (APHA, 1999).

Previamente se colocó la capsula de porcelana limpia a 550 °C por 1 hora, para su posterior pesado (M_c). Se homogenizó la muestra del inóculo, para luego extraer 50 mL (V) y verterlo en una capsula de porcelana, luego se colocó en la estufa a 105 °C por 24 horas y se volvió a pesar el residuo (M_1). Luego se llevó a la mufla a 550 °C por 12 horas y se volvió a pesar el residuo (M_2). Se calculó la concentración de sólidos fijos y volátiles en el inóculo, mediante las siguientes expresiones:

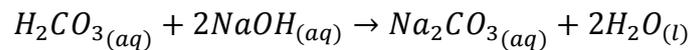
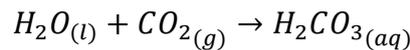
$$[ST] = \frac{M_1 - M_c}{V} \qquad [SV] = \frac{M_2 - M_1}{V}$$

c) **Determinación de la actividad metanogénica del inóculo**

Se determinó la AME del inóculo de acuerdo a la metodología de Torres y Pérez (2010). Se conectó un reactor de 500 mL a un frasco de 1 L que contuvo una disolución de hidróxido de sodio (NaOH 1 M). El dióxido de carbono (CO₂) del biogás reacciona con el hidróxido de sodio, formando carbonato de sodio (Na₂CO₃). Esta reacción se asegura con un pH mayor a 12 en la disolución de hidróxido de sodio. De esta forma, solo el metano alcanzó el espacio libre en la botella desplazando un volumen equivalente en líquido, en cual se recogió en una probeta graduada. La reacción que ocurrió en el frasco de desplazamiento fue:



En caso de que el dióxido de carbono (CO₂) se disuelva en el agua, las reacciones que ocurren son:



El reactor trabajó en régimen discontinuo y con una concentración sólidos volátiles en el inóculo de 5 g/L, debido a que el ensayo contaba con agitación (Torres y Pérez, 2010). El sustrato que se usó fue ácido acético, siendo la Demanda Química de Oxígeno inicial del medio: 2g DQO/L. También, se añadió sulfuro de sodio (Na₂S) como reductor, 0.5 g de bicarbonato de sodio diluido (NaHCO₃) como fuente de alcalinidad y el pH se ajusta a 7 con una solución diluida de NaOH 0.2 M. La configuración del sistema usado se muestra en la Figura 3.

Se colocó al reactor en un agitador magnético de placa caliente, a 33 °C y a 200 RPM, ubicado en un nivel superior al nivel de la botella con solución desplazante y se conectó una cámara de seguridad al sistema, lo que evita que, en caso de ocurrir succión del NaOH por presiones negativas, el reactor no se vea afectado. Adicionalmente, se midió el líquido desplazado durante 4 días, durante lapsos de una a dos horas.

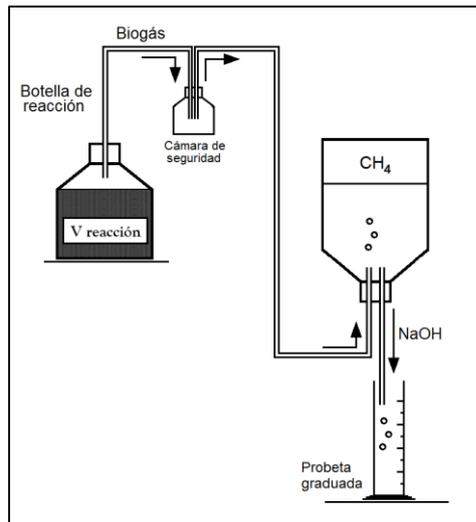


Figura 3: Configuración para la determinación de la AME

FUENTE: adaptado de Torres y Pérez, 2010.

d) Análisis de recuento de microorganismos:

Se realizó el análisis de recuento de bacterias acidolácticas (*Lactobacillus sp.*) de las excretas de cerdo y la melaza en el Laboratorio de Ecología Microbiana y Biotecnología "Marino Tabusso", mediante el método de International Commission on Microbiological Specifications for Foods.

5.2.2. ELABORACIÓN DE LA MEZCLA EN ENSILADO

El tratamiento anaerobio de ensilaje se realizó en dos recipientes herméticos de 30 litros, donde en su totalidad se introdujeron 25 kg de la mezcla de acuerdo a la proporción calculada a partir del balance de nutrientes de la etapa previa, para una relación carbono-nitrógeno de 25. Adicionalmente, se añadió un volumen de agua para aumentar el nivel de la humedad y la microflora del ensilaje pueda trabajar. Se disminuyó el contenido de oxígeno en la mezcla, mediante presión en la bolsa y se introdujo al recipiente. Luego se procedió a tapar herméticamente para evitar la entrada de oxígeno y se dejó en fermentación durante 21 días. Se monitoreará el pH cada dos días. Cabe resaltar que la mezcla se usó, tanto para la fase piloto como para la fase laboratorio.

La concentración de sólidos totales (ST) de la mezcla de ensilado determino de acuerdo con el método 2540 B, del Standard Methods of Examination of Water and Wastewater (APHA, 1999).

Previamente se colocó la capsula de porcelana limpia a 550 °C por 1 hora, para su posterior pesado (M_c). Se homogenizó la muestra del inóculo, para luego extraer aproximadamente 10 gramos (M) y colocarlo en una capsula de porcelana, luego se colocó en la estufa a 105 °C por 24 horas y se volvió a pesar el residuo (M_1). Luego se llevó a la mufla a 550 °C por 12 horas y se volvió a pesar el residuo (M_2). Se calculó el porcentaje de solidos fijos y volátiles en la mezcla de ensilado, mediante las siguientes expresiones:

$$\%ST = \frac{M_1 - M_c}{M} \times 100\% \qquad \%SV = \frac{M_2 - M_1}{M} \times 100\%$$

5.2.3. ETAPA LABORATORIO

Para medir el volumen de metano producido con este sustrato se realizó una estimación de metano en el biogás producido mediante desplazamiento de líquido, usando la configuración de la metodología de Torres y Pérez (2010), con sistemas de desplazamiento de líquidos que funcionan como botellas Mariotte (Field, 1987). Se realizaron tres repeticiones para las concentraciones de sólidos con 3, 5 y 8 por ciento, nueve pruebas para metano y nueve pruebas para biogás, para un total de 18 reactores.

La siguiente formula nos permitió calcular la cantidad de sustrato necesario para obtener el porcentaje de sólidos deseados:

$$\text{Sustrato (Kg)} = \left(\frac{ST\% \times V}{\text{Materia seca}} \right)$$

Donde:

ST: porcentaje de sólidos totales en el biodigestor

MS: porcentaje de materia seca

V: volumen del reactor (500 mL)

A cada reactor se añadió: la cantidad correspondiente de sustrato, 25 mL inóculo (5 por ciento del volumen útil) y el resto de agua hasta tener un 80 por ciento del volumen, se estabilizó el pH con cal apagada (Ca(OH)_2) hasta llegar a valores estables de 6.6 a 7.6. Se monitoreó durante 4 semanas, cada dos días, el volumen de biogás generado.

Para la medición de metano, se colocó una solución alcalina de hidróxido de sodio de 1 M con un pH de 12, después del reactor de digestión para absorber el dióxido de carbono producido y la posterior medición del volumen de metano, como se muestra en la Figura 4.

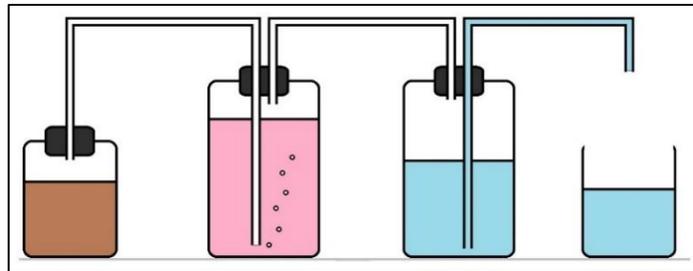


Figura 4: Configuración modificada para la producción de metano en laboratorio

FUENTE: adaptado de Torres y Pérez, 2010.

Para la configuración de la medición de biogás, el líquido de desplazamiento es agua que se acidifica con ácido sulfúrico 0.5 M (H_2SO_4), hasta un pH de 2 aproximadamente para evitar la disolución de dióxido de carbono producido (Córdoba *et al.*, 2015). La configuración se muestra en la Figura 5.

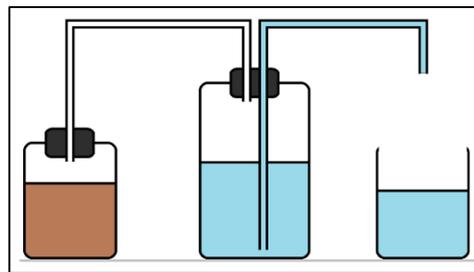


Figura 5: Configuración modificada para la producción de biogás en laboratorio

FUENTE: adaptado de Torres y Pérez, 2010.

Cada uno de los reactores fueron instalados en el equipo de baño maría marca MEMMERT, a una temperatura constante de 33°C durante el ensayo, temperatura considerada óptima para un tiempo de retención de 28 días según la fórmula proporcionada por la UPME (2003), en la Guía para la implementación de sistemas de producción de biogás, generada a partir de una simulación de la variación del tiempo de retención.

$$TR = (-51.227 \times \ln(T^{\circ}C) + 206.72)$$

Donde:

TR: tiempo de retención (días)

T°C: temperatura ambiental

Se determinó la producción de metros cúbicos de biogás por kilogramo de sólidos volátiles en el sustrato y el porcentaje de metano en el biogás para cada concentración de sólidos totales, con el objetivo de encontrar la concentración más adecuada para la producción de biogás.

5.2.4. ETAPA PILOTO

El sustrato para esta etapa fue el elaborado en la etapa de laboratorio. Para la carga, se utilizaron en el biodigestor 4 biodigestores tipo Batch, pre construidos del Laboratorio de Ingeniería Ambiental de la Universidad Nacional Agraria La Molina.

Según Schlaefli (2010), la siguiente fórmula nos permite calcular la cantidad de sustrato necesario para obtener el porcentaje de sólido deseado. Se trabajó con el 5 por ciento de sólidos totales, que presentó los mejores resultados en la etapa laboratorio.

$$\text{Sustrato (Kg)} = \left(\frac{ST\% \times V}{MS\%} \right)$$

Donde:

ST: porcentaje de sólidos totales en el biodigestor (5%)

MS: porcentaje de materia seca

V: volumen del reactor (60.5 L)

Para realizar el cálculo del sustrato se calculó primero el volumen útil del reactor que corresponde a 60.5 litros.

$$ST = 3.025 \text{ Kg}$$

$$\text{Kg de Ensilado} = \frac{60.5 \text{ L} \times 5\%}{60\%} = 7.56 \text{ Kg}$$

Entonces, para la carga, cada biodigestor será llenado con 7.56 Kg de mezcla en ensilado, 3.025 L inóculo (5 por ciento del volumen total) y el resto de agua hasta tener un 80 por ciento del volumen, de acuerdo al volumen de biodigestor Batch (60.5 L). La carga de fermentación resultó ser ácida debido a la naturaleza de las reacciones químicas de fermentación para su elaboración. Se agregó cal apagada (Ca(OH)_2) como corrector de pH para llegar hasta los valores de 6.6 a 7.6. Se monitoreó el de pH de biol, cada dos días.

5.2.5. EVALUACIÓN DE PRODUCTOS:

i. Volumen de biogás producido en escala piloto

Se evaluó el volumen total de biogás producido por cada biodigestor, mediante el método de desplazamiento de volúmenes de agua. Este procedimiento se realizó cada semana, con el fin de conseguir la producción parcial de biogás del período. El agua fue acidificada con ácido sulfúrico 0.5 M (H₂SO₄), para evitar que el dióxido de carbono del biogás se disuelva.

ii. Composición del biogás producido en etapa piloto.

Se monitoreó durante nueve semanas, la composición del biogás para observar los cambios en la biodigestión. Se analizaron las relaciones entre las variables: temperatura ambiental e interna, pH, porcentaje de metano y dióxido de carbono del biogás, con respecto al tiempo.

iii. Análisis de nutrientes del biol

Se analizó la composición de microelementos (Fe, Cu, Mn, Zn, B) y macroelementos (N, P, K, Ca, Mg, S, Na) en el biol, características fisicoquímicas (pH, conductividad eléctrica, sólidos totales y materia orgánica en solución), mediante el análisis de 1 L de biol en el Laboratorio de Análisis de Suelos, Pastos, Aguas y Fertilizantes de la Facultad de Agronomía de la Universidad Nacional Agraria La Molina. Se tomó un litro de cada biodigestor y se mezcló para obtener una mezcla representativa. Los métodos empleados en el análisis de la materia orgánica se encuentran en la Tabla 8.

Tabla 8: Métodos empleados en el análisis de la materia orgánica

Parámetro	Método de Análisis
pH	Potenciometría
CE	Conductimetría
Materia orgánica	Walkley y Black
Carbono	Walkley y Black
Nitrógeno Total	Kjeldahk
Fósforo	Amarillo del vanadato Molibdato
Boro	Curmina
K, Ca, Mg, Na, Fe, Cu, Zn, Mn	Espectrometría de Absorción Atómica

FUENTE: Laboratorio de Análisis de Suelos, Plantas, Aguas y Fertilizantes. 2016

Se compararon los resultados de análisis de nutrientes del biol producido, con el biol de otras investigaciones y fuentes.

iv. Ensayo de toxicidad aguda del biol

El ensayo se realizó un ensayo preliminar utilizando diluciones de 100, 10, 1, 0.1 y 0.01 por ciento del biol, usando un control de agua mineral. Esta prueba permitió evaluar los efectos fitotóxicos del biol producido en el proceso de germinación de las semillas de *Lactuca sativa* y en el desarrollo de las plántulas durante los primeros días de crecimiento, así como establecer el intervalo de concentración conveniente para obtener valores de efecto entre 100 al 0 por ciento de concentración, necesarios para calcular la concentración de inhibición media. (Sobrero y Ronco, 2004). Posterior a estos resultados, se realizaron pruebas con diluciones de 2, 4 y 6 por ciento, para definir la dilución con mejores resultados

Las condiciones usadas para evaluar el bioabono en su aplicación a *Lactuca sativa* en la germinación y el efecto en el crecimiento y desarrollo de las plántulas de lechuga en sus primeros estadíos fueron:

- Temperatura: 20 a 24 °C
- Calidad de luz: en oscuridad
- Tiempo de duración: 120 horas (5 días)
- Efecto medido: inhibición en elongación de la radícula e hipocótilo.

Inhibición en la germinación

Se usaron 420 semillas de lechuga, los cuales fueron distribuidas en 21 placas Petri, colocando 20 semillas cada una, para cuatro repeticiones para cada dilución.

De acuerdo a la metodología de Sobrero y Ronco (2004), los resultados de la prueba de toxicidad fueron expresadas como:

- Promedio y desviación estándar de la elongación de la radícula y del hipocótilo de las plántulas de cada repetición
- Porcentaje de inhibición del crecimiento de la radícula y del hipocótilo con el promedio de elongación para cada dilución respecto del promedio de elongación del control negativo
- Porcentaje de inhibición en la germinación

- Con los datos anteriores, se elabora la gráfica dosis-respuesta, colocando en la ordenada el porcentaje de inhibición y en la abscisa la concentración. Mediante un método gráfico, se calculó la concentración que produce el 50% de inhibición (CI50) para cada punto final evaluado. Para determinar el valor correspondiente al NOEC y LOEC, se realizó el análisis de comparación de medias (t Student, Dunnett) para verificar la significancia estadística en el porcentaje de efecto.

Así mismo, se elaboraron cartas control para evaluar el crecimiento de los controles negativos (promedio $\pm 2\sigma$ de la elongación de la radícula) y la sensibilidad de las semillas, frente al sulfato de zinc, compuesto tóxico de referencia (promedio $\pm 2\sigma$ de la CI50 del control positivo). Para la elaboración de las diluciones, se desecó 3 gramos de compuesto a 105 °C y se pesó 1 gramo para la preparación de diluciones.

v. Índice de germinación de las semillas

Se calculó el porcentaje de germinación relativo (GR), crecimiento de radícula relativo (ER) e índice de germinación (IG), según Varnero (2007):

$$GR = \frac{\text{N}^{\circ}\text{de semillas germinadas en el extracto} \times 100}{\text{N}^{\circ}\text{de semillas germinadas en el testigo}}$$

$$ER = \frac{\text{Elongación de radículas en el extracto} \times 100}{\text{Elongación de radículas en el testigo}}$$

$$IG = \frac{GR \times ER}{100}$$

Se utilizó la prueba estadística de análisis de varianza y la prueba de Dunnet entre los índices de las diluciones, para comprobar cuanta influencia tiene el abono orgánico en el crecimiento con respecto al control.

De acuerdo al estudio de fitotoxicidad de Rojas (2005), el índice de germinación (IG) ayuda a observar por rangos la toxicidad de la sustancia de estudio. Valores de IG inferiores a 50% indican una alta fitotoxicidad del material; IG entre 50% y 80% indican fitotoxicidad moderada y valores superiores a 80% el material no presenta fitotoxicidad.

VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1. ETAPA PREVIA

6.1.1. BALANCE DE NUTRIENTES:

El balance de nutrientes se realizó a partir de los resultados de análisis mostrados en la Tabla 9. La relación de nutrientes del inóculo, no se consideró para los cálculos, debido a que la concentración de carbono y nitrógeno de su composición es baja, tiene 17.66 gramos de sólidos totales en un litro de solución, con esto no cambia la relación de la muestra.

Los informes proporcionados por el Laboratorio de Análisis de Suelos, Plantas, Agua y Fertilizantes de la Universidad Nacional Agraria La Molina, se encuentran en el Anexo 1.

Tabla 9: Análisis de nutrientes y humedad de las materias primas

Materia prima	C (%)	N (%)	C/N	Humedad
Guano de cerdo	38.02	2.83	13.43	81.12
Paja de arroz	35.28	1.23	28.68	9.3
Melaza de caña	39.34	0.51	77.07	17.76

FUENTE: elaboración propia

Según el Manual de Compostaje del Agricultor de la FAO (2013) se puede calcular un balance de nutrientes para los elementos del ensilaje: el rastrojo de arroz, las excretas de cerdo y la melaza, con la siguiente fórmula:

$$R = \frac{Q_1 C_1 (1 - M_1) + Q_2 C_2 (1 - M_2) + \dots + Q_n C_n (1 - M_n)}{Q_1 N_1 (1 - M_1) + Q_2 N_2 (1 - M_2) + \dots + Q_n N_n (1 - M_n)}$$

Siendo:

R: relación C:N

Q: Peso en seco (kg)

C: Concentración de carbono en la materia seca (%)

N: Concentración de nitrógeno en la materia seca (%)

M: Humedad en peso del material (%)

Considerando una óptima relación Carbono-Nitrógeno de 25, de acuerdo a los datos obtenidos, se obtuvieron los porcentajes en peso húmedo indicados en la Tabla 10.

Tabla 10: Porcentaje en peso húmedo de la mezcla en ensilado

Materia prima	Porcentaje en peso húmedo (%)
Guano de cerdo	65
Paja de arroz	20
Melaza de caña	15

FUENTE: elaboración propia

6.1.2. DETERMINACIÓN DE SÓLIDOS VOLÁTILES Y TOTALES DEL INÓCULO

Se tomó una muestra de 50 mL para los cálculos. Luego del proceso, los resultados del pesaje son:

- Cápsula (Mc): 89.7426 g
- Capsula después de estufa (M1) : 91.4174 g
- Capsula después de la mufla (M2): 90.4506 g

Mediante las formulas calculamos la concentración de sólidos totales y solidos volátiles en el inóculo:

$$[ST] = \frac{M1 - Mc}{V} = \frac{91.4174 \text{ g} - 89.7426 \text{ g}}{50 \text{ mL}}$$

$$[ST] = 33.496 \text{ mg/L}$$

$$[SV] = \frac{M2 - M1}{V} = \frac{90.4506 \text{ g} - 91.4174 \text{ g}}{50 \text{ mL}}$$

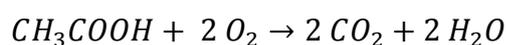
$$[SV] = 19.336 \text{ mg/L}$$

Así es como obtenemos el porcentaje de solidos volátiles en el inóculo, resultado que será utilizado en la determinación de la actividad metanogénica específica.

$$\frac{[SV]}{[ST]} \times 100\% = 57.73\%$$

6.1.3. Determinación de la actividad metanogénica específica del inóculo

El cálculo del volumen de ácido acético en el ensayo de AME, se determina de acuerdo a la ecuación:



Para consumir 1 mol de ácido acético se necesitan 2 moles de oxígeno. En peso molecular, se necesitan 64 g de oxígeno para consumir 60 g de ácido acético. Entonces en el reactor de 0.5 L y con una densidad de 1.05 g/mL, de manera equivalente para los 2 g DQO/L se obtiene el volumen de ácido acético:

$$V_{sustrato} = \frac{2 \text{ g } O_2}{1 \text{ L}} \times 0.5 \text{ L} \times \frac{60 \text{ g Ac}}{64 \text{ g } O_2} \times \frac{1 \text{ mL Ac}}{1.05 \text{ g Ac}}$$

$$V_{sustrato} \cong 0.9 \text{ ml Ac}$$

Asimismo, se calculó el volumen de inoculo en el ensayo de AME con la concentración de solidos volátiles que se determinó:

$$V_{Lodo} = \frac{V_{mezcla} \times C_{fija}}{C_{i \text{ Lodo}}} = 129.29 \text{ mL}$$

Siendo:

V_{Lodo} : volumen de lodo a adicionar al reactor (mL)

V_{mezcla} : volumen total de reacción o de mezcla (500 mL)

C_{fija} : concentración fijada (5 g SV/L)

$C_{i \text{ Lodo}}$: concentración de SVT inicial del lodo (19.336 g SV/L)

La producción teórica de metano permite estimar la fracción de materia orgánica convertida en metano a partir del volumen de metano producido en el reactor por unidad de tiempo. Esta fue corregida por el factor de corrección para condiciones puntuales, calculado de acuerdo a la fórmula:

$$K_{(t)} = \frac{P \times K}{R * (273 + t)} = 2.4724 \text{ g DQO} \cdot \text{L}^{-1}$$

Donde:

$K_{(t)}$: Factor de corrección (g DQO/L)

P: Presión atmosférica (0.9700 atm)

R: constante de los gases (0.08205746 atm. L/ mol. K)

K: carga orgánica digerida de una mol de CH₄ (64 g DQO/mol)

t: temperatura operacional del montaje (33°C)

El volumen teórico de metano se calculó por la siguiente expresión, suponiendo que el 100% de la DQO es removida:

$$V_{CH_4} = \frac{DQO_{CH_4}}{K(t)} = 404 \text{ mL/g DQO}$$

Donde:

V_{CH_4} : volumen teórico de metano producido (mL)

DQO_{CH_4} : porcentaje de DQO removida y convertida en metano (%)

Finalmente la Actividad Metanogénica Específica se determinó mediante la fórmula:

$$AME = \frac{m \times 24}{V_{CH_4} \times M} = 0.1084 \text{ g DQO/g SV.d}$$

Donde:

$m = 4.6698$. Pendiente máxima en la curva de producción de metano (Vol. Acumulado CH_4 vs Tiempo)

M = masa del lodo (volumen lodo adicionado*concentración inicial de lodo) (g SV)

Con una actividad metanogénica específica de 0.11 gDQO/gSV.d, el lodo residual del reactor piloto UASB se encuentra dentro del rango de 0.1 – 2.5 gDQO/gSV.d para reactores UASB usados para el tratamiento de aguas residuales (Guerra et al., 2000), lo cual garantiza la producción de biogás. La generación de metano en el experimento, se encuentra en el Anexo 2.

6.1.4. Análisis de recuento de microorganismos

Los resultados del análisis de recuento de *Lactobacillus sp.* en las muestras se muestran en la Tabla 11.

Tabla 11: Recuento de *Lactobacillus sp.* de materias primas de la mezcla en ensilado

Muestra	Recuento de <i>Lactobacillus sp.</i>
Excretas de cerdo	34×10^7 UFC/mL
Melaza de caña	92×10^3 UFC/mL

FUENTE: elaboración propia

Según Estrada et al (2011), en muestras de ensilaje se encontraron recuentos mayores de 5×10^4 UFC/g de bacterias ácido lácticas, considerado un buen indicador de la calidad de fermentación en el ensilaje, es decir, la mezcla tendrá un proceso con adecuada producción de ácido láctico, estabilidad del pH en niveles ácidos, condiciones que garantizan la muerte de los organismos patógenos

y la proliferación de microorganismos benéficos para la fermentación, la elaboración del ensilado será exitosa. Asimismo, Cárdenas (2012) y Torres (2013) indica que en la obtención de ‘bokashi’ de su investigación obtuvo un recuento de 66×10^5 y 54×10^4 UFC/g de recuento de *Lactobacillus sp.* respectivamente, resultados por encima de diversas empresas comercializadoras de microorganismos. Los informes de análisis se encuentran en el anexo 3.

6.2. ELABORACIÓN DE LA MEZCLA EN ENSILADO

Como el primer paso de la elaboración de la mezcla de ensilado, se requiere estimar la cantidad de sustrato para las etapas laboratorio y piloto para que no haya déficit del sustrato, según el contenido de humedad de la mezcla a elaborar. De acuerdo a lo calculado en el balance de nutrientes en la Tabla 9 y a los análisis de humedad en la Tabla 8 se puede estimar la humedad de la mezcla de ensilado.

A partir de estos resultados, se elaboraron 50 Kg de la mezcla en dos recipientes de plástico de 30 L de capacidad, donde en su totalidad se introdujeron 25 Kg de la mezcla en cada uno, siendo el peso de cada materia prima: 16.25 Kg de excretas de cerdo, 5 Kg de rastrojo de arroz y 3.75 Kg de melaza de caña, resultados calculados a partir del balance de nutrientes para una relación carbono-nitrógeno de 25. Además se añadieron 5 litros de agua a la mezcla. La humedad teórica se calculó con la siguiente formula:

$$Hd = \frac{P_1 Hd_1 + P_2 Hd_2 + \dots + P_n Hd_n}{P_1 + P_2 + \dots + P_n} \times 100\%$$

Siendo:

P: peso de la materia prima

Hd: humedad de la materia prima

$$Hd = \frac{(16.25 \times 0.8112) + (5 \times 0.093) + (3.75 \times 0.1776) + 5}{65 + 20 + 15 + 5} \times 100\%$$

$$Hd = 64.38\%$$

Para la mezcla en ensilado, se estimó una humedad teórica del 64.38 por ciento, por lo que la materia seca teórica es 35.62 por ciento. Para la estimación de la cantidad teórica de sustrato, se calculó mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Sustrato (Kg)} = \left(\frac{ST\% \times V}{\text{Materia seca}} \right)$$

Para cada concentración de sólidos correspondiente, se realizaron los cálculos para estimar la cantidad de sustrato necesario para un reactor de 500 mL.

$$S (3\%) = \frac{3\% \times 500 \text{ g}}{35.64\%} = 42.11 \text{ g}$$

$$S (5\%) = \frac{5\% \times 500 \text{ g}}{35.64\%} = 70.18 \text{ g}$$

$$S (8\%) = \frac{8\% \times 500 \text{ g}}{35.64\%} = 112.29 \text{ g}$$

En la tabla 12, se muestra la cantidad teórica necesaria de sustrato, teniendo en cuenta que para cada concentración de sólidos en esta etapa se utilizan 6 reactores, obteniendo como resultado un estimado de 1.2 kg de mezcla.

Tabla 12: Estimación de la cantidad de sustrato necesario en laboratorio

Concentración de sólidos (%)	Sustrato (g)	Cantidad necesaria (g)
3	42.11	252.7
5	70.18	421.1
8	112.29	673.7

FUENTE: elaboración propia

Para la etapa piloto, solo se utilizará la concentración de sólidos que tenga mejores resultados en la etapa de laboratorio, estimando como la cantidad teórica necesaria a la mayor cantidad que se podría usar para que no falte sustrato, de ser el caso.

$$S (3\%) = \frac{3\% \times 60.5 \text{ Kg}}{35.64\%} = 5.10 \text{ Kg}$$

$$S (5\%) = \frac{5\% \times 60.5 \text{ Kg}}{35.64\%} = 8.49 \text{ Kg}$$

$$S (8\%) = \frac{8\% \times 60.5 \text{ Kg}}{35.64\%} = 13.59 \text{ Kg}$$

Se elaboró la Tabla 13, donde se calcula que se necesitaría 54.35 Kg de la mezcla para tener la cantidad necesaria para cualquiera de los casos, teniendo en cuenta que se cuenta la cantidad necesaria como más de 3 repeticiones, para garantizar los procesos anaeróbicos en el centro del silo.

Tabla 13: Estimación de la cantidad de sustrato necesario en etapa piloto

Concentración de sólidos (%)	Sustrato (Kg)	Cantidad necesaria (Kg)
3	5.10	15.29
5	8.49	25.48
8	13.59	40.76

FUENTE: elaboración propia

La elaboración de la mezcla se dejó fermentar por 22 días. El comportamiento del pH en se puede observar en la Figura 6. Se observa que la mezcla tiene un pH alrededor de 6.5 para ambos recipientes.

En los primeros días del ensilaje, se tuvo cuidado con los gases emitidos durante la primera fase del proceso, debido a que el oxígeno que aún se encuentra disponible en la mezcla, se consume junto con carbohidratos solubles para generar dióxido de carbono, debido a la respiración de los microorganismos aerobios. Para evitar el aumento de presión por los gases, se instaló una válvula de seguridad en la tapa del recipiente. Posteriormente, al acabar la fase aerobia al cabo de unos días, se pudo observar que ya no se ejercía presión en la válvula. Asimismo, se pudo deducir que no hubo fermentación butírica por clostridios en los días posteriores del ensayo, pues de haberse generado dióxido de carbono, la válvula hubiese generado presión.

Luego de 8 días, la mezcla se acidifica por la generación del ácido láctico hasta llegar a estabilizarse a valores de pH entre 3.5 y 4, logrando un ensilaje adecuado. Hacia el final del proceso el pH aumenta ligeramente, debido a la inoculación de aire en la toma de muestras. Los datos de monitoreo de pH se encuentran en el Anexo 4.

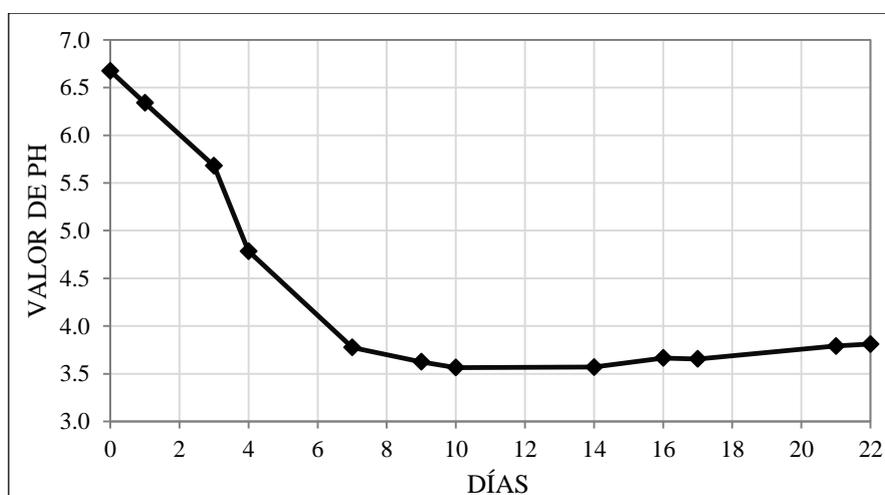


Figura 6: Comportamiento del pH en la mezcla en ensilado

FUENTE: elaboración propia

Según Cárdenas (2012), el objetivo del método bocashi, el uso de microorganismos para la fermentación de materia orgánica, es la eliminación de malos olores e insectos vectores y la degradación más rápida de materia orgánica debido al pH ácido. En el ensilaje se dan estas ventajas, además de no necesitar mano de obra a diferencia del compostaje, como ha sido mostrado en la investigación de Torres (2013).

A partir del sustrato producido, se determinó la humedad a partir de la cantidad de sólidos totales de la mezcla de ensilado, siendo el resultado de los pesajes:

- Cápsula (Mc): 89.7153 g
- Cápsula después de estufa (M1) : 93.5223 g
- Capsula después de la mufla (M2): 92.9137 g
- Volumen de la muestra: 10.3198 g

Se determinó el porcentaje de sólidos totales:

$$ST\% = \frac{M1 - Mc}{M} \times 100\%$$

$$ST\% = \frac{93.5223 \text{ g} - 89.9137 \text{ g}}{10.3198 \text{ g}} \times 100\%$$

$$ST\% = 36.89\%$$

Entonces la humedad de la mezcla de ensilado fue de 63.11%, humedad aproximada a la estimada previamente (64.34%), para lo que se reajustó la cantidad de sustrato a usar en las siguientes etapa. Para el porcentaje de solidos volátiles en la mezcla de ensilado, se usó la siguiente formula:

$$SV\% = \frac{M2 - M1}{V} \times 100\%$$

$$SV\% = \frac{92.9137 \text{ g} - 93.5223 \text{ g}}{10.3198 \text{ g}} \times 100\%$$

$$SV\% = 15.59 \%$$

6.3. ETAPA LABORATORIO

Dado que se determinó la humedad real para la mezcla de ensilado, se reajusta la cantidad de sustrato a usar en la etapa laboratorio

$$S (3\%) = \frac{3\% \times 500 \text{ g}}{36.89\%} = 40.66 \text{ g}$$

$$S (5\%) = \frac{5\% \times 500 \text{ g}}{36.89\%} = 67.77 \text{ g}$$

$$S (8\%) = \frac{8\% \times 500 \text{ g}}{36.89\%} = 108.43 \text{ g}$$

Para cada concentración se utilizaran 6 reactores, por lo que la cantidad necesaria para laboratorio es aproximadamente 1.1 kg de sustrato, como se muestra en la Tabla 14.

Tabla 14: Determinación de la cantidad de sustrato necesario en laboratorio

Concentración de sólidos (%)	Sustrato (g)	Cantidad necesaria (g)
3	40.66	243.97
5	67.77	406.61
8	108.43	650.58

FUENTE: elaboración propia

Luego de 28 días en el equipo de baño maría a 33 °C, se obtuvieron los resultados de la Figura 7, donde se puede observar que la concentración de sólidos de 5 por ciento tiene una mayor producción de biogás, hasta 2.6 L de biogás en condiciones normales, frente a cantidades menores de las concentraciones de 3 y 8 por ciento.

Para el 3 por ciento, se muestra un mejor arranque en la producción hasta el día 20, presenciando una tendencia a la baja, que se debe al consumo del sustrato. El volumen que se producirá será proporcional a la cantidad de la carga, por lo que no superará a mayores concentraciones de sólidos.

Para el 8 por ciento, se muestra un inicio lento de la producción. Se observó que las burbujas de biogás quedan atrapadas en la mezcla, debido a la gran cantidad de materia en el reactor, hasta que se genere una mayor cantidad del gas y por el empuje, logren salir de la solución. Sin embargo, a pesar de que la concentración de sólidos totales es mayor, el volumen de biogás producido no supera a 2 litros. Posteriormente se midió el pH, mostrando valores menores a los recomendados. Esto se debe a que la generación de acidez en la etapa acetogénica rompió la capacidad amortiguadora del reactor.

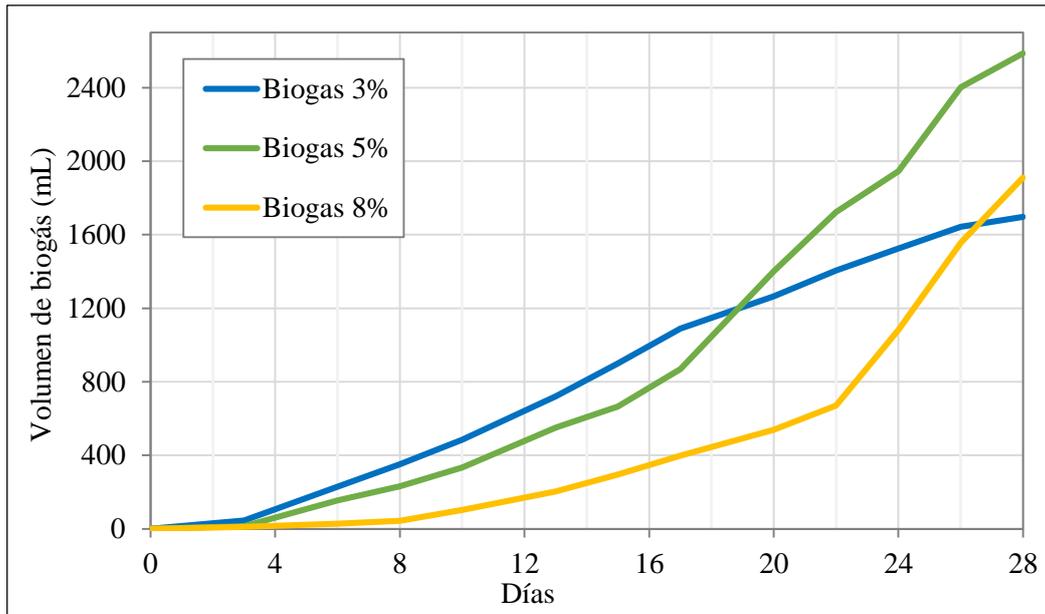


Figura 7: Producción de biogás (mL) en laboratorio

FUENTE: elaboración propia

Para el contenido de metano en el biogás, se muestra en Figura 8, que la concentración de cinco por ciento de sólidos llega a contener 1.4 L de metano en el biogás. Para el 3 y 8 por ciento, el contenido de metano disminuye considerablemente, siguiendo una tendencia similar a la del biogás.

Para el 8 por ciento, se muestra que la cantidad de metano es baja, lo que indica que la acidez inhibió las bacterias metanogénicas y la posterior transformación de acetato a metano.

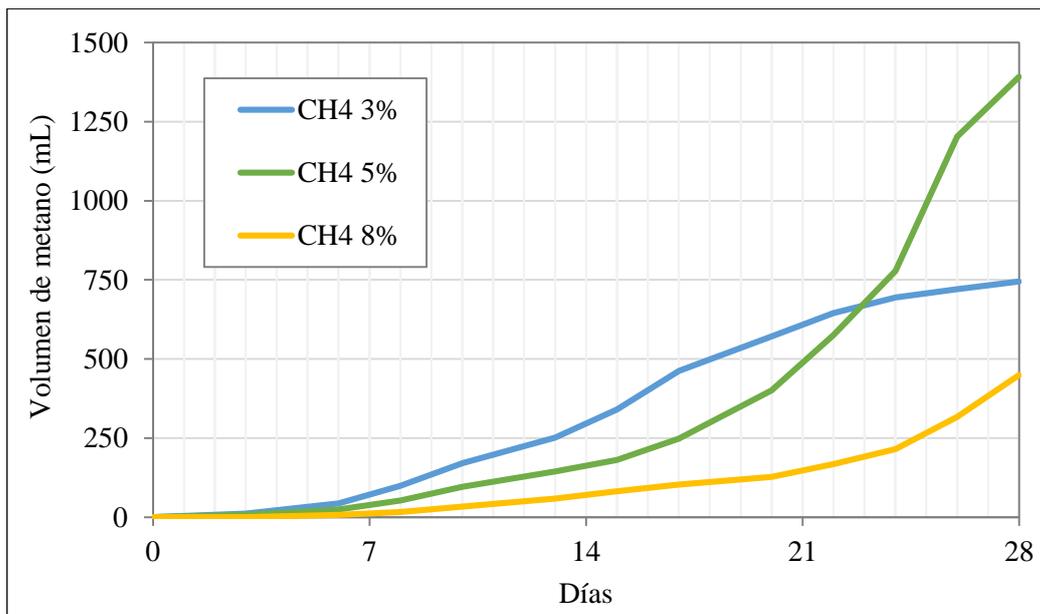


Figura 8: Producción de metano (mL) laboratorio

FUENTE: elaboración propia

En porcentaje, para el día 28 en la concentración de sólidos totales de 5 por ciento, el 53 por ciento en promedio de metano en la cantidad promedio de biogás. En comparación con la cantidad y porcentaje de metano con las concentraciones de 5 y 8 por ciento, la concentración de 5 por ciento los supera ampliamente, como se muestra en la Tabla 15.

Tabla 15: Porcentaje de metano en biogás en etapa laboratorio

Cantidad	3%	5%	8%
Biogás (mL)	1696.6	2585.2	1911.2
Metano (mL)	744.4	1391.5	449.2
%CH ₄	43.88	53.83	23.50

FUENTE: elaboración propia

El rendimiento de biogás, es mayor en la concentración de sólidos de 3 por ciento, llegando hasta 0.2372 m³/gSV. Sin embargo, se escogió la concentración de 5 por ciento, como la óptima, debido a la mejor relación del volumen de biogás y contenido de metano producidos, así como el mayor consumo de materia orgánica para el biodigestor y producción de biol de buena calidad, con mayores concentraciones de nutrientes. En la Tabla 16, se muestra el rendimiento para cada repetición y el rendimiento promedio.

Tabla 16: Rendimiento de biogás en etapa laboratorio

Porcentaje de sólidos (%)	Peso de sustrato (gSV)	Volumen promedio de biogás (mL)	Rendimiento promedio de biogás (m ³ /kgSV)
3	6.34	1696.6	0.2677
5	10.34	2585.2	0.2447
8	16.90	1911.2	0.1131

FUENTE: elaboración propia

Los resultados de biogás y metano para la etapa laboratorio se encuentran en el Anexo 5.

6.4. ETAPA PILOTO

De acuerdo a los resultados de la etapa laboratorio, se procedió a utilizar el 5 por ciento de sólidos totales. Para realizar el cálculo del sustrato, se empezó con el volumen útil del reactor que corresponde a 60.5 litros y luego se calculó la cantidad de sustrato, con una humedad de 56.13 por ciento.

$$\text{Sustrato (Kg)} = \left(\frac{ST\% \times V}{\text{Materia seca}} \right)$$

$$\text{Sustrato (Kg)} = \frac{5\% \times 60.5 \text{ L}}{36.89\%} = 8.2 \text{ Kg}$$

Por ende, para la carga, cada biodigestor será llenado con 8.2 Kg de mezcla en ensilado, 3.025 L inóculo (5 por ciento del volumen total) y el resto de agua hasta tener un 80 por ciento del volumen, de acuerdo al volumen de biodigestor Batch (60.5 L). Cabe destacar que el inóculo no tiene la cantidad necesaria de carbono y nitrógeno como para afectar el balance de nutrientes en la carga al biodigestor, como se demostró mediante análisis de estos parámetros en el Laboratorio de Análisis de Suelos, Plantas, Agua y Fertilizantes.

En la Figura 9, se puede observar la evolución del pH a lo largo del proceso. Se estabilizó el pH de la mezcla en el biodigestor, mediante la adición de cal apagada (Ca(OH)_2) para mejorar el arranque del proceso.

Según el Manual de Biogás (2011), el proceso anaeróbico puede ser inhibido con pequeños cambios en los valores de pH, que se encuentran fuera del rango óptimo. Los microorganismos metanogénicos son más sensibles a las variaciones de pH que los otros microorganismos de la comunidad microbiana anaeróbica. El óptimo es entre 5.5 y 6.5 para acidogénicos y entre 7.8 y 8.2 para metanogénicos. El pH óptimo se encuentra en el rango entre 6.8 y 7.4, siendo el pH neutro el ideal.

Se observa una ligera acidificación en los primeros 21 días, logrando estabilizarse hasta el día 35. Esto se debe a que los lactobacilos del sustrato, que generan acidez al seguir produciendo ácido láctico en condiciones anaerobias y en la etapa acetogénica se genera acidez por parte de las reacciones que generan acetato, hidrogeno gaseoso, dióxido de carbono y cationes de hidrogeno libres. Un gran aumento de ácidos grasos disminuirá el pH que inhibirá progresivamente a las bacterias metanogénicas hasta bloquear completamente el proceso anaerobio.

En el día 42, se tiene un pH promedio de 6.75 que se considera fuera del rango óptimo de pH, para posteriormente acidificarse hasta valores de 5.72, teniendo niveles de pH que inhiben la metanogénesis pero que se encuentra dentro del rango óptimo para la generación de ácidos grasos volátiles que no se convierten a metano y a su vez, generan acidez.

Así mismo, la acumulación de hidrógeno molecular (H_2) inhibe la acetogénesis y la acumulación de ácidos grasos volátiles con más de dos átomos de carbono, particularmente ácidos propiónico y butírico (Martí, 2006)

La regulación del pH en el rango deseado se logra agregando regularmente a la mezcla materiales alcalinos, tales como cal o cenizas (Silva, 2002).

Las mediciones de pH de los reactores se encuentran en el Anexo 6.

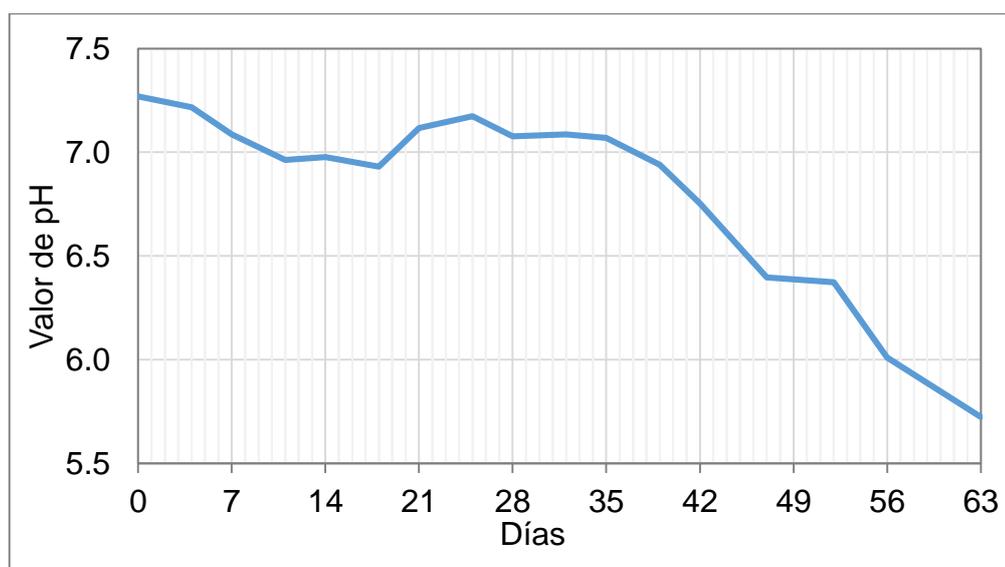


Figura 9: Monitoreo de pH en la etapa piloto

FUENTE: Elaboración propia

6.5. EVALUACIÓN DE PRODUCTOS:

6.5.1. VOLUMEN DE BIOGÁS PRODUCIDO EN ETAPA PILOTO:

En la Figura 10, muestra la producción de biogás para los biodigestores, alcanza un volumen de 380 a 410 litros en condiciones normales, y de 440 a 480 litros en condiciones estándar. Se muestra un aumento creciente hasta la semana 7, donde la producción de biogás disminuye paulatinamente. En las mediciones de pH, es en la semana 7 donde se acidifican las mezclas, lo cual indicaría que es el pH el factor que frena al proceso.

La temperatura fue un factor que ayudó a la generación de biogás, con un promedio de temperaturas máximas de 30.42 °C y promedios de 25.17 °C.

De acuerdo a la formula proporcionada por la UPME (2003) en la Guía para la implementación de sistemas de producción de biogás, generada a partir de una simulación de la variación del tiempo de retención, con datos de temperatura reportados por varias fuentes, para la temperatura promedio de 25.15 °C y la temperatura máxima promedio de 30.42 °C, se tendrá un tiempo de retención aproximado de entre 41 y 32 días.

Como se podrá observar en la medición de volumen de biogás, a partir del día 35 las producciones de biogás bajaron hasta volúmenes de 20 hasta 5 litros al final

de proceso. Esta bajada en la producción, se puede interpretar a que la concentración de sólidos volátiles está disminuyendo, lo que indicaría que en 63 días se consume el sustrato.

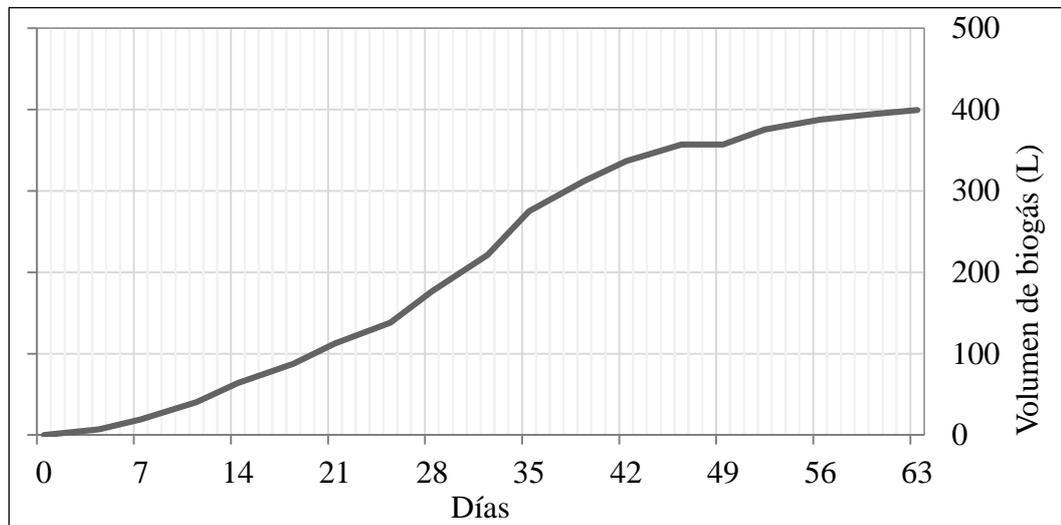


Figura 10: Cantidad promedio de biogás (L) producido en piloto

FUENTE: Elaboración propia

En la Tabla 17, se define el rendimiento de biogás en piloto que más se acercara al rendimiento de biogás en la escala laboratorio. Lo cual nos indica que toma entre 35 y 39 días (semana 5) en obtener los rendimientos óptimos en condiciones atmosféricas y de temperatura normales. El monitoreo de volumen de biogás está en el Anexo 7.

Tabla 17: Rendimiento de biogás en etapa piloto

Porcentaje de sólidos (%)	Peso de sustrato (kgSV)	Volumen de biogás (L)	Rendimiento de biogás (m ³ /KgSV)	Promedio de rendimiento (m ³ /KgSV)
5	1.32	286.2 ^(a)	0.2169	0.2156
		297.9 ^(b)	0.2248	
		272.7 ^(a)	0.2058	

(a) Día 35, (b) Día 39

FUENTE: elaboración propia

El rendimiento total para la investigación sería 0.302 m³/KgSV. En la tabla 18 se muestran los volúmenes de biogás, cantidad de sustrato y diferentes rendimientos obtenidos por diferentes autores con sustratos orgánicos, con diferentes mezclas y tratamientos.

Tabla 18: Comparación de rendimientos de biogás

Sustrato	Peso de sustrato	Volumen de biogás	Rendimiento	Fuente
	Kg Sv	L	M ³ /KgSV	
Ensilaje de estiércol de cerdo	1.32	399.4	0.302	Investigación
	3.025		0.133	
Residuos orgánicos	3.025 (*)	27.7	0.009	Cárdenas, 2012
Estiércol de vaca y bokashi	3.028 (*)	657.7	0.217	Torres, 2013
Estiércol de cerdo y aguas residuales	5.12 (*)	436.2	0.085	Pinto, 2012
Estiércol de cerdo y agua de pozo	5.12 (*)	357	0.070	

(*) Peso como kilogramos de sólidos totales

6.5.2. COMPOSICIÓN DEL BIOGÁS PRODUCIDO EN ETAPA PILOTO.

a) Metano en el biogás

Se observa que en las primeras semanas que se encuentran lecturas significativas de metano en el biogás. Esto se debe a los saltos a la etapa acetogénica, el contenido de ácido láctico disponible en el sustrato que se transforman en acetato y a la eliminación de microorganismos patógenos, competidores en los procesos de consumo del sustrato.

El porcentaje de metano en el biogás producido llega a un máximo de 47 por ciento para los días 33 a 35 (semana 5), teniendo valores mayores a 45 por ciento en las repeticiones, para luego bajar paulatinamente hasta los valores de 35 por ciento, como se puede observar en la Figura 11.

Al haber ocurrido una acidificación por ácidos grasos volátiles que produce una inhibición de generación de metano, se obtiene un biogás pobre en metano y con menos cualidades energéticas (Manual de Biogás, 2011).

Aunque el porcentaje de metano no logra llegar al rango de 50 a 80 por ciento para considerarlo como biogás de buen poder calórico (Merced, 2012), puede aumentar, depurando el biogás con hidróxido de sodio para disminuir el porcentaje de dióxido de carbono.

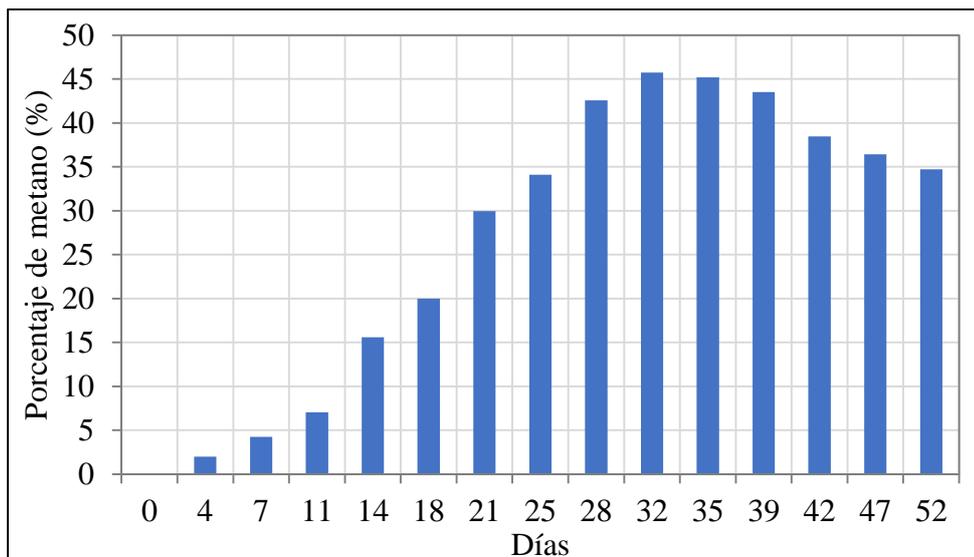


Figura 11: Porcentaje promedio de metano en etapa piloto

FUENTE: Elaboración propia

b) Dióxido de carbono en el biogás

En la Figura 12, el porcentaje de dióxido de carbono (CO₂) no supera el 35 por ciento en ninguna medición, llegando a sus máximos valores en los días 28 a 33. Para disminuir posteriormente, junto con la generación de metano. Asimismo, en el monitoreo de pH, se da una acidificación que se le atribuye a la dilución del dióxido de carbono en la mezcla líquida. Los resultados de concentración de dióxido de carbono están dentro del rango de 20 a 50 por ciento, rango que nos indica un biogás de calidad (Merced, 2012).

Las mediciones de composición porcentual de metano y dióxido de carbono, se encuentran en el Anexo 8.

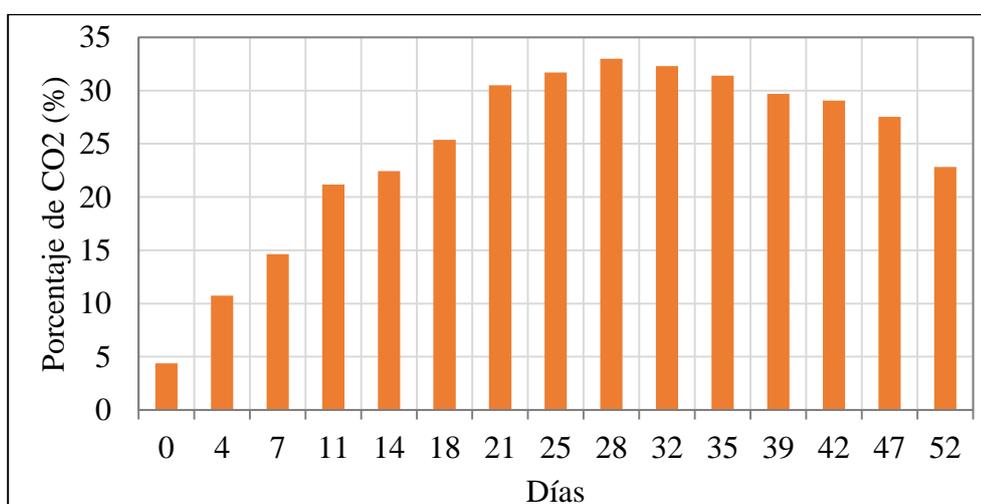


Figura 12: Porcentaje de dióxido de carbono en etapa piloto

FUENTE: Elaboración propia

6.5.3. ANÁLISIS DE NUTRIENTES DEL BIOL

Ante la falta de una normativa específica nacional para los abonos orgánicos, es preciso aclarar el uso de normativa internacional y resultados de investigaciones anteriores, para tener un margen de los aspectos que se refieren al tema con el fin de tener una referencia para las circunstancias. En la Tabla 19 se encuentra la comparación de los parámetros físicos del biol en investigación. Los informes de análisis se encuentran en el Anexo 9.

Para un biol de calidad, Medina (2013) nos indica que el rango de pH debe estar entre 5.4 a 7.0, logrando estar dentro de ambos rangos con un pH de 5.74.

Según la normativa de calidad de compost de Chile (2003), el pH del compost debe estar entre 5 a 7.6, De acuerdo a la normativa, el contenido de materia orgánica debe ser mayor o igual a 45% en base seca. Para el caso del biol en investigación, tenemos 21.76 g de materia orgánica en un total de 36.96 g de sólidos totales, para lo cual tenemos aproximadamente 60%.

La Conductividad eléctrica debe estar dentro del rango de 5 a 12 dS/m, sobrepasando el rango por 4 dS/m. Según Aldón (2008), para valores altos de conductividad, el biol se debe diluir para su aplicación en semillas o cultivos.

Tabla 19: Comparación de parámetros físicos del biol

Parámetros		Biol de ensilado de estiércol de cerdo	Rango aceptable	Fuente
pH	---	5.74	5.4 – 7.0	Medina, 2013
CE	dS/m	15.7	5 – 12	Normativa de calidad de compost de Chile
MO	%	58.91	> 45	
	g/l	21.76	---	---
ST	g/l	36.94	---	---

FUENTE: Elaboración propia

Se compararon los resultados de macro nutrientes con los resultados exitosos de otras investigaciones. Según Medina (2013), el contenido de nutrientes que presenten los abonos orgánicos, deberá ser lo más elevado posible, para que el aporte mineral sea suficiente para el desarrollo de cualquier cultivo. Se propone que la concentración mínima nutricional para los bioabonos líquidos producidos en forma artesanal no sea menor a lo indicado por Medina (2013) en la Tabla 20.

Asimismo, se comparó el valor nutricional del biol con otras investigaciones que usaron sustratos de origen animal para su elaboración.

Se observa que el biol en investigación, supera los límites mínimos a excepción del potasio, por un pequeño margen. El calcio se encuentra en una mayor concentración que los demás bioles, debido a la adición de cal apagada para nivelar el pH de las mezclas en los biodigestores. Según Palacios (2012), la cal agrícola, es usada como enmienda para corregir el pH ácido, neutraliza la toxicidad del aluminio soluble y nutre con calcio.

También se observa que los bioles de las demás investigaciones no superan el límite recomendado en ciertos parámetros, esto se debe a que las materias primas de cada elaboración carecen de algún nutriente y por ende, también carecerá el producto. Se recomienda el uso de aditivos para suplir estas carencias y hacer un biol apto para el desarrollo de cualquier cultivo.

Tabla 20: Comparación de macronutrientes del biol

Parámetros		Biol de ensilado de estiércol de cerdo	Bocashi y estiércol de vaca	Biol de estiércol de vaca y suero de queso	Biol de ovino II generación	Biol de calidad
Nitrógeno	mg/L	1421	1551.7	3546.7	1876	> 700
Fosforo	mg/L	545.16	423.05	955.26	203.4	> 170
Potasio	mg/L	1250	1885.8	5190	9005.56	> 1300
Calcio	mg/L	2840	1044.2	2440	1523.06	> 1800
Magnesio	mg/L	384	334.17	755	1044.44	---
Sodio	mg/L	367	818.33	755	590.83	---
FUENTE		Biol en investigación	Torres, 2013	Buchelli, 2014	Medina, 2013	Medina, 2013

Se elaboró la Tabla 21 para la comparación de los micronutrientes del biol en investigación. Según el Real Decreto 506/2013 de España, para contenidos mínimos de metales pesados en abonos inorgánicos con nutrientes principales o secundarios para aplicación foliar, se tiene que el biol en investigación supera ampliamente a lo especificado como concentraciones mínimas en el decreto español. Según Coma y Bonet (2004), el estiércol de cerdo es la fuente de zinc en la mezcla de ensilaje y por ende del biol resultante, potencial fuente de toxicidad en el abono líquido.

Tabla 21: Comparación de micronutrientes del biol

Parámetros	Biol de ensilado de estiércol de cerdo	Real Decreto 506/2013, España	
		Mínimo	Máximo: clase B
Hierro (ppm)	46.8	200	--
Cobre (ppm)	8	20	300
Zinc (ppm)	243.9	20	500
Manganeso (ppm)	7.34	100	--
Boro (ppm)	2.01	100	--

FUENTE: Elaboración propia

Aparte del caso de los nutrientes, también se tiene al conteo de coliformes fecales y totales como parte de la guía de calidad de un abono foliar orgánico (Anexo 10). Se puede observar en la Tabla 22, que hay ausencia de coliformes totales y fecales, no se encuentran presentes en el biol al final del proceso debido a la neutralización por pH ácido en la etapa de ensilado. Gracias a ello, se puede comparar con la Categoría 3 del Decreto Supremo N° 015-2015 MINAM, que nos indica el valor estándar como máximo que puede tener de coliformes totales y fecales para un agua que se utilizaría para el riego de plantas, estando el abono líquido por debajo de los límites establecidos.

Respecto a la presencia de otros microorganismos como bacterias totales, bacterias Gram+, Gram-, estafilococos y *E. coli*, si bien no se analizaron en laboratorio, según la investigación de Carhuacho (2012), indica que número de estas bacterias en el estiércol tendían a incrementarse con el ascenso del pH. En el proceso de ensilado y al final el proceso de digestión se observó el descenso del pH por lo cual teóricamente no existe riesgo de estos patógenos en el biol.

Tabla 22: Comparación de coliformes del biol

Parámetro	Unidad	Biol en investigación	D.S. N° 015-2015 MINAM: Categoría 3
Coliformes Totales	NMP/g	< 3	1000
Coliformes fecales	NMP/g	< 3	1000

El valor <3 indica ausencia de microorganismos en el ensayo

FUENTE: Elaboración propia

6.5.4. ENSAYO DE TOXICIDAD AGUDA DEL BIOL

Para el control de calidad de las semillas se realizaron sulfato de zinc como control positivo, donde se obtuvo que el promedio de la CI50 para la elongación de radícula fue de 14.07 mg/L que se encuentra dentro del rango de 11.85 a 16.29 mg/L; y el promedio de la CI50 para la elongación del hipocótilo fue de 18.01 mg/L, dentro del rango de 15.37 a 20.81 mg/L. En el Anexo 11, se encuentran las tablas de elaboración del control de calidad positivo.

Para el control de calidad negativo, se calculó el promedio y la desviación estándar de todos los datos, resultando 18.99 y 6.27, respectivamente. Así, calculamos el rango de elongación de la radícula: 6.4 a 31.5 mm. Los datos que no se encuentran dentro de este rango, no se consideraron. Así mismo, la germinación fue mayor que 95 por ciento, sin síntomas de necrosis en las plántulas, que muestra la buena calidad del lote de semillas.

Para los datos de germinación, indicados en la Tabla 23, se utilizó la regresión Probit mediante el software estadístico Minitab 17, con una distribución LogNormal, debido al factor de dilución de 0.1. Se obtuvo una CL50 de 10.27 por ciento de dilución, lo cual indica que a la dilución obtenida, el 50 por ciento de las semillas no germinarán.

Tabla 23: Germinación de semillas por dilución del biol

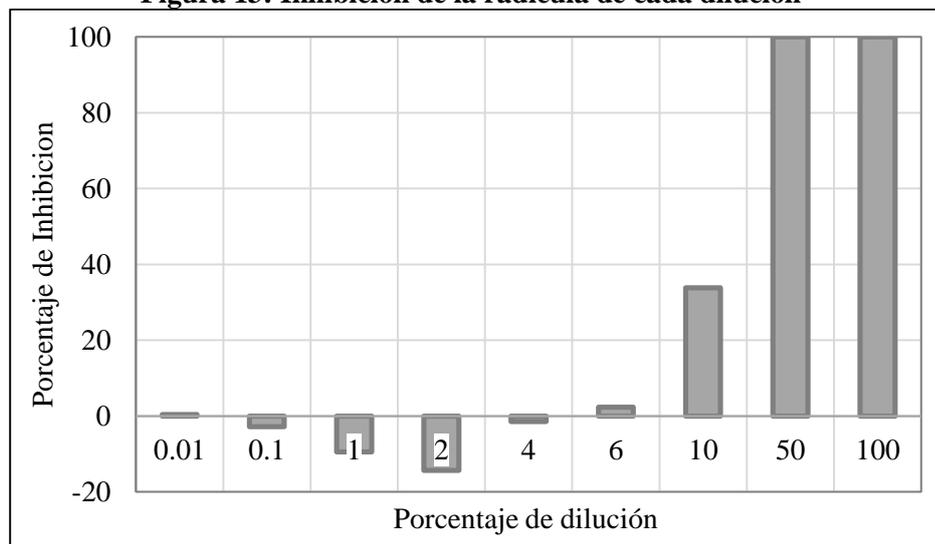
Dilución	Germinación						
	R1	R2	R3	R4	Prom.	Desv.	Inh.
Control	19	20	19	19	19.3	0.5	-
0.01	20	20	19	20	19.8	0.5	-2.6
0.1	20	18	19	20	19.3	0.96	0
1	17	18	16	19	17.5	1.29	9.09
2	16	17	17	18	17	0.82	11.7
4	16	16	17	17	16.5	0.58	14.3
6	17	15	16	15	15.8	0.96	18.2
10	15	18	10	12	13.8	3.5	28.6
50	0	0	0	0	0	0	100
100	0	0	0	0	0	0	100

FUENTE: Elaboración propia

Para el crecimiento de radícula, se obtuvieron las concentraciones medias mediante gráficas de curvas de regresión de inhibición para las repeticiones y se obtuvo una concentración inhibitoria media (CI50) de 18.95 por ciento, mostrado en el Anexo 12.

En la figura 13 se muestra la inhibición de crecimiento de la radícula por cada dilución. El 2 por ciento de dilución fomenta el crecimiento de la radícula al mostrar inhibición negativa, mostrando los mejores resultados con respecto a las demás diluciones. Mediante análisis de varianza y prueba de Dunnet, se definió que el NOEC es 4 por ciento y el LOEC es 6 por ciento (Anexo 13).

Figura 13: Inhibición de la radícula de cada dilución

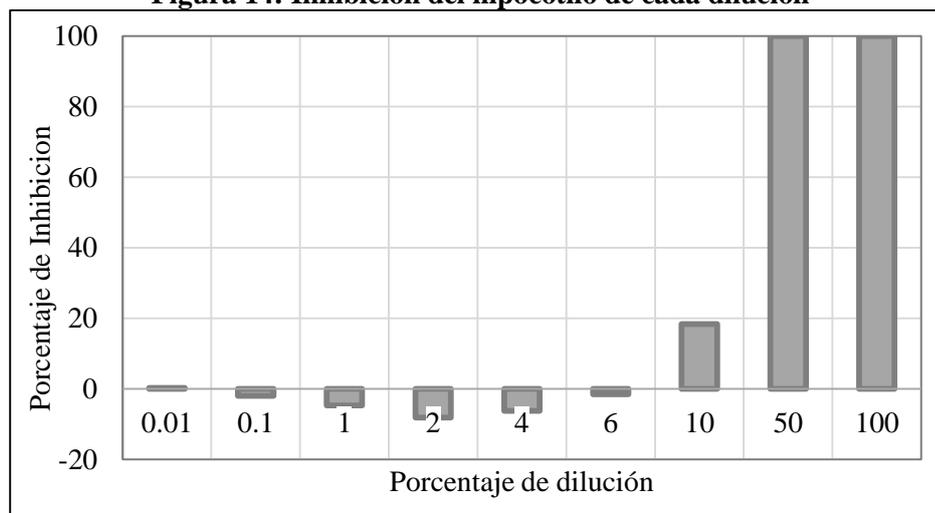


FUENTE: Elaboración propia

Para el crecimiento de hipocótilo, se obtuvieron las concentraciones medias mediante gráficas de curvas de regresión de inhibición para las repeticiones. Se obtuvo una concentración efectiva media (CI50) de 21.94 por ciento, mostrado en el anexo 12.

En la figura 14 se muestra la inhibición de crecimiento de la radícula por cada dilución. El 2 por ciento de dilución fomenta el crecimiento de la radícula al mostrar inhibición negativa, mostrando los mejores resultados con respecto a las demás diluciones. Mediante análisis de varianza y prueba de Dunnet (Anexo 13), se definió que el NOEC es 4 por ciento y el LOEC es 6 por ciento, coincidiendo con los resultados de elongación de radícula.

Figura 14: Inhibición del hipocótilo de cada dilución



FUENTE: Elaboración propia

6.5.5. ÍNDICE DE GERMINACIÓN DE LAS SEMILLAS

De acuerdo al estudio de fitotoxicidad de Rojas (2005), el índice de germinación (IG) ayuda a observar por rangos la toxicidad de la sustancia de estudio. Valores de IG inferiores a 50% indican una alta fitotoxicidad del material; IG entre 50% y 80% indican fitotoxicidad moderada y valores superiores a 80% el material no presenta fitotoxicidad.

Para las diluciones de 0.01, 0.1, 1 y 2 por ciento, se tiene valores superiores a 100 por ciento, donde se evidencia que el crecimiento de la radícula supera al control y por ende no presenta toxicidad. Se puede concluir que con resultados mayores a 100 por ciento, estas diluciones representan promotores del crecimiento, al aumentar el índice de germinación con respecto al control.

Para la dilución de 4 por ciento se tiene un índice de germinación de mayor a 80 por ciento, donde indica que no presenta toxicidad. Usando la prueba de Dunnet, se comprobó estadísticamente que el 4 por ciento de dilución representa al NOEC, dilución en la que no se observan efectos adversos.

Para la dilución de 6 por ciento, el índice de germinación llega hasta 79 por ciento que indica una toxicidad moderada. Usando la prueba de Dunnet, se comprobó estadísticamente que el 6 por ciento de dilución representa al LOEC, dilución en la que se observan efectos adversos significativos.

Para la dilución de 10 por ciento, se tienen valores menores a 60 por ciento, lo que indicaría que la toxicidad es más fuerte a partir de esta dilución. Así mismo, en los resultados de toxicidad, se obtuvo una concentración letal media alrededor de 10 por ciento, que indica que a esta dilución, la mitad de las semillas no germinarán.

Los resultados se muestran gráficamente en la Figura 15.

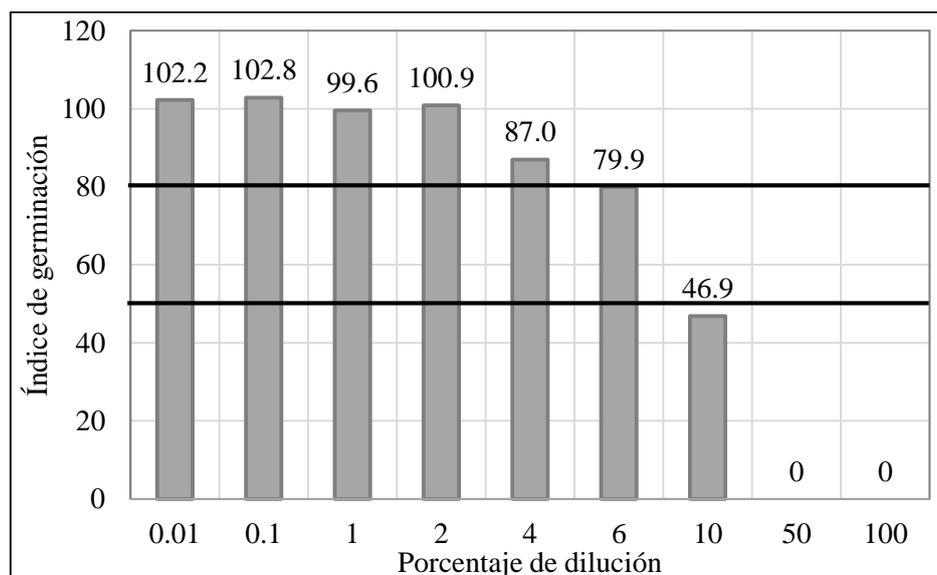


Figura 15: Índice de germinación vs dilución

FUENTE: Elaboración propia

En la tabla 24, se presentan resultados de índice de germinación de investigaciones de biol, donde se muestra que las diluciones del biol en investigación poseen menos toxicidad en comparación con los demás. La dilución de 100 por ciento usualmente muestra un índice de germinación nulo, lo cual indica que los abonos líquidos necesariamente necesitan diluirse antes de la aplicación. La forma en cómo se elaboran estos abonos, la materia prima y los procesos a los cuales son expuestos le proporcionan características tóxicas.

Según Aldón (2008), al diluir el biol, se disminuye la dosis aplicada de la fuente de toxicidad y la conductividad eléctrica. Se muestra una relación inversamente proporcional entre la conductividad eléctrica y el porcentaje de dilución con mejores resultados. En otras investigaciones, debido a la alta conductividad eléctrica, se concluye que una dilución de 0.1 por ciento es necesaria obtener mejores resultados de germinación. En la presente investigación, se tiene una conductividad eléctrica de 15.7 dS/m, menor que la

mayoría de los bioles de mejor calidad nutritiva, logrando que a una dilución de 2 por ciento se obtengan mejores resultados de crecimiento y germinación.

La toxicidad de metales puede estar siendo afectada por condiciones redox determinadas, que pueden afectar al estado de algunos elementos tales como cadmio, níquel y hierro, haciéndolos precipitar (López et al, 2010).

Tabla 24: Comparación de Índices de Germinación

Dilución	Biol de ensilado de excretas de cerdo	Fast Biol 20	Biol de ovino II generación	Biol de estiércol de vaca y suero de queso
0.01	102.24	--	94.7	112.5
0.1	102.83	84.5	85.8	80.1
1	99.56	65.8	67.1	21.8
10	46.88	0.41	0	0
100	0	0	0	0
CE al 100% dS/m	15.7	25.7	27.2	22.2
Fuente	Biol en investigación	Peralta, 2010	Medina 2013	Buchelli, 2014

VII. CONCLUSIONES

- Se evaluó la producción de biogás y biol usando como sustrato ensilaje de excretas de cerdo, melaza de caña y rastrojo de arroz, logrando eliminar la presencia de microorganismos patógenos, controlar la liberación de gases nocivos y de invernadero y generar metano en el biogás y biol de buena calidad mediante el manejo de parámetros para su biodigestión.
- En etapa laboratorio, la concentración de sólidos de 5 por ciento presentó la mejor relación de porcentaje de metano en el biogás, con 53.83 por ciento, y rendimiento de $0.2447 \text{ m}^3/\text{KgSV}$ para el día 28 del ensayo.
- En la etapa piloto, se generaron 1384 litros de biogás en condiciones ambientales, llegando a un promedio máximo de 45 por ciento de metano en el biogás en el día 32. Entre los días 35 y 39 de la etapa piloto, se alcanzó el rendimiento promedio de $0.2098 \text{ m}^3/\text{KgSV}$, tiempo que le toma al proceso para que la composición del biogás sea óptima.
- El abono orgánico, puede ser considerado de buena calidad, con respecto a los parámetros expuestos. Se determinó que una dilución de 2 por ciento es la óptima por fomentar el crecimiento de las semillas y por no tener efectos adversos de toxicidad. Se definió un NOEC de 4 por ciento y LOEC de 6 por ciento.

VIII. RECOMENDACIONES

- En la etapa de ensilado, se recomienda tener una tapa modificada con una válvula de seguridad, necesaria para evitar presiones por la generación de gases al inicio del proceso.
- Para los sistemas de desplazamiento, se debe bloquear el tubo de gas por 24 horas para que el sistema se equilibre a la temperatura ambiental, a fin de evitar presiones negativas. Cuando se inicie el desplazamiento, se debe verificar que no exista succión o avance de líquido hacia el reactor. De ser así, la fuga es evidente.
- Para facilitar el desplazamiento de líquido, se coloca el recipiente del líquido a una altura mayor a la del recipiente de medición, para facilitar que el gas fluya rápidamente.
- La manguera en forma de “U” ubicada en la botella de hidróxido de sodio se ideó con el objetivo de que actuara como un sifón y dificultara el reflujó hacia el reactor.
- Se recomienda estabilizar el pH de la mezcla en los biodigestores semanalmente, así como la medición de alcalinidad y su manejo, para evitar la inhibición de los microorganismos y continuar con la degradación de la materia orgánica.
- Para la medición de volumen de biogás, es óptimo el uso de agua con un pH ácido, que evitará que componentes del biogás se diluyan con el agua y disminuya el volumen del biogás generado.
- Se recomienda evaluar el biosólido como abono, nutrientes, su aplicación como enmienda orgánica y abono en el suelo.
- Realizar una valoración económica viable para la comercialización de los productos, luego de su posterior optimización de los procesos de transformación y generación.

IX. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Alaniz Villanueva, OG. 2008. Adición de residuo de la industria cervecera al ensilaje de maíz como alternativa de forraje para ganado. Tesis Mg. Sc. Durango, México, Instituto Politécnico Nacional. 48 p.
2. Aldana Catalán, LY. 2008. Suplementación de Biodigestores con Vinaza y su Efecto sobre la Producción y Calidad del Biogás y sus Efluentes. Tesis Ing. Limón, Costa Rica, Universidad EARTH. 55 p.
3. Aldón Coca, DC. 2008. Estrategia ambiental de aprovechamiento de la macroalga *Ulva Lactuca* a través del proceso de ensilaje. Tesis Ing. Lima, Perú, Universidad Nacional Agraria la Molina. 96 p.
4. Alvarado Calderón, LP. 2004. Inducción del desarrollo reproductivo en *Lactuca sativa*, L., Var. *Batavia* larga, bajo las condiciones no inductivas de la sabana de Bogotá. Tesis Biol. Bogotá, DC, Colombia, Pontificia Universidad Javeriana. 127 p.
5. APHA (American Public Health Association, US) 1999. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater: 2540 Solids. 214 – 227.
6. Aparcana Robles, S. 2008. Estudio sobre el Valor Fertilizante de los Productos del Proceso: “Fermentación Anaeróbica” para Producción de Biogás. Alemania, German ProfEC GmbH. 10 p.
7. Bautista Buhigas, A. 2010. Sistema biodigestor para el tratamiento de desechos orgánicos. Tesis Ing. Estelí, Nicaragua, Universidad Carlos III De Madrid. 67 p.
8. BOE (Agencia Estatal Boletín Oficial del Estado, ES). 2013. Real Decreto 506/2013. 28 de junio 2013, sobre productos fertilizantes. 89 p.
9. Buchelli Gómez, HA. 2014. Producción de biofertilizantes de bagazo de cebada, excretas de vacuno y suero de quesería mediante fermentación homoláctica. Tesis Ing. Lima, Perú, Universidad Nacional Agraria la Molina. 129 p.
10. Carhuancho León, FM. 2012. Aprovechamiento del estiércol de gallina para la elaboración de biol en biodigestores tipo batch como propuesta al manejo de residuo avícola. Tesis Ing. Lima, Perú, Universidad Nacional Agraria la Molina. 136 p.

11. Cárdenas Cabezas, JC. 2012. Evaluación de la calidad de biogás y biol en biodigestores utilizando estiércol de vaca y residuos orgánicos del comedor pre tratados con la técnica de bokashi en la UNALM. Tesis Ing. Lima, Perú, Universidad Nacional Agraria la Molina. 136 p.
12. Castrillón *et al.* 2012. Porquinaza en la alimentación animal. Revista Lasallista de Investigación 1(1): 72-76.
13. Castillo Faura, GI. 2012. Evaluación de la codornaza y gallinaza de granjas avícolas para la producción de biogás y bioabono mediante digestión anaeróbica. Tesis Ing. Lima, Perú, Universidad Nacional Agraria la Molina. 95 p.
14. Chedly, K. Lee, S. 2001. Ensilaje de subproductos agrícolas como opción para los pequeños campesinos. In FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura, CO). Uso del Ensilaje en el Trópico Privilegiando Opciones para Pequeños Campesinos. 22 p.
15. Coma, J; Bonet, J. 2004. Producción ganadera y contaminación ambiental. XX Curso de Especialización FEDNA. Fundación Española para el Desarrollo de la Nutrición Animal, ES. 36 p.
16. Estrada et al. 2011. Efecto de la fermentación en estado sólido de la porcínaza sobre la persistencia de patógenos en el ensilaje. Boletín Científico Centro de Museos Museo de Historia Natural 15 (2): 71 – 80.
17. FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura, CL). 2013. Manual de compostaje del agricultor: Experiencias en América Latina. 122 p.
18. Garcés *et al.* 2012. Ensilaje como fuente de alimentación para el ganado. Revista Lasallista de Investigación 1(1): 66-71.
19. Guerra et al. 2000. Perfiles de actividad metanogénica específica en un reactor UASB (reactor anaeróbico de flujo ascendente y manto de lodos) utilizado para el tratamiento de líquidos cloacales pre-sedimentados. Buenos Aires, Argentina. Consejo de Investigación-INENCO, Universidad Nacional de Salta. 6 p.
20. IMP (Instituto Mexicano de Petróleo, MX). 2006. Manual de técnicas de análisis de suelos aplicadas a la remediación de sitios contaminados: Análisis toxicológico de muestras de suelo. 184 p.
21. INN (Instituto Nacional De Normalización, CL). 2004. Norma Chilena de Compost 2880-2004 (NCh 2880-2004), Compost - Clasificación y Requisitos. 23 p.

22. Iguíñez Covarrubias, G. Varela Hernández, JJ. 1999. Composteo y ensilaje de excretas porcinas. *Biotecnología* 4 (2): 66 – 73.
23. López et al. 2010. Microbiología de la producción controlada de sulfuro de hidrógeno. Una experiencia de trabajo en el laboratorio de educación secundaria. *Revista Eureka sobre Enseñanza y Divulgación de las Ciencias* 7(2): 573-578
24. Martí Ortega, N. 2006. Phosphorus Precipitation in Anaerobic Digestion Process. Dissertation. Boca Raton, Florida, Estados Unidos. 25 p.
25. Medina Valdiviezo, AM. 2013. Evaluación de la calidad de biol de segunda generación de estiércol del ovino producido a través de biodigestores. Tesis Ing. Lima, Perú, Universidad Nacional Agraria la Molina. 143p.
26. Merced Jiménez, D de la. 2012. Evaluación de los parámetros de un biodigestor anaerobio tipo continuo. Tesis Mg. Sc. México, Universidad Veracruzana. 66 p.
27. Meza del Águila, LM. 2014. Elaboración de abono líquido media fermentación homoláctica de papas de descarte utilizando el consorcio microbiano ácido láctico B-Lac. Tesis Biol. Lima, Perú, Universidad Nacional Agraria la Molina. 134 p
28. MIMAM (Ministerio de Agricultura), 2011. Biodigestores en el Perú, guía de las principales experiencias en el país. 23 p.
29. MINENERGIA (Ministerio de Energía, CL); PNUD (Programa de las Naciones Unidas para el Desarrollo, US); FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura, CL); GEF (Global Environment Facility, US). 2011. Manual de Biogás. 119 p.
30. Ninabanda Agualongo, JJ. 2012. Alternativas de manejo de las excretas porcinas. Tesis Ing. Riobamba, Ecuador, Escuela Superior Politécnica De Chimborazo. 75 p.
31. ONUDI (Organización de las Naciones Unidas para el Desarrollo Industrial, AT). 2007. Guía para la gestión integral de los residuos sólidos urbanos. 152 p.
32. Oude *et al.* 2001. Los procesos de fermentación del ensilaje y su manipulación. In FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura, CO). *Uso del Ensilaje en el Trópico Privilegiando Opciones para Pequeños Campesinos*. 14 p.
33. Padilla Pérez, M. 2006. Algunas consideraciones sobre el manejo y utilización de los remanentes de granjas porcinas. Programa Nacional de Cerdos. Ministerio de Agricultura y Ganadería. San José, Costa Rica. 10 p.

34. Pascual Benito, JB. 2011. Rediseño y ensayo de un biodigestor en la granja experimental de la UACH. Tesis Ing. Chapingo, México, Universidad Autónoma Chapingo. 96 p.
35. Peralta Verán, RL. 2010. Determinación de parámetros óptimos en la producción de fastbiol usando las excretas de ganado lechero del establo de la UNALM. Tesis Ing. Ciclo optativo de profesionalización en gestión de calidad y auditoría ambiental, Lima, Perú, Universidad Nacional Agraria la Molina. 120 p.
36. Pérez Medel, JA. 2010. Estudio y diseño de un biodigestor para aplicación en pequeños ganaderos y lecheros. Tesis Ing. Santiago de Chile, Universidad de Chile. 83 p.
37. Pinto Cieza, LN. 2012. Aprovechamiento de aguas residuales domésticas para producción de biogás y biol mediante digestores de carga diaria. Tesis Ing. Lima, Perú, Universidad Nacional Agraria la Molina. 132 p.
38. Reunión de Trabajo de la Asociación Argentina de Energías Renovables y Medio Ambiente (18, 2015, Buenos Aires, AR). 2015. Optimización de la co-digestión anaeróbica de purines de cerdo utilizando diseño de mezclas. Córdoba et al. Buenos Aires, Argentina. ASADES. 21-31.
39. Rodríguez Membibre, ML. 1994. Bacterias productoras de ácido láctico: efectos sobre el crecimiento y la flora intestinal de pollos, gazapos y lechones. Tesis Dr. Madrid, España, Universidad Complutense de Madrid. 55 p.
40. Rojas Monroy, RA. 1996. El uso de estiércol de cerdo en el engorde de ganado. Tesis Ing. Lima, Perú, Universidad Nacional Agraria la Molina. 73 p.
41. Sánchez Ortiz, KA. Sánchez Melo, LM. 2009. Determinación de la concentración de inhibición media (CE50-120) del bario, hierro y manganeso mediante bioensayos de toxicidad acuática sobre semillas de lechuga (*Lactuca sativa l.*). Tesis Ing. Bogotá, Colombia, Universidad de la Salle. 220 p.
42. SAGARPA (Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural Pesca y Alimentación, MX) s.f. Técnicas de ensilaje y construcción de silos forrajeros. 8 p.
43. SEMARNAT (Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales, MX). 2010. Especificaciones Técnicas para el Diseño y Construcción de Biodigestores en México. 51 p.
44. Schlaefli Moali, F. 2010. Tratamiento de residuos orgánicos del comedor universitario de la UNALM en un biodigestor semi-continuo para la producción

- de biogás y biol. Tesis Ing. Lima, Perú, Universidad Nacional Agraria la Molina. 91 p.
45. Silva Vinasco, JP. 2002. Tecnología del Biogás. Cali, Colombia, Universidad del Valle. 19 p.
 46. Sobrero, MC y Ronco, A. 2004. Ensayo de toxicidad aguda con semillas de lechuga *Lactuca sativa*. In Castillo Morales, G. Ensayos toxicológicos y métodos de evaluación de calidad de aguas: Estandarización, intercalibración, resultados y aplicaciones. Primera edición. México, Instituto Mexicano de Tecnología del Agua. 55-67.
 47. Torres Lozada, P; Pérez, A. 2010. Actividad metanogénica específica: una herramienta de control y optimización de sistemas de tratamiento anaerobio de aguas residuales. Ingeniería de Recursos Naturales y del Ambiente, 1 (9):5-14.
 48. Torres Torres, AA. 2013. Influencia del abono bocashi sobre la producción de biogás y biol en biodigestores Batch. Tesis Ing. Lima, Perú, Universidad Nacional Agraria la Molina. 99 p.
 49. UPME (Unidad De Planeación Minero Energética). 2003. Guía para la implementación de sistemas de producción de biogás. Bogotá, Colombia. 47 p.
 50. Valencia et al. 2009. Recuperación parcial del concentrado de la porquinaza, una alternativa ambiental y económica. Revista Ingeniería y Región 6 (1): 53 - 60.
 51. Varnero et al. 2007. Índices de fitotoxicidad en residuos orgánicos durante el compostaje. revista ciencia del suelo y nutrición vegetal. 7 (1): 28 – 37.
 52. Wattiaux. M, 2000. Introducción al Proceso de Ensilaje. Instituto Babcock. Universidad de Wisconsin, Estados Unidos de América. Novedades Lácteas. Feeding No. 502. 12 p.

X. ANEXOS

Anexo 1. Informes de Carbono, Nitrógeno y Humedad del Laboratorio de Análisis de Suelos, Plantas, Agua y Fertilizantes

Figura A1: Informe de análisis de guano de cerdo

 UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA LA MOLINA
FACULTAD DE AGRONOMIA
LABORATORIO DE ANALISIS DE SUELOS, PLANTAS, AGUAS Y FERTILIZANTES 

INFORME DE ANALISIS ESPECIAL DE
MATERIA ORGANICA

SOLICITANTE : ALFREDO SHIRAKAWA APAC
PROCEDENCIA : LIMA/ LIMA/ LA MOLINA
MUESTRA DE : GUANO DE CERDO
REFERENCIA : H.R. 46265
BOLETA : 11278
FECHA : 15/08/14

Nº LAB	CLAVES	C %	N %	Relación C/N	Hd. %
586	Muestra 1	38.02	2.83	13.43	81.12

Dr. Sady García Bendezu
Jefe de Laboratorio

Figura A2: Informe de análisis de melaza de caña de azúcar

 UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA LA MOLINA
FACULTAD DE AGRONOMIA
LABORATORIO DE ANALISIS DE SUELOS, PLANTAS, AGUAS Y FERTILIZANTES 

INFORME DE ANALISIS ESPECIAL DE
MATERIA ORGANICA

SOLICITANTE : ALFREDO YOSHIMI SHIRAKAWA APAC
PROCEDENCIA : LIMA
MUESTRA DE : MELAZA DE CAÑA DE AZÚCAR
REFERENCIA : H.R. 52699
FECHA : 08/01/16

Nº LAB	CLAVES	C g/L	N g/L	ST g/L
971		562.59	7.30	1176.00

Dr. Sady García Bendezu
Jefe de Laboratorio

Figura A3: Informe de análisis de melaza de caña de azúcar




UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA LA MOLINA
 FACULTAD DE AGRONOMIA
 LABORATORIO DE ANALISIS DE SUELOS, PLANTAS, AGUAS Y FERTILIZANTES

INFORME DE ANALISIS ESPECIAL EN FOLIAR

SOLICITANTE : ALFREDO SHIRAKAWA APAC
 PROCEDENCIA : LIMA/ HUARAL
 MUESTRA : RASTROJO DE PAJA DE ARROZ
 REFERENCIA : H.R. 48360
 BOLETA : 11750
 FECHA : 27/01/15

Nº LAB	CLAVES	N %	C %	Hd. %
254		1.23	35.28	9.30


 Dr. Sady García BendeZú
 Jefe de Laboratorio

Figura A4: Informe de análisis de melaza de caña de azúcar




UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA LA MOLINA
 FACULTAD DE AGRONOMIA
 LABORATORIO DE ANALISIS DE SUELOS, PLANTAS, AGUAS Y FERTILIZANTES

INFORME DE ANALISIS ESPECIAL DE MATERIA ORGANICA

SOLICITANTE : JOEL ABDUL HUERTA PORTAL
 PROCEDENCIA : LIMA
 MUESTRA DE : LODO RESIDUAL Y GLICERINA CRUDA
 REFERENCIA : H.R. 52698
 FECHA : 08/01/16

Nº LAB	CLAVES	C g/L	N mg/L	ST g/L
970	Lodo Residual	4.82	1.53	17.66

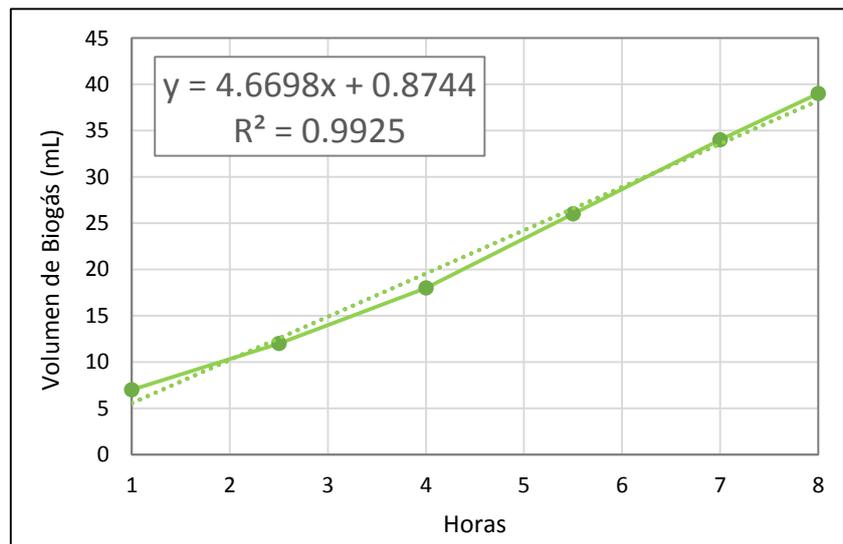

 Dr. Sady García BendeZú
 Jefe de Laboratorio

Anexo 2. Determinación de la pendiente en la Actividad Metanogénica Específica

Tabla A1: Volumen de metano vs tiempo

Tiempo (horas)	Volumen de CH ₄ (mL)
0	0
1.0	7
2.50	12
4.0	18
5.50	26
7.0	34
8.0	39
23.0	94
24.5	102
26.0	111
27.5	118
29.0	123
30.5	129
32.0	133
47.0	155
50.0	162
53.0	167
54.5	169

Figura A5: Fracción de la curva que tiene mayor pendiente



Anexo 3. Informe de recuento de *Lactobacillus sp.*

Figura A6: Informe de recuento de muestra de excretas de cerdo

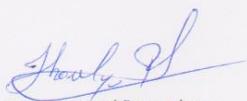
	UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA LA MOLINA Av. La Molina s/n La Molina - Lima - Perú Teléfono: 6147800 anexo 274					
INFORME DE ENSAYO N° 1603172 - LMT						
SOLICITANTE : ALFREDO YOSHIMI SHIRAKAWA APAC						
DESCRIPCIÓN DEL OBJETO ENSAYADO						
MUESTRA : EXCRETAS DE CERDO 1603172)						
PROCEDENCIA	: UNALM					
TIPO DE ENVASE	: Botella de plástico					
CANTIDAD DE MUESTRA	: 01 muestra x 01 und. x 10 g. aprox.					
ESTADO Y CONDICIÓN	: En buen estado y cerrado					
FECHA DE MUESTREO	: 2016 - 03 - 11					
FECHA DE RECEPCIÓN	: 2016 - 03 - 11					
FECHA DE INICIO DE ENSAYO	: 2016 - 03 - 14					
FECHA DE TÉRMINO DE ENSAYO	: 2016 - 03 - 17					
RESULTADOS DE ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO						
<table border="1"><thead><tr><th>Análisis Microbiológico</th><th>Muestra 1603171</th></tr></thead><tbody><tr><td>¹Recuento de <i>Lactobacillus sp</i> (UFC/ml)</td><td>34 x 10⁷</td></tr></tbody></table>			Análisis Microbiológico	Muestra 1603171	¹ Recuento de <i>Lactobacillus sp</i> (UFC/ml)	34 x 10 ⁷
Análisis Microbiológico	Muestra 1603171					
¹ Recuento de <i>Lactobacillus sp</i> (UFC/ml)	34 x 10 ⁷					
Método: ¹ International Commission on Microbiological Specifications for Foods. 1983. 2da Ed. Vol 1 Part II, (Trad. 1988) Reimp. 2000. Editorial Acribia.						
Observaciones: Informe de ensayo emitido sobre la base de resultados de nuestro laboratorio en muestra proporcionada por el solicitante. Prohibida la reproducción total o parcial de este informe, sin nuestra autorización escrita. Validez del documento: Este documento tiene validez sólo para la muestra descrita.						
La Molina, 18 de marzo del 2016						
						
DRA. DORIS ZÚÑIGA DÁVILA Jefe del Laboratorio de Ecología Microbiana y Biotecnología "Marino Tabusso" Universidad Nacional Agraria La Molina Teléfono: 614 7800 anexo 274 E-mail: imt@lamolina.edu.pe						
						
LABORATORIO DE ECOLOGIA MICROBIANA Y BIOTECNOLOGIA "MARINO TABUSSO"						
☐ (511) 6147800 anexo 274 - E-mail: imt@lamolina.edu.pe Apartado Postal 456 - Lima 12 - PERU						

Figura A7: Informe de recuento de muestra de excretas de cerdo

	UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA LA MOLINA Av. La Molina s/n La Molina - Lima - Perú Teléfono: 6147800 anexo 274					
INFORME DE ENSAYO N° 1603171 - LMT						
SOLICITANTE : ALFREDO YOSHIMI SHIRAKAWA APAC						
DESCRIPCIÓN DEL OBJETO ENSAYADO						
MUESTRA : MELAZA DE CAÑA DE AZUCAR 1603171)						
PROCEDENCIA	: UNALM					
TIPO DE ENVASE	: Botella de plástico					
CANTIDAD DE MUESTRA	: 01 muestra x 01 und. x 250 ml. aprox.					
ESTADO Y CONDICIÓN	: En buen estado y cerrado					
FECHA DE MUESTREO	: 2016 - 03 - 11					
FECHA DE RECEPCIÓN	: 2016 - 03 - 11					
FECHA DE INICIO DE ENSAYO	: 2016 - 03 - 14					
FECHA DE TÉRMINO DE ENSAYO	: 2016 - 03 - 17					
RESULTADOS DE ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO						
<table border="1"><thead><tr><th>Análisis Microbiológico</th><th>Muestra 1603171</th></tr></thead><tbody><tr><td>¹Recuento de <i>Lactobacillus sp</i> (UFC/ml)</td><td>92 x 10³</td></tr></tbody></table>			Análisis Microbiológico	Muestra 1603171	¹ Recuento de <i>Lactobacillus sp</i> (UFC/ml)	92 x 10 ³
Análisis Microbiológico	Muestra 1603171					
¹ Recuento de <i>Lactobacillus sp</i> (UFC/ml)	92 x 10 ³					
Método:						
¹ International Commission on Microbiological Specifications for Foods. 1983. 2da Ed. Vol 1 Part II, (Trad. 1988) Reimp. 2000. Editorial Acribia.						
Observaciones:						
Informe de ensayo emitido sobre la base de resultados de nuestro laboratorio en muestra proporcionada por el solicitante.						
Prohibida la reproducción total o parcial de este informe, sin nuestra autorización escrita.						
Validez del documento:						
Este documento tiene validez sólo para la muestra descrita.						
La Molina, 18 de marzo del 2016						
						
DRA. DORIS ZÚÑIGA DÁVILA						
Jefe del Laboratorio de Ecología Microbiana y Biotecnología "Marino Tabusso" Universidad Nacional Agraria La Molina						
Teléfono: 614 7800 anexo 274 E-mail: lmt@lamolina.edu.pe						
						
LABORATORIO DE ECOLOGIA MICROBIANA Y BIOTECNOLOGIA "MARINO TABUSSO"						
□ (511) 6147800 anexo 274 - E-mail: lmt@lamolina.edu.pe Apartado Postal 456 - Lima 12 - PERU						

Anexo 4. Monitoreo de pH en la mezcla en ensilado

Tabla A2

Día	R1	R2	pH promedio
0	6.64	6.71	6.68
1	6.23	6.45	6.34
3	5.62	5.74	5.68
4	4.85	4.72	4.79
7	3.74	3.81	3.78
9	3.65	3.6	3.63
10	3.58	3.55	3.57
14	3.56	3.58	3.57
16	3.72	3.61	3.67
17	3.65	3.66	3.66
21	3.81	3.77	3.79
22	3.87	3.75	3.81

Anexo 5. Volumen de metano y biogás generados en laboratorio

Tabla A3: Volumen de metano en la concentración de 3 por ciento

Día	Presión (mbar)	M3.1			M3.2			M3.3			Prom.
		V	V CN	V Ac	V	V CN	V Ac	V	V CN	V Ac	
0	985.53	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.0
3	984.27	11	9.5	9.5	15	13.0	13.0	12	10.4	10.4	11.0
6	985.61	40	34.7	44.2	35	30.3	43.3	36	31.2	41.6	43.0
8	985.60	71	61.5	105.7	59	51.1	94.5	65	56.3	97.9	99.4
10	983.66	83	71.9	177.7	78	67.6	162.1	85	73.7	171.6	170.4
13	983.84	92	79.7	257.4	105	91.0	253.1	82	71.1	242.7	251.0
15	985.01	105	91.0	348.4	93	80.6	333.7	110	95.3	338.0	340.0
17	983.93	145	125.7	474.1	146	126.5	460.2	131	113.5	451.5	461.9
20	986.01	134	116.1	590.2	127	110.1	570.2	118	102.3	553.8	571.4
22	983.11	81	70.2	660.4	83	71.9	642.2	89	77.1	630.9	644.5
24	984.14	57	49.4	709.8	54	46.8	689.0	61	52.9	683.8	694.2
26	983.14	35	30.3	740.1	23	19.9	708.9	35	30.3	714.1	721.0
28	983.15	23	19.9	760.0	26	22.5	731.4	32	27.7	741.8	744.4

Tabla A4: Volumen de Biogás en la concentración de 3 por ciento

Día	Presión (mbar)	B3.1			B3.2			B3.3			Prom.
		V	V CN	V Ac	V	V CN	V Ac	V	V CN	V Ac	
0	985.53	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.0
3	984.27	64	55.5	55.5	55	47.7	47.7	40	34.7	34.7	45.9
6	985.61	229	198.5	253.9	192	166.4	214.1	214	185.5	220.1	229.4
8	985.60	139	120.5	374.4	135	117.0	331.1	150	130.0	350.1	351.9
10	983.66	156	135.2	509.6	163	141.3	472.3	140	121.3	471.5	484.5
13	983.84	273	236.6	746.2	281	243.5	715.8	267	231.4	702.8	721.6
15	985.01	203	175.9	922.1	204	176.8	892.6	211	182.9	885.7	900.2
17	983.93	206	178.5	1100.6	237	205.4	1098.0	209	181.1	1066.8	1088.5
20	986.01	226	195.9	1296.5	167	144.7	1242.8	217	188.1	1254.9	1264.7
22	983.11	168	145.6	1442.1	170	147.3	1390.1	150	130.0	1384.9	1405.7
24	984.14	132	114.4	1556.5	139	120.5	1510.6	142	123.1	1508.0	1525.0
26	983.14	140	121.3	1677.8	150	130.0	1640.5	121	104.9	1612.8	1643.7
28	983.15	50	43.3	1721.1	84	72.8	1713.3	49	42.5	1655.3	1696.6

Tabla A5: Volumen de metano en la concentración de 5 por ciento

Día	Presión (mbar)	M5.1			M5.2			M5.3			Prom.
		V	V CN	V Ac	V	V CN	V Ac	V	V CN	V Ac	
0	985.53	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.0
3	984.27	5	4.3	4.3	5	4.3	4.3	13	11.3	11.3	6.6
6	985.61	28	24.3	28.6	12	10.4	14.7	20	17.3	28.6	24.0
8	985.60	38	32.9	61.5	33	28.6	43.3	28	24.3	52.9	52.6
10	983.66	49	42.5	104.0	47	40.7	84.1	53	45.9	98.8	95.6
13	983.84	51	44.2	148.2	45	39.0	123.1	72	62.4	161.2	144.2
15	985.01	38	32.9	181.1	45	39.0	162.1	42	36.4	197.6	180.3
17	983.93	84	72.8	253.9	79	68.5	230.5	71	61.5	259.1	247.9
20	986.01	169	146.5	400.4	175	151.7	382.2	184	159.5	418.6	400.4
22	983.11	210	182.0	582.4	190	164.7	546.8	205	177.7	596.2	575.2
24	984.14	192	166.4	748.8	280	242.7	789.5	231	200.2	796.4	778.2
26	983.14	481	416.9	1165.6	490	424.7	1214.2	501	434.2	1230.6	1203.5
28	983.15	204	176.8	1342.4	213	184.6	1398.8	234	202.8	1433.4	1391.5

Tabla A6: Volumen de Biogás en la concentración de 5 por ciento

Día	Presión (mbar)	B5.1			B5.2			B5.3			Prom.
		V	V CN	V Ac	V	V CN	V Ac	V	V CN	V Ac	
0	985.53	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.0
3	984.27	12	10.4	10.4	23	19.9	19.9	17	14.7	14.7	15.0
6	985.61	160	138.7	149.1	143	123.9	143.9	184	159.5	174.2	155.7
8	985.60	72	62.4	211.5	93	80.6	224.5	94	81.5	255.7	230.5
10	983.66	112	97.1	308.5	126	109.2	333.7	121	104.9	360.5	334.2
13	983.84	250	216.7	525.2	237	205.4	539.1	261	226.2	586.7	550.3
15	985.01	122	105.7	630.9	134	116.1	655.2	143	123.9	710.6	665.6
17	983.93	242	209.7	840.6	221	191.5	846.7	238	206.3	916.9	868.1
20	986.01	628	544.3	1384.9	613	531.3	1378.0	601	520.9	1437.8	1400.2
22	983.11	380	329.3	1714.2	362	313.7	1691.7	374	324.1	1761.9	1722.6
24	984.14	202	175.1	1889.3	340	294.7	1986.3	231	200.2	1962.1	1945.9
26	983.14	546	473.2	2362.5	492	426.4	2412.7	538	466.3	2428.3	2401.2
28	983.15	214	185.5	2547.9	237	205.4	2618.1	186	161.2	2589.5	2585.2

Tabla A7: Volumen de metano en la concentración de 8 por ciento

Día	Presión (mbar)	M8.1			M8.2			M8.3			Prom.
		V	V CN	V Ac	V	V CN	V Ac	V	V CN	V Ac	
0	985.53	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.0
3	984.27	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.0
6	985.61	5	4.3	4.3	6	5.2	5.2	12	10.4	12	7.2
8	985.60	7	6.1	10.4	10	8.7	13.9	11	9.5	23	15.8
10	983.66	20	17.3	27.7	18	15.6	29.5	19	16.5	42	33.1
13	983.84	25	21.7	49.4	31	26.9	56.3	27	23.4	69	58.2
15	985.01	23	19.9	69.3	36	31.2	87.5	21	18.2	90	82.3
17	983.93	25	21.7	91.0	25	21.7	109.2	18	15.6	108	102.7
20	986.01	19	16.5	107.5	38	32.9	142.1	23	19.9	131	126.9
22	983.11	39	33.8	141.3	51	44.2	186.3	45	39.0	176	167.9
24	984.14	73	63.3	204.5	37	32.1	218.4	47	40.7	223	215.3
26	983.14	114	98.8	303.3	124	107.5	325.9	98	84.9	321	316.7
28	983.15	152	131.7	435.1	152	131.7	457.6	134	116.1	455	449.2

Tabla A8: Volumen de Biogás en la concentración de 5 por ciento

Día	Presión (mbar)	B5.1			B5.2			B5.3			Prom.
		V	V CN	V Ac	V	V CN	V Ac	V	V CN	V Ac	
0	985.53	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.0
3	984.27	10	8.7	8.7	15	13.0	13.0	10	8.7	8.7	10.1
6	985.61	13	11.3	19.9	26	22.5	35.5	22	19.1	27.7	27.7
8	985.60	15	13.0	32.9	30	26.0	61.5	12	10.4	38.1	44.2
10	983.66	78	67.6	100.5	58	50.3	111.8	64	55.5	93.6	102.0
13	983.84	112	97.1	197.6	132	114.4	226.2	105	91.0	184.6	202.8
15	985.01	116	100.5	298.1	106	91.9	318.1	98	84.9	269.5	295.2
17	983.93	124	107.5	405.6	118	102.3	420.3	115	99.7	369.2	398.4
20	986.01	168	145.6	551.2	171	148.2	568.5	145	125.7	494.9	538.2
22	983.11	182	157.7	708.9	135	117.0	685.5	143	123.9	618.8	671.1
24	984.14	496	429.9	1138.8	485	420.3	1105.8	443	383.9	1002.7	1082.4
26	983.14	530	459.3	1598.1	542	469.7	1575.6	569	493.1	1495.8	1556.5
28	983.15	398	344.9	1943.0	428	370.9	1946.5	402	348.4	1844.2	1911.2

Anexo 6. Monitoreo de pH en escala piloto

Tabla A9:

Día	ENS 01	ENS 02	ENS 03	Promedio
0	7.25	7.35	7.21	7.27
4	7.22	7.26	7.17	7.22
7	7.13	7.09	7.04	7.09
11	7.02	6.96	6.91	6.96
14	7.06	6.91	6.96	6.98
18	7.03	6.93	6.83	6.93
21	7.18	7.06	7.11	7.12
25	7.24	7.13	7.15	7.17
28	7.11	7.09	7.03	7.08
32	7.17	7.11	6.98	7.09
35	7.07	7.13	7.01	7.07
39	6.93	6.85	7.04	6.94
42	6.59	6.73	6.94	6.75
47	6.48	6.46	6.25	6.40
52	6.42	6.3	6.4	6.37
56	6.12	5.96	5.95	6.01
63	5.77	5.71	5.69	5.72

Anexo 7. Volumen del biogás generado en escala piloto

Tabla A10:

Día	P (mb)	ENS 01				ENS 02				ENS 03			
		Vol	T01	Vol CN	Vol Acum CN	Vol	T02	Vol CN	Vol Acum CN	Vol	T03	Vol CN	Vol Acum CN
0	983.33	0	32.2	0.0	0	0	32.8	0.0	0.0	0	32.2		0.0
4	983.73	4	30.6	3.5	3.5	8	31.1	7.0	7.0	12	31.1	10.5	10.5
7	983.22	10	30.0	8.7	12.2	15	30.6	13.1	20.1	17	30.6	14.8	25.3
11	979.76	21	30.6	18.3	30.5	20	30.6	17.4	37.5	32	31.1	27.8	53.1
14	981.41	30	31.1	26.1	56.6	28	30.6	24.4	61.8	24	31.1	20.9	73.9
18	982.04	27	31.1	23.5	80.1	29	32.2	25.1	87.0	24	31.7	20.8	94.8
21	983.08	39	31.7	33.9	114.0	27	32.2	23.4	110.4	21	31.7	18.3	113.0
25	900.59	35	31.7	27.9	141.9	32	31.7	25.5	135.9	29	31.1	23.1	136.2
28	983.63	44	31.7	38.3	180.1	40	31.7	34.8	170.7	49	31.7	42.6	178.8
32	983.9	56	32.8	48.5	228.7	48	32.2	41.7	212.4	50	32.2	43.4	222.2
35	984.39	66	31.1	57.6	286.2	61	31.1	53.2	265.6	58	31.7	50.5	272.7
39	983.93	44	30.6	38.4	324.7	37	30.6	32.3	297.9	48	30.0	42.0	314.7
42	982.76	21	30.6	18.3	343.0	24	30.0	21.0	318.9	38	30.6	33.1	347.9
46	983.54	15	31.1	13.1	356.1	19	31.1	16.6	335.4	36	31.7	31.3	379.2
52	984.45	22	30.0	19.3	375.3	27	30.6	23.6	359.0	15	31.1	13.1	392.3
56	984	19	30.3	16.6	391.9	13	30.3	11.4	370.4	9	30.3	7.9	400.1
60	983.15	6	30.3	5.2	397.2	10	30.3	8.7	379.1	9	30.3	7.9	408.0
63	982.4	5	30.3	4.4	401.5	7	30.3	6.1	385.2	4	30.3	3.5	411.5

Anexo 8. Composición del biogás en escala piloto

Tabla A11: Porcentaje de metano en el biogás

Día	ENS 01	ENS 02	ENS 03	Promedio	CV
0	0	0	0	0.00	0
4	1.8	2.7	1.4	1.97	33.86
7	3.7	5.4	3.6	4.23	23.90
11	9.6	6.2	5.3	7.03	32.24
14	15.5	18.4	12.9	15.60	17.64
18	18.4	21.2	20.4	20.00	7.21
21	29.3	28.2	32.4	29.97	7.27
25	34.2	32.8	35.3	34.10	3.67
28	41.1	44.4	42.2	42.57	3.95
32	47.3	46.1	43.8	45.73	3.89
35	46.9	43.2	45.5	45.20	4.13
39	42.8	42.6	45.1	43.50	3.19
42	38.2	39.3	37.9	38.47	1.92
47	38.6	35.4	35.3	36.43	5.15
52	37.5	34.5	32.1	34.70	7.80

Tabla A12: Porcentaje de dióxido de carbono en el biogás

Día	ENS 01	ENS 02	ENS 03	Promedio	CV
0	2.2	4.4	6.5	4.37	49.24
4	10.2	10.8	11.2	10.73	4.69
7	12.3	16.2	15.4	14.63	14.08
11	19	21.9	22.6	21.17	9.02
14	20.5	22.3	24.5	22.43	8.93
18	23.1	25.5	27.5	25.37	8.68
21	29.1	30.5	31.9	30.50	4.59
25	33.3	30.4	31.4	31.70	4.65
28	32.6	34.3	32.1	33.00	3.49
32	34.2	32.4	30.3	32.30	6.04
35	31.6	32.1	30.5	31.40	2.61
39	30.1	30.8	28.2	29.70	4.53
42	30.4	29.3	27.5	29.07	5.04
47	28.4	26.1	28.1	27.53	4.54
52	22.8	21.3	24.4	22.83	6.79

Anexo 9. Informe de análisis de micro y macro nutrientes del biol

Figura A8



UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA LA MOLINA
 FACULTAD DE AGRONOMIA
 LABORATORIO DE ANALISIS DE SUELOS, PLANTAS, AGUAS Y FERTILIZANTES



INFORME DE ANALISIS ESPECIAL DE MATERIA ORGANICA

SOLICITANTE : ALFREDO YOSHIMI SHIRAKAWA APAC

PROCEDENCIA : LIMA/ LIMA/ LA MOLINA

MUESTRA DE : BIOL DE ENSILADO

REFERENCIA : H.R. 53493

BOLETA : 12970

FECHA : 22/03/16

Nº LAB	CLAVES	pH	C.E. dS/m	Sólidos Totales g/L	M.O. en Solución g/L	N Total mg/L	P Total mg/L	K Total mg/L
256		5.74	15.70	36.94	21.76	1421.00	545.16	1250.00

Nº LAB	CLAVES	Ca Total mg/L	Mg Total mg/L	Na Total mg/L
256		2840.00	384.00	367.00

LAB	CLAVES	Fe Total mg/L	Cu Total mg/L	Zn Total mg/L	Mn Total mg/L	B Total mg/L
256		46.80	8.00	243.90	7.34	2.01



Dr. Sady García Bendezú
 Jefe de Laboratorio

Anexo 10. Informes de análisis de coliformes totales y fecales

Figura A9: Análisis microbiológico del biol de ensilado

	UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA LA MOLINA Av. La Molina s/n La Molina - Lima - Perú Teléfono: 6147800 anexo 274							
INFORME DE ENSAYO N° 1603170 - LMT								
SOLICITANTE : ALFREDO YOSHIMI SHIRAKAWA APAC								
DESCRIPCIÓN DEL OBJETO ENSAYADO								
MUESTRA : BIOL DE ENSILADO 1603170)								
PROCEDENCIA	: UNALM							
TIPO DE ENVASE	: Botella de plástico							
CANTIDAD DE MUESTRA	: 01 muestra x 01 und. x 450 ml. aprox.							
ESTADO Y CONDICIÓN	: En buen estado y cerrado							
FECHA DE MUESTREO	: 2016 - 03 - 11							
FECHA DE RECEPCIÓN	: 2016 - 03 - 11							
FECHA DE INICIO DE ENSAYO	: 2016 - 03 - 14							
FECHA DE TÉRMINO DE ENSAYO	: 2016 - 03 - 16							
RESULTADOS DE ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO								
<table border="1"><thead><tr><th>Análisis Microbiológico</th><th>Muestra 1603170</th></tr></thead><tbody><tr><td>¹Enumeración de coliformes totales (NMP/g.)</td><td>< 3</td></tr><tr><td>¹Enumeración de coliformes fecales (NMP/g.)</td><td>< 3</td></tr></tbody></table>			Análisis Microbiológico	Muestra 1603170	¹ Enumeración de coliformes totales (NMP/g.)	< 3	¹ Enumeración de coliformes fecales (NMP/g.)	< 3
Análisis Microbiológico	Muestra 1603170							
¹ Enumeración de coliformes totales (NMP/g.)	< 3							
¹ Enumeración de coliformes fecales (NMP/g.)	< 3							
Método: ¹ International Commission on Microbiological Specifications for Foods. 1983. 2da Ed. Vol 1 Part II, (Trad. 1988) Reimp. 2000. Editorial Acribia.								
Observaciones: Informe de ensayo emitido sobre la base de resultados de nuestro laboratorio en muestra proporcionada por el solicitante. Prohibida la reproducción total o parcial de este informe, sin nuestra autorización escrita. Validez del documento: Este documento tiene validez sólo para la muestra descrita.								
La Molina, 18 de marzo del 2016								
								
DRA. DORIS ZÚÑIGA DÁVILA Jefe del Laboratorio de Ecología Microbiana y Biotecnología "Marino Tabusso" Universidad Nacional Agraria La Molina Teléfono: 614 7800 anexo 274 E-mail: lmt@lamolina.edu.pe								
LABORATORIO DE ECOLOGIA MICROBIANA Y BIOTECNOLOGIA "MARINO TABUSSO"								
☐ (511) 6147800 anexo 274 - E-mail: lmt@lamolina.edu.pe Apartado Postal 456 - Lima 12 - PERU								

Anexo 11. Carta control del control positivo

Tabla A13: mediciones de pH y conductividad eléctrica en diluciones de sulfato de zinc

Conc.	pH	CE
ppm	Unidades de pH	dS/m
0	7.24	0.05
0.01	7.19	0.09
0.1	6.94	0.13
1	6.91	0.12
10	6.90	0.22
100	6.86	0.28

Tabla A14: repeticiones con concentraciones de sulfato de zinc

0.01			0.1			1			10			100		
R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3
25	26	28	23	23	24	23	23	22	15	15	16	7	7	7
25	26	26	22	23	24	22	21	21	14	13	13	6	7	6
24	25	26	22	22	24	21	20	19	12	12	14	5	6	6
24	24	24	21	22	23	18	18	17	10	11	12	5	6	5
22	21	22	21	21	23	17	18	16	10	11	11	5	5	5
22	22	22	20	20	22	15	16	16	9	9	10	5	5	0
22	20	20	20	18	22	15	16	12	9	9	9	0	5	0
20	18	20	18	16	19	14	14	12	9	9	8	0	0	0
18	18	18	16	16	17	14	14	12	8	9	8	0	0	0
17	18	18	16	15	16	12	13	12	8	8	8	0	0	0
16	16	18	15	15	14	12	13	11	7	8	7	0	0	0
16	16	17	15	14	14	12	12	10	0	7	7	0	0	0
15	16	17	13	14	13	11	12	9	0	0	0	0	0	0
15	16	16	13	13	12	10	10	9	0	0	0	0	0	0
15	15	15	12	12	11	9	9	0	0	0	0	0	0	0
15	15	14	11	10	10	9	9	0	0	0	0	0	0	0
15	15	12	11	9	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0
12	15	12	10	9	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0
12	12	10	0	0	9	0	0	0	0	0	0	0	0	0
12	12	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Los cálculos para hallar la inhibición, se realizan con el promedio de la elongación de la radícula del control negativo.

Tabla A15: Promedios por repetición y desviación estándar del control positivo

Conc.	R1	R2	R3	Prom	Desv
0	-	-	-	19.5	5.76
0.01	18.1	18.3	18.3	18.2	3.82
0.1	16.6	16.2	16.7	16.5	2.66
1	14.6	14.9	14.1	14.5	2.54
10	10.1	10.1	10.3	10.1	1.57
100	5.5	5.86	5.8	5.72	0.19

Tabla A16: Cálculo de inhibición por repetición y CI50 del control positivo

Conc.	R1	R2	R3	Promedio
0.01	7.2	6.2	6.4	6.6
0.1	14.8	16.8	14.4	15.36
1	25.0	23.7	27.5	25.4
10	48.3	48.3	47.4	47.99
100	71.8	70.0	70.3	70.67
CI50	12.88	15.07	14.25	14.07

La desviación de la CI50 es 1.11. Entonces el rango para la CE 50 del control negativo será: 11.85 a 16.29 mg/L.

Anexo 12. Datos y cálculos de análisis de toxicidad

Para la concentración de 50 y 100 por ciento, ninguna semilla germinó.

Tabla A17: mediciones de pH y conductividad en diluciones de biol

Conc.	pH	CE
ppm	Unidades de pH	dS/m
0	7.24	0.05
0.01	7.14	0.14
0.1	7.09	0.43
1	7.07	0.85
2	7.02	1.56
4	6.96	2.76
6	6.84	4.15
10	6.40	5.23
50	6.12	9.83
100	5.81	15.22

Tabla A18: Promedios por repetición y desviación estándar de la radícula

Conc.	R1	R2	R3	R4	Prom	Desv
0	18.7	21	18.7	19.7	19.50	5.764
0.01	19.4	19.6	18.9	19.9	19.43	6.679
0.1	20.3	20	20.1	19.8	20.05	6.557
1	21.2	21	21.3	21.8	21.35	5.411
2	22.6	22.4	22.45	21.7	22.3	5.88
4	20	19.6	19.9	19.7	19.8	5.13
6	18.9	19	19	19.3	19.1	4.87
10	12.5	12.4	13.6	13.2	12.91	2.77
100	0	0	0	0	0	0

Tabla A19: Inhibición y CI50 de la radícula

Dilución	Radícula				
	R1	R2	R3	R4	Prom.
0.01	0.52	-0.25	3.34	-2.05	0.52
0.1	-4.10	-2.56	-3.10	-1.54	-4.10
1	-8.90	-7.69	-9.29	-12.0	-8.90
2	-16.66	-14.63	-14.63	-11.4	-16.66
4	-2.56	-0.32	-2.26	-0.8	-2.56
6	3.17	2.57	2.57	0.9	3.17
10	36.07	36.47	30.26	32.48	36.07
50	100	100	100	100	100
CI50	18.71	18.6	19.47	19.01	18.95

Tabla A20: Promedios por repetición y desviación estándar del hipocótilo

Conc.	R1	R2	R3	R4	Prom	Desv
0	36.579	34.75	36.1	35.2	35.6	5.565
0.01	35.75	35.4	36.1	35	35.5	8.673
0.1	36.35	36.3	36.3	36.4	36.3	7.4
1	37.588	36.89	37.3	37.4	37.3	8.093
2	39.1	38.1	38.2	38.5	7.28	38.9
4	37.5	37.4	38.1	37.8	8.12	38.3
6	37.1	36.2	35.3	36.2	6.85	36
10	29.7	29.7	28.6	29.1	4.05	28.3
100	0	0	0	0	0	0

Tabla A21: Inhibición y CI50 del hipocótilo

Dilución	Hipocótilo				
	R1	R2	R3	R4	Prom.
0.01	-0.323	0.66	-1.172	1.9219	0.2714
0.1	-2.007	-1.804	-1.911	-2.147	-1.967
1	-5.482	-3.519	-4.532	-5.012	-4.636
2	-9.093	-9.608	-6.802	-7.105	-8.152
4	-7.514	-5.234	-4.986	-6.967	-6.175
6	-1.025	-4.205	-1.551	0.8462	-1.484
10	20.49	16.748	16.615	19.742	18.399
50	100	100	100	100	100
CI50	21.67	22.42	22.09	21.56	21.94

Tabla A22: Repeticiones de elongación de radícula

0				0.01				0.1				1				2				4				6				10			
R1	R2	R3	R4	R1	R1	R2	R4	R2	R3	R4	R3	R4	R1	R2	R3	R4	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R4	R1	R2	R3	R4	R1	R2	R3	R4
30	30	30	30	30	33	32	27	30	32	28	32	32	29	27	27	29	27	26	27	30	29	30	30	33	30	35	28	18	16	20	18
28	30	28	30	30	30	30	26	30	28	28	30	30	27	27	27	28	26	25	25	29	28	29	28	28	28	28	28	16	16	18	16
25	27	28	26	30	28	29	25	30	28	27	30	29	27	25	26	27	26	25	24	28	27	29	26	27	28	27	26	15	15	16	15
23	26	26	25	27	27	28	23	28	25	26	29	27	26	25	25	25	25	24	23	27	26	27	26	25	26	26	26	15	15	15	15
22	24	26	25	26	27	27	22	28	25	25	28	26	25	23	24	25	25	22	22	25	25	28	25	23	26	25	26	14	13	15	15
22	24	26	21	25	26	26	20	25	24	25	27	25	22	22	24	21	22	22	21	25	24	26	24	23	24	23	26	14	13	13	14
22	22	22	20	25	25	26	20	24	21	24	26	25	22	22	23	20	22	20	20	24	23	24	24	23	24	22	26	12	12	11	14
21	22	22	20	22	25	25	20	22	21	24	24	24	21	20	20	19	21	20	20	24	21	22	24	22	22	21	25	12	12	10	12
18	22	20	20	22	24	23	18	18	20	23	22	22	19	19	19	19	18	17	19	24	21	22	24	20	22	21	24	12	12	10	10
17	22	16	19	22	22	20	17	18	20	21	20	21	18	17	19	17	18	17	18	22	21	21	24	20	18	20	23	11	12	8	10
15	22	16	17	20	20	19	16	18	19	19	19	20	16	16	17	17	15	15	17	18	20	21	22	20	18	18	21	11	12	0	10
15	20	14	17	16	18	18	15	18	18	19	18	18	15	15	16	16	14	14	16	17	17	17	20	20	17	18	20	10	12	0	9
15	20	14	16	16	15	18	14	16	18	18	17	17	15	15	16	16	14	13	14	17	17	17	16	16	16	18	19	10	12	0	0
15	20	12	15	14	15	16	14	15	18	17	16	16	14	14	16	15	13	13	14	16	16	17	15	16	16	15	19	9	11	0	0
15	20	12	15	14	15	15	13	15	15	16	14	16	12	14	14	14	12	12	12	16	16	16	14	15	16	13	18	8	10	0	0
15	18	12	15	14	14	14	0	15	13	16	14	15	12	12	13	14	12	0	12	15	14	14	12	15	16	11	17	0	10	0	0
13	14	11	15	11	0	14	0	12	13	12	14	14	0	0	13	12	11	0	0	14	10	9	12	15	16	0	16	0	10	0	0
12	14	10	14	10	0	0	0	10	10	11	0	14	0	0	0	0	0	0	0	13	5	7	10	0	15	0	16	0	10	0	0
12	12	10	14	8	0	0	0	10	9	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	11	0	6	10	0	0	0	11	0	0	0	0
5	10	5	6	6	0	0	0	9	0	9	0	0	0	0	0	0	0	0	0	11	0	0	10	0	0	0	7	0	0	0	0

Tabla A23: Repeticiones de elongación de hipocótilo

0				0.01				0.1				1				2				4				6				10				
R1	R2	R3	R4	R1	R1	R2	R4	R2	R3	R4	R3	R4	R1	R2	R3	R4																
46	43	42	42	49	50	48	46	48	48	46	48	48	49	47	47	48	46	46	47	46	48	50	46	49	46	45	50	38	37	32	32	
42	42	42	42	48	49	48	43	47	45	44	46	47	48	47	47	47	46	46	45	44	45	48	44	48	45	43	48	38	37	32	30	
41	41	41	41	48	47	47	42	47	45	43	44	47	46	47	46	47	45	45	43	44	43	48	43	47	45	42	46	36	36	30	28	
41	40	41	41	44	44	47	42	45	45	43	44	45	44	47	47	47	42	42	42	43	42	46	41	44	45	42	46	32	32	30	28	
41	36	41	41	42	44	46	41	45	43	43	42	44	44	46	46	46	42	42	42	40	42	45	40	43	44	42	46	28	32	30	25	
41	36	41	38	42	43	45	39	43	41	40	42	44	43	45	45	45	41	41	41	40	41	40	39	43	44	41	45	28	30	28	25	
40	36	40	36	41	40	42	37	41	40	38	40	44	41	42	42	42	39	39	39	39	41	40	39	38	43	40	44	27	30	26	24	
38	36	40	36	40	40	42	35	37	38	38	40	42	40	38	40	40	39	38	38	39	40	39	39	38	43	40	43	27	30	25	23	
37	35	40	35	40	38	42	34	35	35	38	40	42	36	37	39	40	35	35	35	39	39	38	39	38	41	40	42	26	30	24	23	
37	35	38	35	40	36	40	32	35	35	38	39	40	36	34	38	39	35	35	35	38	39	37	38	33	40	38	42	26	28	21	22	
36	35	37	35	37	34	38	31	35	35	36	37	38	34	32	36	37	34	34	34	38	38	34	37	33	40	35	37	25	28	0	21	
36	35	36	35	35	33	38	29	35	34	36	36	36	32	31	34	36	32	32	31	36	36	34	37	33	38	33	35	25	28	0	21	
36	35	33	35	35	32	35	27	34	34	36	35	34	32	29	31	35	30	30	30	36	35	34	34	32	31	32	32	25	28	0	0	
36	35	33	34	34	32	32	26	33	33	35	32	30	32	28	28	28	30	27	30	35	32	34	34	32	28	28	31	23	28	0	0	
36	35	33	32	29	30	27	26	33	32	33	30	28	30	26	25	25	28	25	25	32	32	30	32	30	24	28	30	21	25	0	0	
33	33	33	30	29	30	24	0	33	30	33	27	27	26	24	24	24	26	0	22	32	24	28	32	30	23	27	27	0	25	0	0	
28	32	30	28	24	0	23	0	24	28	25	25	26	0	0	21	22	22	0	0	32	22	24	32	28	23	0	23	0	25	0	0	
25	32	25	27	20	0	0	0	20	24	22	0	25	0	0	0	0	0	0	0	30	14	23	29	0	21	0	22	0	25	0	0	
25	24	19	25	20	0	0	0	20	20	16	0	0	0	0	0	0	0	0	22	0	18	29	0	0	0	22	0	0	0	0	0	
15	19	15	20	18	0	0	0	18	0	16	0	0	0	0	0	0	0	0	22	0	0	24	0	0	0	20	0	0	0	0	0	

Anexo 13. Pruebas estadísticas del ensayo de toxicidad aguda

1) Análisis Probit de germinación

Análisis de Probit: Muertos (m), Total (t) vs. Dilución (C)

Probit Analysis: m, T versus C

Distribution: Lognormal

Response Information

Variable	Value	Count
m	Event	242
	Non-event	478
T	Total	720

Estimation Method: Maximum Likelihood

Regression Table

Variable	Coef	Standard Error	Z	P
Constant	-1.44473	0.101795	-14.19	0.000
C	0.620334	0.0427920	14.50	0.000
Natural Response	0			

Log-Likelihood = -257.003

Goodness-of-Fit Tests

Method	Chi-Square	DF	P
Pearson	1569.85	7	0.000
Deviance	93.42	7	0.000

Tolerance Distribution

Parameter Estimates

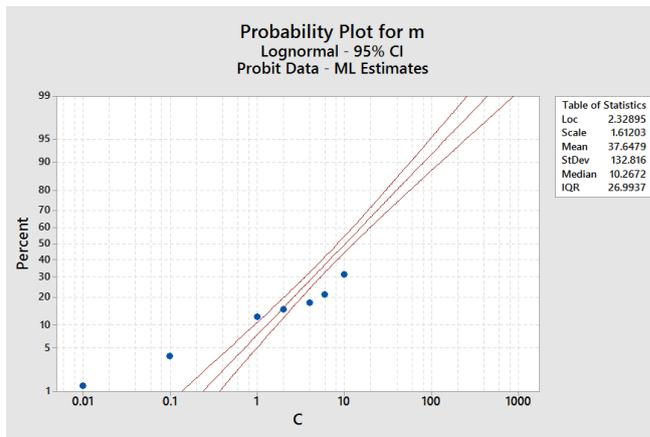
Parameter	Estimate	Standard Error	95.0% Normal CI	
			Lower	Upper
Location	2.32895	0.105458	2.12226	2.53565
Scale	1.61203	0.111201	1.40817	1.84541

Table of Percentiles

Percent	Percentile	Standard Error	95.0% Fiducial CI	
			Lower	Upper
1	0.241424	0.0600825	0.138245	0.372874
2	0.374651	0.0829811	0.228468	0.552310
3	0.495122	0.101277	0.313967	0.709259
4	0.610661	0.117302	0.398562	0.856566
5	0.724258	0.131942	0.483714	0.999111
6	0.837448	0.145647	0.570175	1.13939
7	0.951160	0.158688	0.658404	1.27890
8	1.06602	0.171243	0.748717	1.41866
9	1.18247	0.183441	0.841347	1.55938
10	1.30089	0.195378	0.936483	1.70164
20	2.64383	0.313409	2.05499	3.28863
30	4.40879	0.460095	3.55978	5.38076
40	6.82469	0.687934	5.59542	8.33735

50	10.2672	1.08276	8.40290	12.7577
60	15.4461	1.80590	12.4477	19.7903
70	23.9101	3.22150	18.7433	32.0103
80	39.8720	6.39298	29.9758	56.7293
90	81.0329	16.2682	56.9311	126.674
91	89.1476	18.4073	62.0294	141.214
92	98.8866	21.0384	68.0793	158.925
93	110.828	24.3500	75.4054	180.996
94	125.876	28.6433	84.5117	209.318
95	145.549	34.4331	96.2319	247.105
96	172.624	42.6853	112.073	300.362
97	212.907	55.4733	135.131	381.909
98	281.368	78.3296	173.225	525.757
99	436.637	133.979	256.042	870.728

Probability Plot for m



2) Prueba de Dunnet para Radícula

One-way ANOVA: 0, 0.01, 0.1, 1, 2, 4, 6, 10, 50

Method

Null hypothesis All means are equal
 Alternative hypothesis At least one mean is different
 Significance level $\alpha = 0.05$

Equal variances were assumed for the analysis.

Factor Information

Factor	Levels	Values
Factor	9	0, 0.01, 0.1, 1, 2, 4, 6, 10, 50

Analysis of Variance

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Factor	8	27911	3488.87	61.72	0.000
Error	711	40192	56.53		
Total	719	68103			

Model Summary

S	R-sq	R-sq(adj)	R-sq(pred)
7.51860	40.98%	40.32%	39.48%

Means

Factor	N	Mean	StDev	95% CI
0	80	18.988	6.271	(17.337, 20.638)
0.01	80	19.425	6.991	(17.775, 21.075)
0.1	80	19.300	7.487	(17.650, 20.950)
1	80	18.775	8.437	(17.125, 20.425)
2	80	18.94	9.67	(17.29, 20.59)
4	80	16.325	8.881	(14.675, 17.975)
6	80	15.00	8.95	(13.35, 16.65)
10	80	8.800	6.395	(7.150, 10.450)
50	80	0.000000	0.000000	(-1.650364, 1.650364)

Pooled StDev = 7.51860

Dunnett Multiple Comparisons with a Control

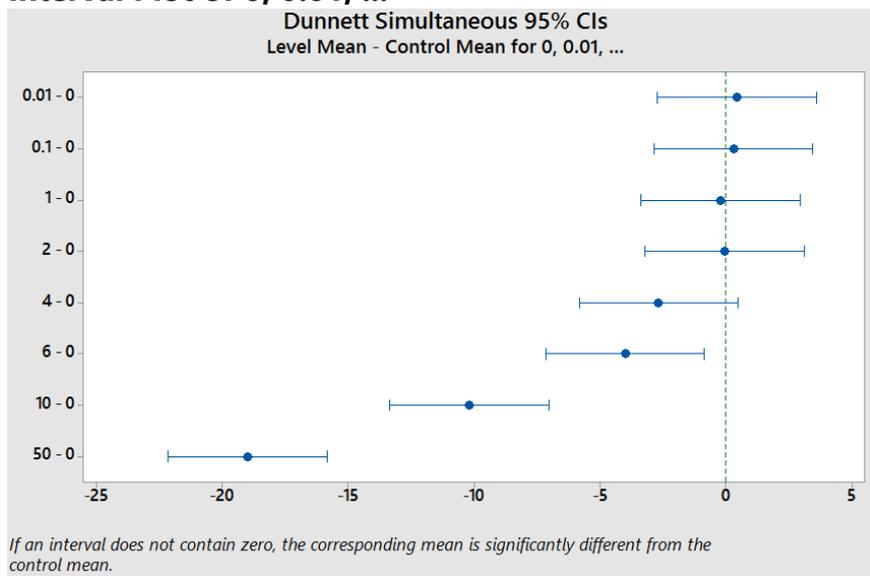
Grouping Information Using the Dunnett Method and 95% Confidence

Factor	N	Mean	Grouping
0 (control)	80	18.988	A
0.01	80	19.425	A
0.1	80	19.300	A
2	80	18.94	A
1	80	18.775	A
4	80	16.325	A
6	80	15.00	
10	80	8.800	
50	80	0.000000	

Means not labeled with the letter A are significantly different from the control level mean.

Dunnett Simultaneous 95% CIs

Interval Plot of 0, 0.01, ...



3) Prueba de Dunnet Hipocótilo

One-way ANOVA: 0_1, 0.01_1, 0.1_1, 1_1, 2_1, 4_1, 6_1, 10_1, 50_1

Method

Null hypothesis All means are equal
Alternative hypothesis At least one mean is different
Significance level $\alpha = 0.05$

Equal variances were assumed for the analysis.

Factor Information

Factor Levels Values
Factor 9 0_1, 0.01_1, 0.1_1, 1_1, 2_1, 4_1, 6_1, 10_1, 50_1

Analysis of Variance

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Factor	8	85091	10636.4	69.71	0.000
Error	711	108488	152.6		
Total	719	193580			

Model Summary

S	R-sq	R-sq(adj)	R-sq(pred)
12.3526	43.96%	43.33%	42.53%

Means

Factor	N	Mean	StDev	95% CI
0_1	80	34.913	6.568	(32.201, 37.624)
0.01_1	80	35.09	9.49	(32.38, 37.80)
0.1_1	80	34.98	10.05	(32.26, 37.69)
1_1	80	32.88	14.03	(30.16, 35.59)
2_1	80	32.75	15.38	(30.04, 35.46)
4_1	80	31.21	16.23	(28.50, 33.92)
6_1	80	28.48	16.08	(25.76, 31.19)
10_1	80	19.24	13.56	(16.53, 21.95)
50_1	80	0.000000	0.000000	(-2.711438, 2.711438)

Pooled StDev = 12.3526

Dunnett Multiple Comparisons with a Control

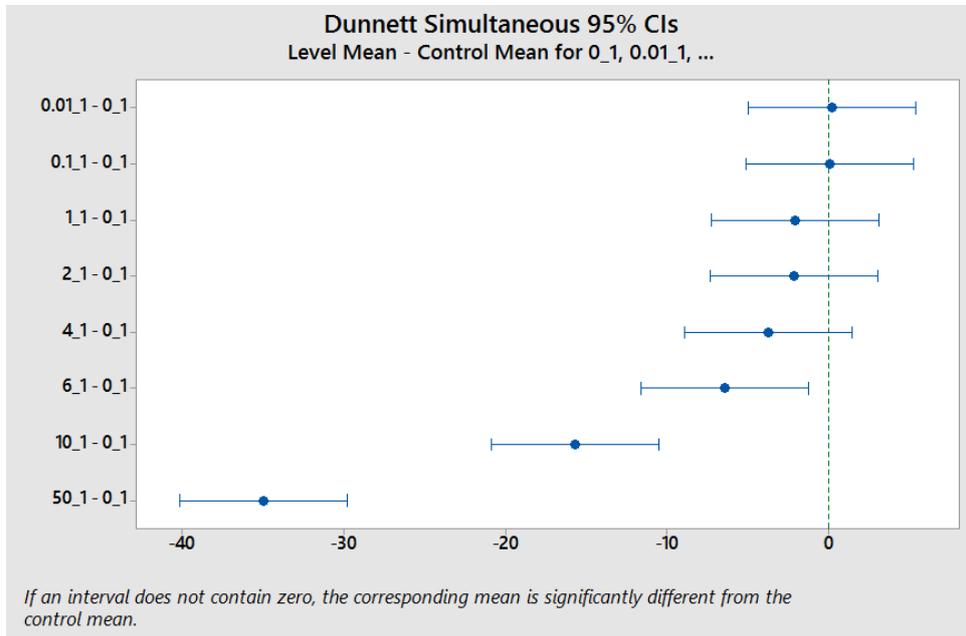
Grouping Information Using the Dunnett Method and 95% Confidence

Factor	N	Mean	Grouping
0_1 (control)	80	34.913	A
0.01_1	80	35.09	A
0.1_1	80	34.98	A
1_1	80	32.88	A
2_1	80	32.75	A
4_1	80	31.21	A
6_1	80	28.48	
10_1	80	19.24	
50_1	80	0.000000	

Means not labeled with the letter A are significantly different from the control level mean.

Dunnett Simultaneous 95% CIs

Interval Plot of 0_1, 0.01_1, ...



Anexo 14. Cálculos del índice de germinación

Tabla A24: Porcentaje de germinación relativa

Conc	R1	R2	R3	R4	Prom
0.01	103.9	103.9	98.7	103.9	102.6
0.1	103.9	93.51	98.7	103.9	100
1	88.31	93.51	83.12	98.7	90.91
2	83.12	88.31	88.31	93.51	88.31
4	83.12	83.12	88.31	88.31	85.71
6	88.31	77.92	83.12	77.92	81.82
10	77.92	83.12	51.95	62.34	68.83
100	0	0	0	0	0

Tabla A25: Crecimiento de radícula relativa

Conc	R1	R2	R3	R4	Prom
0.01	99.48	100.3	96.66	102	99.61
0.1	104.1	102.6	103.1	101.5	102.8
1	108.9	107.7	109.3	112	109.5
2	116.7	114.6	114.6	111.4	114.3
4	102.6	100.3	102.3	100.8	101.5
6	96.83	97.43	97.43	99.14	97.71
10	63.93	63.53	69.74	67.52	66.18
100	0	0	0	0	0

Tabla A26: Porcentaje de germinación relativa

Conc	R1	R2	R3	R4	Prom
0.01	103.4	104.2	95.408	106.02	102.233
0.1	108.2	95.9	101.76	105.49	102.83
1	96.17	100.7	90.839	110.55	98.8296
2	96.97	101.2	101.2	104.16	96.97
4	85.25	83.38	90.31	88.975	85.25
6	85.51	75.92	80.98	77.253	85.51
10	49.82	52.8	36.229	42.09	45.2347
100	0	0	0	0	0

Anexo 15. Registro fotográfico

Figura A10: Configuración de determinación de AME instalada



Figura A11: Elaboración de la mezcla de excretas de cerdo, melaza y rastrojo de arroz



Figura A12: Almacenado y ensilaje de excretas de cerdo, melaza y rastrojo de arroz



Figura A13: Comparación del día 0 y el día 28 de los frascos de la etapa laboratorio



Figura A14: Configuración del equipo para desplazamiento de volúmenes



Figura A15: Producción de biogás en etapa piloto



Figura A16: Medición de composición del biogás



Figura A17: Brotes de semillas de *Lactuca sativa* con dilución de biol de 1 por ciento

