



Universidad de Concepción
Dirección de Postgrado
Facultad de Agronomía
Programa de Magíster en Ciencias Agronómicas

BIOCARBÓN COMO ESTRATEGIA NUTRICIONAL PARA LA MITIGACIÓN DEL IMPACTO AMBIENTAL EN AVES DE POSTURA BAJO SISTEMA TRADICIONAL

Tesis para optar al grado de Magíster en Ciencias Agronómicas

DIEGO IGNACIO NICOLÁS FIGUEROA ARAVENA
CHILLÁN-CHILE
2023

Profesor Guía: Pamela Williams
Dpto. de Producción Animal
Facultad de Agronomía
Universidad de Concepción

Esta tesis ha sido realizada en el Departamento de Producción Animal de la Facultad Agronomía, Universidad de Concepción.

Profesora Guía

Dra. Pamela Williams Salinas
Facultad de Agronomía
Universidad de Concepción

Comisión Evaluadora

Dra. Valeria Velasco Pizarro
Facultad de Agronomía
Universidad de Concepción

Dra. Cristina Muñoz Vargas
Facultad de Agronomía
Universidad de Concepción

Dr. Marcelo Doussoulin Guzmán
Facultad de Agronomía
Universidad de Concepción

Dra. Cristina Segura Castillo
Unidad de Desarrollo Tecnológico
Universidad de Concepción

Director de Programa

Dra. Marisol Vargas Concha
Facultad de Agronomía
Universidad de Concepción

AGRADECIMIENTOS

Esta investigación fue financiada por el Proyecto FIC: Biocarbón, el diamante de Ñuble para la avicultura (BIP 40032586-0). Mención a la Facultad de Agronomía por la beca de articulación que me permitió cubrir mis estudios.

Agradezco a mi madre Maribel por su soporte y paciencia. A mi hermano Alexander y novia Jennifer por animarme directa o indirectamente en el día a día.

A mi profesora guía, Dra. Pamela Williams quien desde el pregrado me dio su apoyo y confió en mí para llevar adelante esta investigación.

A quienes me orientaron en los trabajos de laboratorio, en especial a Janicia, Constanza, Tamara y la profesora Valeria.

El grueso de la fase experimental de esta tesis se llevó a cabo en el año 2022, período donde conviví con los y las jóvenes de la residencia universitaria UdeC Chillán, a ellos y ellas mis mejores deseos por darme la felicidad que me permitía dar el máximo.

TABLA DE CONTENIDOS

	Página
Índice de figuras y tablas capítulo 2	vi
Índice de figuras y tablas capítulo 3	vii
Resumen	viii
Summary	ix
Capítulo 1. Introducción general	1
Hipótesis	5
Objetivo general	5
Objetivos específicos	6
Referencias	7
Capítulo 2. Effect of wheat straw and hazelnut shell biochar on bacteria associated with the egg industry	13
Abstract	14
Introduction	15
Materials and methods	16
Results	20
Discussion	22
Conclusions	26
References	27
Capítulo 3. Inclusión de biocarbón de paja de trigo y cáscara de avellana en dieta de aves de postura y su efecto en parámetros productivos y ambientales	38

Introducción	38
Hipótesis	40
Objetivo general	40
Objetivos específicos	40
Materiales y métodos	41
Resultados	47
Discusión	53
Conclusiones	57
Referencias	59
Conclusiones generales	63

ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS, CAPÍTULO 2

		Pagina
Figure 1	Dendrogram representing the relationships between different poultry diets, based on microbiome obtained with 16S DNA sequencing, recovered from the poultry' cloaca.	32
Figure 2	Relative abundance of different species of bacteria in treatments	33
Table 1	Description of <i>in vitro</i> and <i>in vivo</i> treatments	34
Table 2	Physicochemical, gravimetric, and elemental characteristics of wheat straw and hazelnut shell biochars obtained at 500 and 700°C	35
Table 3	Bacterial strains growth at different incubation times	36
Table 4	Effect of biochar on the growth of <i>Salmonella enterica</i> with biochar separation and without biochar separation	37

ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS, CAPÍTULO 3

		Página
Tabla 1	Caracterización fisicoquímica de los biocarbones	42
Tabla 2	Caracterización gravimétrica y elemental de los biocarbones	42
Tabla 3	Tratamientos considerados en el experimento con las aves de postura	43
Tabla 4	Ingredientes que componen la dieta base	44
Tabla 5	Contenido nutricional de la dieta base (g 100g ⁻¹)	44
Tabla 6	Parámetros de producción de las aves de postura Hy-Line sometidas a 3 concentraciones de biocarbón obtenidos de paja de trigo y cáscara de avellana europea a 700°C.	48
Tabla 7	Atributos de calidad de huevos de aves de postura Hy-Line sometidas a 3 concentraciones de biocarbón obtenidos de paja de trigo y cascara de avellana europea a 700°C	50
Tabla 8	Materia seca (%), Nitrógeno amoniacal (g/kg MS) y metano (mg/g MS) de las excretas de aves de postura Hy-Line sometidas a 3 concentraciones de biocarbón obtenidos de paja de trigo y cascara de avellana europea a 700°C	52
Figura 1	Emanaciones de nitrógeno amoniacal desde las excretas de las aves alimentadas con las dietas experimentales en un total de seis semanas	53
Figura 2	Emanaciones de metano desde las excretas de las aves alimentadas con las dietas experimentales producto de las incubaciones a 6, 24 y 48 h	54

RESUMEN

A pesar de los avances científicos y tecnológicos en la avicultura, rubro que provee proteína de origen animal a la población, aún hay desafíos que requieren ser investigados. En la presente tesis se realizaron dos estudios orientados al uso de biocarbón en aves de postura y en bacterias relacionadas a éstas. El primer estudio fue un trabajo *in vitro*, en donde las cepas bacterianas: *Salmonella enterica*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Enterococcus faecalis* fueron cultivadas en un medio de crecimiento, al cual se le incorporó biocarbón de paja de trigo y de cáscara de avellana europea producidos por pirólisis de 500 y 700°C. Se realizó un conteo de las unidades formadoras de colonias a las 24, 48 y 72 h de incubación. Además, para apreciar que ocurre con la población bacteriana a nivel gastrointestinal de las aves se realizó una secuenciación de ADN 16S a muestras obtenidas de la cloaca de aves, a las cuales se les dio biocarbón como aditivo dietario. En gran parte del conteo bacteriano realizado, no se obtuvieron diferencias con el control, pero a las 72 h de incubación se apreciaron aumentos en la población bacteriana de *E. faecalis* y disminuciones en la población de *S. aureus*. La secuenciación de ADN 16S permite inferir que el biocarbón no causa un disturbio en la normal microflora intestinal de las aves de postura. Por otro lado, el segundo estudio fue un trabajo *in vivo*, en donde se trabajó con aves de postura de la línea genética Hy-line, a las cuales se les dio biocarbón como aditivo dietario en dosis de 0,3; 1; y 2% para analizar el efecto que se produce en parámetros de producción, de calidad de huevo y de calidad de excreta. Se obtuvo que estos biocarbones no causaron un efecto significativo y constante en parámetros productivos y de calidad de huevo, mientras que en calidad de excreta se destacó el efecto causado por biocarbón de paja de trigo en la disminución de la emanación de nitrógeno amoniacal. En su conjunto, este estudio tiene un alto valor al realizar un estudio *in vitro* e *in vivo* sobre el tema en cuestión, estableciendo una sólida base para continuar investigando sobre biocarbón como estrategia de mitigación de problemas ambientales de aves de postura.

SUMMARY

Despite scientific and technological advances in poultry farming, industry that provides animal protein to the population, there are still challenges that need to be investigated. In the present thesis, two studies were carried out oriented to the use of biochar in laying hens and in bacteria related. The first study was an *in vitro* work in which *Salmonella enterica*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* and *Enterococcus faecalis* bacterial strains were cultured in a growth medium to which wheat straw and European hazelnut shell biochar produced at 500 and 700°C in the pyrolysis process. Colony forming units were counted at 24, 48 and 72 h of incubation. In addition, to appreciate the bacterial population at the gastrointestinal level of the poultry, 16S DNA sequencing was performed on samples obtained from the cloaca of poultry fed biochar as a dietary additive. In most of the bacterial counts performed, no differences were obtained with the control, but at 72 h of incubation, it is highlighted that there are increases in the bacterial population of *E. faecalis* and decreases in the population of *S. aureus*. The 16S DNA sequencing allows inferring that biochar does not cause a disturbance in the normal intestinal microflora of laying hens. On the other hand, the second study was an *in vivo*, in which Hy-line laying hens were given biochar as a dietary additive in doses of 0,3; 1; and 2% to analyze the effect produced on production parameters, egg quality and excreta quality. It was obtained that these biochars did not cause a significant and constant effect on production and egg quality parameters, while in excreta quality, the effect caused by wheat straw biochar in the reduction of ammonia nitrogen emanation was highlighted. This is a valuable study because by performing an *in vitro* and *in vivo* study on the subject in question, establishing a solid basis for further research on biochar as a strategy to mitigate environmental impact of laying hens.

CAPÍTULO 1

INTRODUCCION GENERAL

El amoníaco (NH_3) representa una fuente importante de pérdida de nitrógeno en las producciones animales, lo cual ha tenido un impacto directo como agente contaminante de los ecosistemas (FAO, 2001). La Unión Europea elaboró un listado con todas las fuentes importantes de amoníaco dentro de su territorio, en el cual la producción avícola a través de las excretas generadas se ubica en el octavo puesto con $9,2 \times 10^4 \text{ t NH}_3 \text{ año}^{-1}$ (EEA, 2020).

El metano (CH_4) también es considerado un importante contaminante ambiental, ya que su capacidad de calentamiento global es de entre veintiocho a ochenta veces más que el CO_2 (Ming et al., 2021). En la producción de biogás se indica que de un kilo de excreta de aves se produce $0,5 \text{ m}^3$ de biogás, del cual un 58 % aproximadamente corresponde a metano (Fuchs et al., 2018).

Las excretas de las aves al tener una humedad cercana a un 70 % (Li et al., 2021) dificulta el manejo a los productores, debido a lo cual se generan consecuencias como la contaminación de suelos y napas subterráneas, además de la contaminación del aire por la emisión de gases de efecto invernadero como dióxido de carbono, metano (Lee et al., 2020) y nitrógeno amoniaco (Wongkiew et al., 2021).

En las aves de postura y pollos de carne el tracto intestinal, urinario y reproductivo se unen en la cloaca, y por tanto, es allí donde confluyen las fecas y la orina. Por esta disposición interna de los órganos, es que la orina puede llegar al ciego, y los microorganismos que se encuentran ahí tienen la capacidad de convertir el ácido úrico en amoníaco, el cual se pierde en la defecación (Qamar et al., 2021). Otros gases como el metano y dióxido de carbono son producto de la descomposición de los desechos excretados por acción de bacterias anaeróbicas (El-Dakar et al., 2021). Estos gases generan contaminación que afecta a los operarios avícolas, asentamientos humanos en las cercanías del plantel, pero también perturba

indirectamente la producción, por ser causal de enfermedades respiratorias que pueden contraer las aves con eventual muerte de éstas (Shi et al., 2019).

Para enfrentar el problema medioambiental, los productores han adoptado diversas técnicas de valorización de las excretas como, por ejemplo: uso de las excretas en la alimentación de rumiantes, lo cual es una buena opción como economía circular, pero conlleva el riesgo de que pueda contener agentes patógenos o sustancias potencialmente dañinas (Han et al., 2018). Otra posibilidad es la utilización de las excretas para la obtención de energía a través de un biodigestor, el cual somete los desechos de las aves a un proceso de digestión anaeróbica obteniendo energía eléctrica y/o térmica (Yao et al., 2020). El uso de los residuos para la obtención de energía es bastante beneficioso, pero dado el costo y la realidad de los productores avícolas, quienes tienen diverso nivel tecnológico (Ebsa et al., 2019), no es un método que pueda ser aplicable por la mayoría de éstos. Con las excretas de las aves de postura también se pueden realizar enmiendas de suelo, ya que éstas poseen micro- y macro-nutrientes útiles para las plantas (Minkina et al., 2022).

Sumado a la problemática medio ambiental que generan las excretas de las aves, también hay una necesidad de mejorar la eficiencia productiva por parte de los plantales avícolas, dado que ser ineficiente implica que parte de los insumos no se están aprovechando de la mejor forma, afectando así la economía del plantel. Un ejemplo es el nitrógeno, ya que cerca del 50 % de este nutriente que está presente en la dieta de las aves se pierde en las excretas como ácido úrico o amoníaco, lo cual significa que se está perdiendo el nitrógeno que fue digerido y metabolizado por el ave, pero no será utilizado como componente proteico o aminoacídico de la carne de pollo o huevos (Fuchs et al., 2018). Es por esto que se establece una relación entre la eficiencia productiva y la contaminación generada.

La eficiencia productiva también depende de lo que ocurre a nivel de tracto digestivo del ave, es decir, de la presencia de microorganismos, ya sea patógenos o benéficos. Los microorganismos patógenos pueden afectar la eficiencia del

sistema productivo, debido a que comprometen la salud del ave o en su defecto la salud del consumidor. Entre los que más se ha reportado están: *Salmonella entérica*; *Campylobacter jejuni*; *Escherichia coli*; y *Staphylococcus aureus* (Clavijo y Flórez, 2018; Kosecka et al., 2021). Por otro lado, los microorganismos benéficos como *Enterococcus* y *Lactobacillus* se describen como “protectoras” del ave, controlando la propagación de los patógenos (Mahmood y Guo, 2020; Yoon et al., 2020).

Ante la falta de soluciones factibles a la problemática planteada, actualmente hay diversas investigaciones acerca del uso de aditivos, ya sea dietarios o aplicados sobre la misma excreta. Entre los más destacados y recientes está: el uso de péptidos antimicrobianos como estrategia para prevenir el desarrollo de microorganismos patógenos resistentes (Silveira et al., 2021); zeolita como aditivo dietario para retener el nitrógeno, evitando así la formación de subproductos como nitrito (NO_2^-) y óxido nitroso (N_2O) (Zeng et al., 2021); y flavonoides como aditivo dietario para mejorar la eficiencia productiva e inmunidad frente a patógenos (Zhou et al., 2019). Las razones del por qué estos y otros aditivos no han solucionado la problemática planteada son múltiples, entre las cuales se encuentran: la complejidad de producirlos a gran escala, falta de investigación, materia prima proveniente de recursos no renovables, entre otros.

Un insumo aún incipiente en el uso como aditivo dietario es el biocarbón, del cual se tiene información principalmente por su uso en enmiendas al suelo con el fin de recuperar aquellos que se encuentran degradados (Muñoz et al., 2016).

El biocarbón es un producto sólido, de color negro y particulado que se obtiene a partir de biomasa de origen vegetal como los subproductos agrícolas o forestales, y de origen animal como las excretas. La biomasa pasa por un proceso llamado pirólisis (descomposición térmica de la biomasa) en ausencia de oxígeno (Jayakumar et al., 2021a). El tamaño de la partícula de biocarbón está inversamente relacionado con la temperatura y velocidad de reacción, es decir, las altas temperaturas de calentamiento alcanzadas y una rápida velocidad producen

partículas más pequeñas, mientras que, bajas temperaturas y velocidades de calentamiento producen partículas de biocarbón más grandes (Zhang et al., 2021). A través de este proceso, se puede valorizar residuos de cultivos, de frutales y agroindustriales, que permite generar sistemas agropecuarios sustentables y otorgar circularidad a los mismos (Hu et al., 2021).

La poca evidencia del uso de biocarbón como aditivo dietario muestra resultados beneficiosos para las producciones ganaderas, como por ejemplo: el aumento del peso corporal y disminución de las emisiones de metano y dióxido de carbono en rumiantes (bovinos y caprinos); aumento del peso corporal en cerdos; aumento del peso de los huevos como también disminución de los patógenos y del índice de conversión alimenticia en aves (Man et al., 2021). Sin embargo, no queda claro si hay efectos benéficos en la disminución de los malos olores que emanan de estos planteles productivos ni la forma de acción de este producto. Además, hay una falta de información en la caracterización del biocarbón utilizado en los estudios previos orientados a la producción animal.

Existen varios tipos de biocarbón y sus propiedades como el área superficial; microporosidad; e hidrofobia pueden variar dependiendo del material de origen y la temperatura que alcanza el proceso de pirólisis. Por ejemplo, el biocarbón producido de excretas de animales exhibe menor área superficial específica comparado con el biocarbón proveniente de los residuos de cultivo y de madera de árboles forestales (Hossain et al., 2021; Jayakumar et al., 2021b).

En Chile se generan diversos tipos de residuos como consecuencia de las producciones agrícolas existentes, los cuales pueden potencialmente ser utilizados como materia prima para la producción de biocarbón. Así por ejemplo en la Región del Ñuble, la producción de trigo alcanza 51.349 toneladas en 7.133 hectáreas aproximadamente (García, 2019); y la producción de árboles frutales tiene una superficie de 14.184 hectáreas aproximadamente (Larrañaga, 2020). Considerando que el trigo posee un índice de cosecha cercano a 0,5 (Campoy et al., 2020) se tendría un potencial de 25.674 toneladas de biomasa disponible sólo

en dicha región y, además, los árboles frutales por las constantes podas que se realizan también son una potencial fuente de biomasa.

Planteado lo anterior, hace falta avanzar en la caracterización y propiedades de biocarbón proveniente de residuos agroindustriales ya que, en la información disponible, por lo general, se utiliza residuos forestales como materia prima de biocarbón.

Hay evidencias de biocarbón como potencial secuestrador o mitigador, por ejemplo: de carbono, para evitar pérdidas en forma de dióxido de carbono (Yang et al., 2021); de bacterias (Song et al., 2021); de fósforo y calcio, en forma de los compuestos $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{OH})$ y CaHPO_4 , respectivamente (Wang et al., 2021); de nitrógeno, evitando la formación de subproductos como el óxido nitroso (N_2O) por la acción de bacterias que colonizan el biocarbón (Liao et al., 2021).

Estos antecedentes dejan en claro una potencial utilidad del biocarbón que aún no ha sido explorada en profundidad y menos desde un enfoque sustentable en las producciones avícolas, con menos impacto al medio ambiente.

HIPÓTESIS

La utilización de biocarbón como aditivo dietario en aves de postura disminuye el nitrógeno y metano en heces y, además reduce los microorganismos patógenos en el tracto digestivo de gallinas ponedoras de sistemas tradicionales.

OBJETIVO GENERAL

Evaluar el uso de biocarbón como estrategia nutricional para la mitigación del impacto ambiental y mejora del sistema productivo de aves de postura bajo sistema tradicional.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Comparar el biocarbón proveniente de la paja de trigo con biocarbón proveniente cáscara de avellana europea sobre parámetros productivos y ambientales en aves.
- Evaluar la capacidad de biocarbón como inhibidor de microorganismos patógenos y promotor de microorganismos benéficos de gallinas ponedoras en sistemas tradicionales.
- Evaluar el efecto de biocarbón en la estabilidad de las excretas generadas y en las pérdidas de nitrógeno y metano entérico de gallinas ponedoras de sistema tradicional.
- Evaluar cantidades de biocarbón en la dieta que permita mejorar la eficiencia productiva de las aves de postura.

REFERENCIAS

Campoy, J., Campos, I., Plaza, C., Calera, M., Bodas, V., Calera, A. 2020. Estimation of harvest index in wheat crops using a remote sensing-based approach. *Field Crops Research*, 256, 107910. doi:<https://doi.org/10.1016/j.fcr.2020.107910>.

Clavijo, V., Flórez, M. 2018. The gastrointestinal microbiome and its association with the control of pathogens in broiler chicken production: A review. *Poultry Science*, 97(3), 1006-1021. doi:<https://doi.org/10.3382/ps/pex359>.

Ebsa, Y., Harpal, S., Negia, G. 2019. Challenges and chicken production status of poultry producers in Bishoftu, Ethiopia. *Poultry Science*, 98(11), 5452-5455. doi:<https://doi.org/10.3382/ps/pez343>.

EEA (European Environment Agency). 2020. National emissions reported to the convention on long-range transboundary air pollution (LRTAP convention) (database). Retrieved December 12, 2018, from <https://www.eea.europa.eu/data-and-maps/data/national-emissions-reported-to-the-convention-on-long-range-transboundary-air-pollution-lrtap-convention-14>.

El-Dakar, M. A., Ramzy, R. R., Plath, M., Ji, H. 2021. Evaluating the impact of bird manure vs. mammal manure on *Hermetia illucens* larvae. *Journal of Cleaner Production*, 278, 123570. doi:<https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2020.123570>.

FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura). 2001. Global estimates of gaseous emissions of NH₃, NO and N₂O from agricultural land. Rome. Recuperado de http://www.fao.org/3/Y2780E/y2780e00.htm#P-1_0.

Fuchs, W., Wang, X., Gabauer, W., Ortner, M., Li, Z. 2018. Tackling ammonia inhibition for efficient biogas production from chicken manure: Status and technical trends in Europe and China. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 97, 186-199. doi:<https://doi.org/10.1016/j.rser.2018.08.038>.

García, A. 2019. Cereales: producción, precios y comercio exterior de trigo, maíz y arroz. Oficina de Estudios y Políticas Agrarias (Odepa) del Ministerio de Agricultura, Gobierno de Chile.

Han, T., Wang, L., Zhang, Y., Zhang, J., Han, D., Lv, N., . . . Wang, M. 2018. The changes of nutrient composition of piled laying hen manure and anaerobic fermentation for recycling as a dietary ingredient for ruminants. *Journal of Environmental Management*, 206, 768-773. doi:<https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2017.11.025>.

Hossain, M. Z., Bahar, M. M., Sarkar, B., Donne, S. W., Wade, P., Bolan, N. 2021. Assessment of the fertilizer potential of biochars produced from slow pyrolysis of biosolid and animal manures. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*, 155, 105043. doi:<https://doi.org/10.1016/j.jaap.2021.105043>

Hu, Q., Jung, J., Chen, D., Leong, K., Song, S., Li, F., Mohan, B. C., Yao, Z., Prabhakar, A. K., Lin, X. H., Lim, E. Y., Zhang, L., Souradeep, G., Ok, Y. S., Kua, H. W., Li, S. F. Y., Tan, H. T. W., Dai, Y., Tong, Y. W., ... Wang, C. H. 2021. Biochar industry to circular economy. *Science of The Total Environment*, 757, 143820. <https://doi.org/10.1016/J.SCITOTENV.2020.143820>

Jayakumar, A., Wurzer, C., Soldatou, S., Edwards, C., Lawton, L. A., Mašek, O. 2021a. New directions and challenges in engineering biologically-enhanced

biochar for biological water treatment. *Science of The Total Environment*, 796, 148977. doi:<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.148977>.

Jayakumar, A., Wurzer, C., Soldatou, S., Edwards, C., Lawton, L. A., Mašek, O. 2021b. New directions and challenges in engineering biologically-enhanced biochar for biological water treatment. *Science of The Total Environment*, 796, 148977. doi:<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.148977>.

Kosecka, M., Trzeciak, J., Homa, J., Trzeciak, K., Władyka, B., Trela, M., . . . Lis, M. W. 2021. Effect of *Staphylococcus aureus* infection on the heat stress protein 70 (HSP70) level in chicken embryo tissues. *Poultry Science*, 100(6), 101119. doi:<https://doi.org/10.1016/j.psj.2021.101119>.

Larrañaga, P. 2020. Catastro frutícola Valparaíso 2020. Publicación conjunta de la Oficina de Estudios y Políticas Agrarias, ODEPA, y el Centro de Información de Recursos Naturales, CIREN. Santiago, Chile.

Lee, D., Jung, S., Jang, Y., Jo, G., Park, S., Jeon, Y. J., . . . Kwon, E. 2020. Offering a new option to valorize hen manure by CO₂-assisted catalytic pyrolysis over biochar and metal catalysts. *Journal of CO₂ Utilization*, 42, 101344. doi:<https://doi.org/10.1016/j.jcou.2020.101344>.

Li, M.-X., He, X.-S., Tang, J., Li, X., Zhao, R., Tao, Y.-Q., . . . Qiu, Z.-P. 2021. Influence of moisture content on chicken manure stabilization during microbial agent-enhanced composting. *Chemosphere*, 264, 128549. doi:<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.128549>

Liao, J., Hu, A., Zhao, Z., Liu, X., Jiang, C., Zhang, Z. 2021. Biochar with large specific surface area recruits N₂O-reducing microbes and mitigate N₂O emission.

Soil Biology and Biochemistry, 156, 108212.
doi:<https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2021.108212>.

Mahmood, T., Guo, Y. 2020. Dietary fiber and chicken microbiome interaction: Where will it lead to? *Animal Nutrition*, 6(1), 1-8.
doi:<https://doi.org/10.1016/j.aninu.2019.11.004>.

Man, K., Chow, K., Man, Y., Mo, W., Wong, M. 2021. Use of biochar as feed supplements for animal farming. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 51(2), 187-217. doi:10.1080/10643389.2020.1721980.

Ming, T., Richter, R., Dietrich Oeste, F., Tulip, R., Caillol, S. 2021. A nature-based negative emissions technology able to remove atmospheric methane and other greenhouse gases. *Atmospheric Pollution Research*, 12(5), 101035.
doi:<https://doi.org/10.1016/j.apr.2021.02.017>.

Minkina, T., Sushkova, S., Delegan, Y., Bren, A., Mazanko, M., Kocharovskaya, Y., Filonov, A., Rajput, V. D., Mandzhieva, S., Rudoy, D., Prazdnova, E. V, Elena, V., Zelenkova, G., Ranjan, A. 2022. Effect of chicken manure on soil microbial community diversity in poultry keeping areas. *Environmental Geochemistry and Health*. <https://doi.org/10.1007/s10653-022-01447-x>

Muñoz, C., Gongora, S., Zagal, E. 2016. Use of biochar as a soil amendment: a brief review. *Chilean Journal of Agricultural & Animal Sciences, ex Agro-Ciencia*, 32(Special Issue 1), 37-47.

Qamar, A., Waheed, J., Hamza, A., Mohyuddin, S., Lu, Z., Namula, L., . . . Chen, J. 2021. The role of intestinal microbiota in chicken health, intestinal physiology and immunity. *Journal of animal and plant sciences-japs*, 31(2), 342-351.

Shi, Q., Wang, W., Chen, M., Zhang, H., Xu, S. 2019. Ammonia induces Treg/Th1 imbalance with triggered NF- κ B pathway leading to chicken respiratory inflammation response. *Science of The Total Environment*, 659, 354-362. doi:<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.12.375>.

Silveira, R., Roque-Borda, C., Vicente, E. 2021. Antimicrobial peptides as a feed additive alternative to animal production, food safety and public health implications: An overview. *Animal Nutrition*. doi: <https://doi.org/10.1016/j.aninu.2021.01.004>.

Song, L., Niu, X., Zhang, N., Li, T. 2021. Effect of biochar-immobilized *Sphingomonas* sp. PJ2 on bioremediation of PAHs and bacterial community composition in saline soil. *Chemosphere*, 279, 130427. doi:<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.130427>.

Wang, Z., Miao, R., Ning, P., He, L., Guan, Q. 2021. From wastes to functions: A paper mill sludge-based calcium-containing porous biochar adsorbent for phosphorus removal. *Journal of Colloid and Interface Science*, 593, 434-446. doi:<https://doi.org/10.1016/j.jcis.2021.02.118>.

Wongkiew, S., Koottatep, T., Polprasert, C., Prombutara, P., Jinsart, W., Khanal, S. K. 2021. Bioponic system for nitrogen and phosphorus recovery from chicken manure: Evaluation of manure loading and microbial communities. *Waste Management*, 125, 67-76. doi:<https://doi.org/10.1016/j.wasman.2021.02.014>.

Yang, Q., Mašek, O., Zhao, L., Nan, H., Yu, S., Yin, J., . . . Cao, X. 2021. Country-level potential of carbon sequestration and environmental benefits by utilizing crop residues for biochar implementation. *Applied Energy*, 282, 116275. doi:<https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2020.116275>.

Yao, Y., Huang, G., An, C., Chen, X., Zhang, P., Xin, X., . . . Agnew, J. 2020. Anaerobic digestion of livestock manure in cold regions: Technological advancements and global impacts. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 119, 109494. doi:<https://doi.org/10.1016/j.rser.2019.109494>.

Yoon, S., Son, S., Kim, Y., Seo, K., Lee, Y. 2020. Molecular characteristics of *optrA*-carrying *Enterococcus faecalis* from chicken meat in South Korea. *Poultry Science*, 99(12), 6990-6996. doi:<https://doi.org/10.1016/j.psj.2020.08.062>.

Zeng, X., Hu, X., Song, H., Xia, G., Shen, Z., Yu, R., Moskovits, M. 2021. Microwave synthesis of zeolites and their related applications. *Microporous and Mesoporous Materials*, 323, 111262. doi:<https://doi.org/10.1016/j.micromeso.2021.111262>.

Zhang, J., Amonette, J. E., Flury, M. 2021. Effect of biochar and biochar particle size on plant-available water of sand, silt loam, and clay soil. *Soil and Tillage Research*, 212, 104992. doi:<https://doi.org/10.1016/j.still.2021.104992>.

Zhou, Y., Mao, S., Zhou, M. 2019. Effect of the flavonoid baicalein as a feed additive on the growth performance, immunity, and antioxidant capacity of broiler chickens. *Poultry Science*, 98(7), 2790-2799. doi:<https://doi.org/10.3382/ps/pez071>.

CAPÍTULO 2

Effect of wheat straw and hazelnut shell biochar on bacteria associated with the egg industry.

Authors: Diego Figueroa ¹, Valeria Velasco ¹, Marcelo Doussoulin ¹, Constanza Gutierrez-Gómez ¹, Cristina Segura ², Cristina Muñoz ³, Pamela Williams ^{1*}.

¹ Departamento de Producción Animal, Facultad de Agronomía, Universidad de Concepción, Av. Vicente Méndez 595, 3812120 Chillán, Chile

² Unidad de Desarrollo Tecnológico, UDT, Universidad de Concepción, Parque Industrial Coronel, Concepción, 3349001, Chile

³ Departamento de Suelos y Recursos Naturales, Facultad de Agronomía, Universidad de Concepción, Av. Vicente Méndez 595, 3812120 Chillán, Chile

* Corresponding Author: Pamela Williams, Departamento de Producción Animal, Facultad de Agronomía, Universidad de Concepción, Av. Vicente Méndez 595, 3812120 Chillan, Chile. pamelawilliams@udec.cl

Revista: Journal of Applied Microbiology - Oxford Academic

Fecha de envío: 20 de septiembre 2023

Abstract

Aims: Biochar is obtained from agro-industry byproducts. Biochar could be added in the diet of laying hens, changing the intestinal microbiome, improving production and environmental parameters. The objective of this study was to determine the characteristics of different biochars and their effect on bacteria associated with the egg industry.

Methods and results: Biochar was obtained from wheat straw and hazelnut shell using two process temperature (500 and 700 °C). The *in vitro* effect of these biochars was evaluated on the microbial growth of *Salmonella enterica*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* and *Enterococcus faecalis* (concentrations of 0.1, 0.4, and 1% at 24, 48, and 72 hours of incubation). Microbiome DNA 16S sequencing of poultry cloacal samples was performed. In general, for *S. enterica* and *E. coli* there was not affected, *S. aureus* decreased population and *E. faecalis* increased population. 16S DNA sequencing suggested that biochar does not disturb the normal gastrointestinal microflora of poultry.

Conclusions: This study shows progress on the effect of biochar on important bacteria in the egg industry, mainly in benefic bacteria.

Significance and Impact of Study: Is necessary to extend the study to other biochars and their effect on productive and environmental parameters.

Keywords: Pyrolysis; pathogenic bacteria; beneficial bacteria; *in vitro*.

Introduction

Globally, egg production has increased from 14 million tons per year in 1961, with an increasing trend in the following decades, reaching 86 million tons per year in 2020 (FAO). This is due to the high biological value of egg protein, which is considered qualitatively superior to those of meat and fish. Indeed, it provides an optimal proportion of all essential amino acids (Puglisi and Fernandez 2022). In addition, eggs are a cheap source of vitamins and minerals in people's basic nutrition (Miranda *et al.* 2015).

Since the 1940s, antibiotics were used in poultry farming as growth promoters, to control pathogens or to prevent the occurrence of diseases. However, despite the benefit of this practice, there were negative effects that were not considered in time. Among which stands out the antimicrobial resistance, and in some cases, the resistance transfer to humans (Bacanlı and Başaran 2019). In addition, the use of antibiotics on the health of poultry can cause allergic reactions, chronic toxicities, disruption of the function of the digestive system, among others (Peng *et al.* 2022). Nowadays, antibiotics are not used as growth promoters in certain countries because their legislation prohibits it, as is the case of the European Union (EUR-Lex 2003). Chile has banned the use of antimicrobials in animal feed since 2006 (BCN 2006).

Several dietary additives are used in animal husbandry because they can improve nutritional action of the diet and generate beneficial effects at physiological level (Liu *et al.* 2017). Some studies indicate that dietary additives can reduce or alter the microbial population of the gastrointestinal tract in pigs (Wells *et al.* 2010), or improve the final growth of broilers (Wang *et al.* 2023).

One of the potential applications of biochar is its use in animals as a dietary additive (Man *et al.* 2020). Biochar is a solid black, carbon-rich product obtained through the pyrolysis process. This process consists of heating plant or animal biomass at high temperature and low level or absence of oxygen (Lehmann and Joseph 2015). The use of biochar becomes more interesting when using waste or

by-products from agroindustry as it reduces the emission of toxic compounds either by burning or by the accumulation in landfills or sparsely populated areas (Hamidzadeh *et al.* 2023).

In recent years, scientific interest in biochar research has increased due to its ability to sequester carbon and thus contribute to climate change mitigation, as well as improve soil fertility and water retention (Novotny *et al.* 2015). Few studies have shown beneficial effects on the soil microbial community when biochar is applied (Palansooriya *et al.* 2019).

There is not much information about biochar as a dietary additive. However, the existing information shows beneficial results when biochar is used in poultry diets in terms of higher daily weight gain or a high feed conversion rate (Prasai *et al.* 2017). However, more information is needed about the changes of intestinal microbiota when biochar is used as a dietary additive in poultry (Goiri *et al.* 2021).

Antibiotics as feed additives have been used in animal husbandry for many years, but their use has resulted in the development of resistant pathogens (Gerlach and Schmidt 2012) as abovementioned. Hence, alternative methods are required in animal feed that can control pathogenic bacteria. Therefore, it is important to carry out research on biochar in this area to clarify what happens at the gastrointestinal level of birds, when they are fed biochar as dietary additive. Moreover, the studies carried out fails to elucidate reliably a relationship between beneficial productive effects with the gastrointestinal system (Prasai *et al.* 2016).

This study aimed to determine the characteristics of wheat straw and hazelnut shell biochars and their effect on bacteria associated with the egg industry.

Materials and methods

Biochar. Biochar was obtained from wheat straw and hazelnut shells, using two different temperatures in the pyrolysis process (500 and 700 °C), using a pyrolysis reactor, which heats the material through a furnace with electrical resistance, at a

rate of 5°C min⁻¹ until the target temperature was reached. This temperature was maintained at this condition for one hour.

Once the biochar was obtained, the particle size was homogenized using a mill (POWTEQ brand; model DP 100; China) to a size ≤ 0.5 mm.

A gravimetric characterization of the biochar was carried out following ASTM D1506 and ISO 562 standards and an elemental characterization in a Leco CHNS 628 and 628 S elemental analyzer. These analyses were carried out at the Unidad de Desarrollo Tecnológico (UDT) of the Universidad de Concepción, Concepcion, Chile.

The pH and electrical conductivity were determined according to the characterization standards established by the “International Biochar Initiative” (IBI 2015). Basically, a 1:20 dilution of the biochar was stirred for 90 minutes, then the solution was decanted to measure pH and conductivity. For the iodine value, the sodium thiosulfate volumetric method was used. The result is expressed in milligrams of iodine adsorbed by 1 g of carbon (Ferrer *et al.* 2023). Biochar samples were prepared in different combination and ratios to observe the water retention ability of biochars in beakers with water. The height of water for each beaker was determined every day until no water left in the beaker and percentages of water retention of different beakers were calculated based on the weight difference (Shafie *et al.* 2012).

Bacterial strains: To evaluate the effect of biochar on bacteria, the growth of three pathogenic microorganisms was evaluated: *Salmonella enterica* (ATCC 13076), *Escherichia coli* (ATCC 25922), and *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923); and one beneficial microorganism, *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212) in the Food Safety Laboratory, Department of Animal Production, Faculty of Agronomy, Universidad de Concepción, Campus Chillan, Chile.

The bacterial strains were cryopreserved at a temperature of -80 °C, and were cultured on Mueller-Hinton agar and subsequently incubated for 24 h at 35 ± 2°C.

Bacterial suspensions were adjusted to 0.5 McFarland Standard (equivalent to 1×10^6 CFU mL⁻¹) (Bellik 2014). The trial considered 12 treatments in duplicate: wheat straw biochar at 500 and 700 °C, hazelnut shell biochar at 500° and 700 °C, at a concentration of 0.1%, 0.4% and 1%. Uninoculated Mueller-Hinton broth (blank), inoculated Mueller-Hinton broth (Absolute control) and zeolite (ZOLIN-200 MR) were used as controls (Table 1).

The treatments were incubated at $35 \pm 2^\circ\text{C}$ with shaking at 150 rpm (Heidolph unimax 2010, Germany) (Chandra *et al.* 2007). Then the growth was registered as Log₁₀ of colony forming units (CFU) per μL at 24, 48 and 72 hours, with dilutions using 0.89% saline solution to subsequently inoculate in triplicate 10 μL of each treatment in Petri dishes with PCA agar, in 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} and 10^{-6} dilution (Davis *et al.* 2005).

Additionally, in order to analyze bacterial growth excluding biochar, the growth of *Salmonella enterica* was evaluated after separating the remaining biochar from the suspension (Hill *et al.* 2019). The separation of the biochar was carried out by cooling the suspension after incubation on ice for 5 minutes. The same procedure described above was carried out (Table 1).

Poultry assay: In addition, a descriptive analysis of the microbial presence in the cloaca of the birds was performed. A total of 280 Hy-line hen were allotted randomly to 1 of 8 feed diet treatments in cages (five replicates). Seven hens per cage ($0.045 \text{ m}^2 \text{ hen}^{-1}$) were housed for 6 weeks at the Livestock Experimental Field "Marcelo Tima Pendola", Universidad de Concepción, within a standard 3-tier furnished cages system, with all three tiers (top, middle and bottom) consisting of two rows. Feed was supplied daily for each cage with *ad libitum* access to water. Light was provided for 16 hours and 8 hours of darkness.

The diet was a typical intensive production diet (Table 1). Higher doses are used than in the microbiological study because in the latter there was a direct interaction between biochar and bacteria, which does not occur in the gastrointestinal system

of poultry. In addition, different authors (Prasai *et al.* 2018; Willson *et al.* 2019) use similar ranges in additive dosage for laying hens. This work has the approval of the bioethics committee of the Faculty of Veterinary Sciences of the Universidad de Concepción.

Cloaca sampling. After 6 weeks of poultry consuming the diets, sampling at the cloacal level was carried out. For this purpose, one poultry was chosen randomly from each treatment. The swab was gently inserted approximately 22 millimeters into the cloaca. The swab was rotated five times in a slow clockwise motion around the cloaca, applying moderate pressure so that the swab-tip maintained contact (Williams and Athrey 2020). The samples were handled under sterile conditions and cooled.

Microbiome DNA 16S sequencing. DNA extraction was performed using "Wizard® SV Genomic DNA Purification System". The DNA was submitted to AUSTRAL omics (Universidad Austral de Chile) and a massive sequencing for microbiomes was performed using the methodology "16 rRNA marker gene analysis". It was necessary to use the "Illumina MiSeq" kit for sequencing. The "R DADA2" package was used to identify the biological diversity of the sequences.

Statistical Analyses: A completely randomized design was used for the data obtained in each count. For the statistical analysis, a T Test (Student's t-test) was performed between the absolute control and each biochar treatment independently.

For the biochar treatments that showed statistical differences with the absolute control in T Test, an analysis of variance (ANOVA) was performed, including the zeolite treatments. Comparisons between means were carried out using Tukey's test, with a significance level of 0.05. These analyses were performed using INFOSAT statistical software.

Results

Biochar characterization. The biochars presented different physicochemical gravimetric and elemental characteristics (Table 2).

There were differences in the physicochemical characteristics of the biochars, with wheat straw biochar doubling the conductivity over hazelnut shell biochar regardless of the process temperature. A similar result was obtained in the water retention capacity. In addition, pH and iodine value were also higher in WS biochar than HS biochar.

In Table 2, the results showed differences in ash content, with WS biochar containing an ash fraction approximately 10 times higher than HS biochar. Although all biochars meet the EBC standards (EBC 2022), the content was at least 16 percentage points higher for HS biochar compared to WS biochar. This shows how contrasting biochar can be when raw material varies, since wheat straw biochar has a high content of inorganics, while hazelnut shell biochar is rich in carbon.

Regarding the process temperature, increasing from 500°C to 700°C caused an increase in the concentration of carbon in the two different materials, and a volatile carbon is decreased, which was expected according to the literature (Tomczyk *et al.* 2020), and from the elemental analysis, it is inferred that temperature modifies the oxygenated functional groups.

Salmonella enterica. For pathogenic bacteria such as *Salmonella enterica*, is desirable to reduce their growth. In general, for *S. enterica*, no treatment caused a decrease in the bacterial population compared to the absolute control (Table 3).

In incubations over time, the growth of *Salmonella* increased only with biochar HS 700 - 0.4

Escherichia coli. At 24 hours of incubation, no treatment shows differences from the absolute control.

Over time, the growth of *E. coli* decreased with biochar WS treatments at different production temperatures with the same dose, as shown in Table 3.

Staphylococcus aureus. At 24 hours of incubation, when compared with the absolute control, except for biochar WS 500 – 0.4, all treatments showed differences. Three treatments at 1% biochar significantly decreased the bacterial growth (biochar WS 500, HS 500 and HS 700).

At 48 hours, the half of treatments at 1% caused a decrease in the *Staphylococcus aureus* growth. It should be noted that at 72 hours, all treatments with doses of 0.1 and 0.4% hazelnut shell, regardless of the processing temperature, had a significantly lower effect than the absolute control (Table 3).

Enterococcus faecalis. *E. faecalis* is part of the normal intestinal microflora of laying hens, considered as a beneficial microorganism. Table 3 shows the bacterial growth at 24, 48 and 72 hours of incubation, respectively. At 24 and 48 hours, 1% of zeolite was able to increase the bacterial population. Treatments with 1% biochar caused a lower bacterial population at 24 hours.

At longer incubation time (72 hours), two treatments with higher doses of wheat straw biochar significantly increased the growth of *Enterococcus faecalis*.

Separation of remaining biochar. Table 4 shows the differences in the bacterial growth of *Salmonella enterica* when the count was carried out separating the biochar particles. There was a lower bacterial growth when separating the biochar particulates from the supernatant.

Microbiome DNA 16S Sequencing. Dendrogram revealed 2 groups of relatedness (Figure 1). The first had only two treatments HS – 03 and WS – 0.3, and the others consider the remaining six treatments.

At the species level, the predominant bacteria were *Gallibacterium anatis* (Figure 2), a pathogenic bacterium for laying hens, with a higher relative presence in HS - 1 biochar.

Discussion

Several authors state that biochars vary in their characteristics depending on several factors, such as temperature in the pyrolysis process and the raw material (Man *et al.* 2020). In this study, differences between the raw materials and temperatures used in the process of obtaining biochar were observed (Table 2). Different types of biochar can have different effects in animals as a dietary additive (Man *et al.* 2020). An important parameter for the utilization of biochar is the water retention capacity, which decreased with increasing the process temperature from 500 to 700°C. This may be because increasing the temperature above 500°C gradually generates a collapse of the biochar structure (Kaya *et al.* 2018) which is related to water retention.

Physicochemical characterization of the biochar (Table 2) could explain the differences between WS biochar and HS biochar. These results agree with Sun *et al.* (2017a) since these differences are explained mainly because WS biochar having a higher iodine value and higher electrical conductivity than HS biochar can retain more bacteria, resulting into fewer bacteria in the medium.

Other studies support that increasing the temperature in the pyrolysis process to produce biochar increases the surface area of the biochar, which increases the adsorption or bacterial retention capacity (Zhang *et al.* 2022). This is relevant since the use of biochar as a dietary additive is given by the adsorption capacity of this product (Schmidt *et al.* 2019). However, most of the treatments with biochar did not affect the bacterial growth. Despite the above, there are other effects to be analyzed, such as the capacity of retaining toxins or contaminants that come from the diet itself (Man *et al.* 2020).

There is still a lack of knowledge about all the effects of the biochar on poultry. Kalus et al. (2020), analyzed the pH in the excreta of chicken offered biochar as a dietary additive and found an increase compared to the control, which can cause an increase in nitrogen losses due to an alkaline environment. The pH of the biochar used by these authors was 9.0, which is similar to the pH of the WS biochar in this study. Therefore, it is important that future *in vivo* studies not only consider evaluating biochar doses and their effect on the poultry, but also biochar characteristics such as pH, and water absorption capacity, among others, since these parameters may also influence the poultry's response.

The electrical conductivity of biochar depends on several factors such as the raw material used, and the conditions of the pyrolysis process, but essentially it depends on the maximum temperature reached. If 600°C is exceeded, the electrical conductivity and electron transfer increase (Sun *et al.* 2017b). Bacteria such as *Escherichia coli* and *Enterococcus faecalis* have negative electrical charge (Güler and Oruç 2021), so they can adhere to surfaces depending on the charge. In this sense, Table 2 shows that biochar WS has a conductivity twice that of biochar HS, which would allow a greater affinity with these bacteria; however, since this study was carried out in closed nutrient broths, whether the bacteria adhere to the surface of the biochar would not affect the bacterial population.

Salmonella enterica and *Escherichia coli* were the bacteria that had the least effect when the treatments were applied, which coincides with Chung et al. (Chung *et al.* 2021). These authors conducted an experiment with results very similar to the present study since they applied rice husk biochar at 3, 5 and 10 % in dry matter basis in poultry excreta compost and evaluated the CFU of these two pathogenic bacteria for up to 50 days. The bacterial population was not enhanced or decreased with the doses of biochar compared to the control group and at day 35 of the trial these bacteria were eliminated in all cases.

In general, *Enterococcus* and *Staphylococcus* showed a reduction in bacterial population, in the case of the former, within the first 24 hours, while for the second

one, the reduction occurred at 72 hours. These are Gram-positive bacteria; studies indicate that biochar may have a better antimicrobial effect on Gram-negative bacteria when compared to the effect on Gram-positive bacteria. This is because the greater thickness of the peptidoglycan present in gram-positive bacteria hinders bacterial adsorption by the biochar (Schmidt *et al.* 2019).

Enterococcus faecalis is a beneficial bacteria for chickens because it is part of their normal intestinal microflora (Fertner *et al.* 2011). Specifically, in a study where the minimum inhibitory concentration of biochar was evaluated on this bacterium at 24 hours of incubation, there was an antibacterial activity, without being clear that it will occur over time (Abdelwahab *et al.* 2022). In this study at 24 hours of incubation, biochar causes a decrease in the bacterial growth, however at 72 hours an increase in the population of *Enterococcus faecalis* was observed, representing a potential beneficial effect of biochar over time on *E. faecalis*. Therefore, there is an opportunity for the growth of this bacterium in the adsorption sites of the biochar (Perez-Mercado *et al.* 2019), considering that *E. faecalis* is a low diameter bacterium (Díaz *et al.* 2013).

Several authors claim that the porous structure of biochar is a real habitat for bacteria (Chen *et al.* 2023). Therefore, the results shown in Table 4 were expected since the growth of *Salmonella enterica* was statistically higher when no separation of biochar from the bacterial broth was carried out. This occurred with 0.1% biochar. This can be explained by the fact that since it is a low dose compared to the 0.4 or 1% doses, it has a lower retention or absorption capacity, which would be reflected in a higher colony forming unit count. This does not mean that biochar will always promote the bacterial population, but its adsorption capacity can affect bacterial growth since it is due to this characteristic that several applications of this product are being studied, for example, in the treatment of wastewater containing bacteria (Fagbohunge *et al.* 2017). Thus, there is potential applicability of biochar in other types of environments such as poultry.

Data on bacterial abundance relative can help to explain the role of biochar in gastrointestinal system of poultry (Zhang *et al.* 2020). The dendrogram (Figure 1) shows the similarities of bacterial presence in poultry fed diets with different treatments. In general, all treatments are close to the control, therefore biochar does not cause a considerable change in the gastrointestinal microflora even in those treatments with the highest doses of biochar. Authors who have worked with biochar as a dietary additive in poultry and have evaluated the bacterial diversity at the gastrointestinal tract level have reached the same conclusion (Prasai *et al.* 2016).

The microbiome DNA 16 S sequencing of the samples extracted from the poultry' cloaca showed that in the control treatment, there was a significant abundance of *Gallibacterium anatis* (Figure 2), a pathogenic bacterium that affects the health of the poultry (Bojesen *et al.* 2004), a situation that changes in most biochar treatments. In addition, *Salmonella enterica*, *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* were not found in this study, neither in the poultry fed with biochar, zeolite or without additives, so it was not attributed to the inclusion of biochar in this case. To date, there are still not many studies on the effects of biochar as a dietary additive at the gastrointestinal level of poultry. However, analyzing the results and the existing information about this (Willson *et al.* 2019), it can be inferred that the reduction in the abundance of pathogenic bacteria may occur because biochar could become a promoter of other bacteria that displace the pathogenic ones, but in this study, most of these bacteria could not be identified. *Enterococcus* and *Lactobacillus* are recognized as beneficial bacteria for poultry. These bacteria are immobile therefore biochar could act as a habitat allowing these bacteria to remain longer in the gastrointestinal system. Thus, there is an exclusion of pathogenic bacteria due to the competition among microorganisms, however, it is necessary to conduct more experiments to corroborate the mechanism of action of biochar on bacteria at the gastrointestinal level (Dadhich, 2022).

Conclusions

1. Wheat straw biochar has a higher iodine value and conductivity index than hazelnut shell biochar.
2. The bacterial growth of *Enterococcus faecalis* increased over time, mainly with wheat straw biochar.
3. Among the pathogenic bacteria, *Salmonella enterica* and *Escherichia coli* were the least affected by the biochar treatments.
4. There is a change in the relative abundance of bacteria at the cloacal level when biochar is given as a dietary additive, and it can be positive for the poultry by allowing the abundance of beneficial bacteria.

Acknowledgements

This work would not have been possible without the financial support from Gore Ñuble (Gobierno Regional de Ñuble), BIP 40032586-0

Special thanks to the Faculty of Agronomy of University of Concepcion for the scholarship.

Conflict of Interest

The authors declare no conflict of interest.

Data availability statement

There are no new data associated with this article.

References

- Abdelwahab MS, El Halfawy NM, El-Naggar MY. Lead adsorption and antibacterial activity using modified magnetic biochar/sodium alginate nanocomposite. *Int J Biol Macromol* 2022;**206**:730–9.
- Bacanlı M, Başaran N. Importance of antibiotic residues in animal food. *Food and Chemical Toxicology* 2019;**125**:462–6.
- BCN. *Resolucion 1992*. Santiago: Ministerio de Agricultura; Servicio Agrícola y Ganadero, 2006. (24 April 2023, date last accessed)
- Bellik Y. Total antioxidant activity and antimicrobial potency of the essential oil and oleoresin of *Zingiber officinale* Roscoe. *Asian Pac J Trop Dis* 2014;**4**:40–4.
- Bojesen AM, Nielsen OL, Christensen JP *et al*. In vivo studies of *Gallibacterium anatis* infection in chickens. *Avian Pathol* 2004;**33**:145–52.
- Chandra R, Raj A, Purohit HJ *et al*. Characterisation and optimisation of three potential aerobic bacterial strains for kraft lignin degradation from pulp paper waste. *Chemosphere* 2007;**67**:839–46.
- Chen L, Fang W, Liang J *et al*. Biochar application in anaerobic digestion: Performances, mechanisms, environmental assessment and circular economy. *Resour Conserv Recycl* 2023;**188**:106720.
- Chung WJ, Chang SW, Chaudhary DK *et al*. Effect of biochar amendment on compost quality, gaseous emissions and pathogen reduction during in-vessel composting of chicken manure. *Chemosphere* 2021;**283**:131129.
- Dadhich A. Engineered Biochar as Feed Supplement and Other Husbandry Applications. *Engineered Biochar: Fundamentals, Preparation, Characterization and Applications*. Springer, 2022, 319–29.
- Davis K, Joseph S, Janssen P. Effects of growth medium, inoculum size, and incubation time on culturability and isolation of soil bacteria. *Appl Environ Microbiol* 2005;**71**:826–34.
- Díaz M, Rodríguez C, Zhurbenko R. Enterococcus, medios de cultivo convencionales y cromogénicos. *Rev Cubana Hig Epidemiol* 2013;**51**:97–110.
- EBC. *European Biochar Certificate - Guidelines for a Sustainable Production of Biochar*. Frick, Switzerland, 2022. (27 March 2023, date last accessed)

EUR-Lex. Reglamento (CE) n° 1831/2003 del Parlamento Europeo. 2003. (02 August 2023, date last accessed)

Fagbohunbe MO, Herbert BMJ, Hurst L *et al.* The challenges of anaerobic digestion and the role of biochar in optimizing anaerobic digestion. *Waste Management* 2017;**61**:236–49.

FAO. Cultivos y productos de ganadería. Licencia: CC BY-NC-SA 3.0 IGO. Extracted from: <https://www.fao.org/faostat/en/#data/QCL>. (23 June 2022, date last accessed)

Ferrer V, Flores M, Grandón H *et al.* Ammonia Removal in Activated Carbons Prepared from Olive Oil Industry Waste. *J Braz Chem Soc* 2023;**34**:287–301.

Fertner ME, Olsen RH, Bisgaard M *et al.* Transmission and genetic diversity of *Enterococcus faecalis* among layer chickens during hatch. *Acta Vet Scand* 2011;**53**:56.

Goiri I, Ruiz R, Atxaerandio R *et al.* Assessing the potential use of a feed additive based on biochar on broilers feeding upon productive performance, pH of digestive organs, cecum fermentation and bacterial community. *Anim Feed Sci Technol* 2021;**279**:115039.

Güler S, Oruç Ç. Comparison of the behavior of negative electrically charged *E. coli* and *E. faecalis* bacteria under electric field effect. *Colloids Surf B Biointerfaces* 2021;**208**:112097.

Hamidzadeh Z, Ghorbannezhad P, Ketabchi MR *et al.* Biomass-derived biochar and its application in agriculture. *Fuel* 2023;**341**:127701.

Gerlach H, Schmidt H-P. Biochar in poultry farming. *Ithaka Journal* 2012;**1**:262–4.

Hill RA, Hunt J, Sanders E *et al.* Effect of Biochar on Microbial Growth: A Metabolomics and Bacteriological Investigation in *E. coli*. *Environ Sci Technol* 2019;**53**:2635–46.

IBI. Standardized Product Definition and Product Testing Guidelines for Biochar That Is Used in Soil. *International Biochar Initiative* 2015. (28 May 2023, date last accessed)

Kalus K, Konkol D, Korczyński M *et al.* Laying Hens Biochar Diet Supplementation—Effect on Performance, Excreta N Content, NH₃ and VOCs Emissions, Egg Traits and Egg Consumers Acceptance. *Agriculture* 2020, Vol 10, Page 237 2020;**10**:237.

Kaya N, Yildiz Z, Ceylan S. Preparation and Characterisation of Biochar from Hazelnut Shell and Its Adsorption Properties for Methylene Blue Dye. *Journal of Polytechnic-Politeknik Dergisi* 2018;**21**:765–76.

Lehmann J, Joseph S. Biochar for environmental management: an introduction. *Biochar for Environmental Management* 2015:1–13.

Liu W, Pedram R, Javandel F *et al.* The effects of different levels of dietary fish oil, soybean oil, and sunflower oil on performance and immunity related parameters of broiler chicken. *J Anim Plant Sci* 2017;**27**:384–8.

Man KY, Chow KL, Man YB *et al.* Use of biochar as feed supplements for animal farming. *Crit Rev Environ Sci Technol* 2020;**51**:187–217.

Miranda JM, Anton X, Redondo-Valbuena C *et al.* Egg and Egg-Derived Foods: Effects on Human Health and Use as Functional Foods. *Nutrients* 2015, Vol 7, Pages 706-729 2015;**7**:706–29.

Novotny EH, Maia CMB de F, Carvalho MT de M *et al.* Biochar: Pyrogenic carbon for agricultural use - A critical review. *Rev Bras Cienc Solo* 2015;**39**:321–44.

Palansooriya KN, Wong JTF, Hashimoto Y *et al.* Response of microbial communities to biochar-amended soils: a critical review. *Biochar* 2019 1:1 2019;**1**:3–22.

Peng M jun, Huang T, Yang Q ling *et al.* Dietary supplementation *Eucommia ulmoides* extract at high content served as a feed additive in the hens industry. *Poult Sci* 2022;**101**:101650.

Perez-Mercado LF, Lalander C, Joel A *et al.* Biochar filters as an on-farm treatment to reduce pathogens when irrigating with wastewater-polluted sources. *J Environ Manage* 2019;**248**:109295.

Prasai TP, Walsh KB, Bhattarai SP *et al.* Biochar, Bentonite and Zeolite Supplemented Feeding of Layer Chickens Alters Intestinal Microbiota and Reduces *Campylobacter* Load. *PLoS One* 2016;**11**:e0154061.

Prasai TP, Walsh KB, Midmore DJ *et al.* Effect of biochar, zeolite and bentonite feed supplements on egg yield and excreta attributes. *Anim Prod Sci* 2017;**58**:1632–41.

Prasai TP, Walsh KB, Midmore DJ *et al.* Manure from biochar, bentonite and zeolite feed supplemented poultry: Moisture retention and granulation properties. *J Environ Manage* 2018;**216**:82–8.

Puglisi MJ, Fernandez ML. The Health Benefits of Egg Protein. *Nutrients* 2022;**14**:2904.

Schmidt HP, Hagemann N, Draper K *et al.* The use of biochar in animal feeding. *PeerJ* 2019;**2019**:e7373.

Shafie ST, Salleh MM, Hang LL *et al.* Effect of pyrolysis temperature on the biochar nutrient and water retention capacity. *Journal of purity, utility reaction and environment* 2012;**1**:293–307.

Sun J, He F, Pan Y *et al.* Effects of pyrolysis temperature and residence time on physicochemical properties of different biochar types. *Acta Agric Scand B Soil Plant Sci* 2017a;**67**:12–22.

Sun T, Levin BDA, Guzman JJJ *et al.* Rapid electron transfer by the carbon matrix in natural pyrogenic carbon. *Nat Commun* 2017b;**8**:14873.

Tomczyk A, Sokołowska Z, Boguta P. Biochar physicochemical properties: pyrolysis temperature and feedstock kind effects. *Rev Environ Sci Biotechnol* 2020;**19**:191–215.

Wang X, Jian H, Zhao W *et al.* Effects of dietary *Bacillus coagulans* on the productive performance, egg quality, serum parameters, and intestinal morphology of laying hens during the late laying period. *Ital J Anim Sci* 2023;**22**:95–105.

Wells JE, Oliver WT, Yen JT. The effects of dietary additives on faecal levels of *Lactobacillus* spp., coliforms, and *Escherichia coli*, and faecal prevalence of *Salmonella* spp. and *Campylobacter* spp. in US production nursery swine1. *J Appl Microbiol* 2010;**108**:306–14.

Williams T, Athrey G. Cloacal Swabs Are Unreliable Sources for Estimating Lower Gastro-Intestinal Tract Microbiota Membership and Structure in Broiler Chickens. *Microorganisms* 2020, Vol 8, Page 718 2020;**8**:718.

Willson NL, Van TTH, Bhattarai SP *et al.* Feed supplementation with biochar may reduce poultry pathogens, including *Campylobacter hepaticus*, the causative agent of Spotty Liver Disease. *PLoS One* 2019;**14**:e0214471.

Zhang M, He L, Zhang X *et al.* Improved removal performance of Gram-negative and Gram-positive bacteria in sand filtration system with arginine modified biochar amendment. *Water Res* 2022;**211**:118006.

Zhang WM, Yu CX, Wang XJ *et al.* Increased abundance of nitrogen transforming bacteria by higher C/N ratio reduces the total losses of N and C in chicken manure

and corn stover mix composting. *Bioresour Technol* 2020;**297**, DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.122410>.

Authors Contribution

Conceptualization, P.W. and V.V.; methodology, D.F.; software, C.G.; validation, C.S., C.M. and M.D.; formal analysis, D.F.; investigation, D.F.; resources, P.W.; data curation, D.F.; writing—original draft preparation, D.F.; writing—review and editing, P.W and V.V.; visualization, V.V.; supervision, P.W.; project administration, P.W.; funding acquisition, P.W.

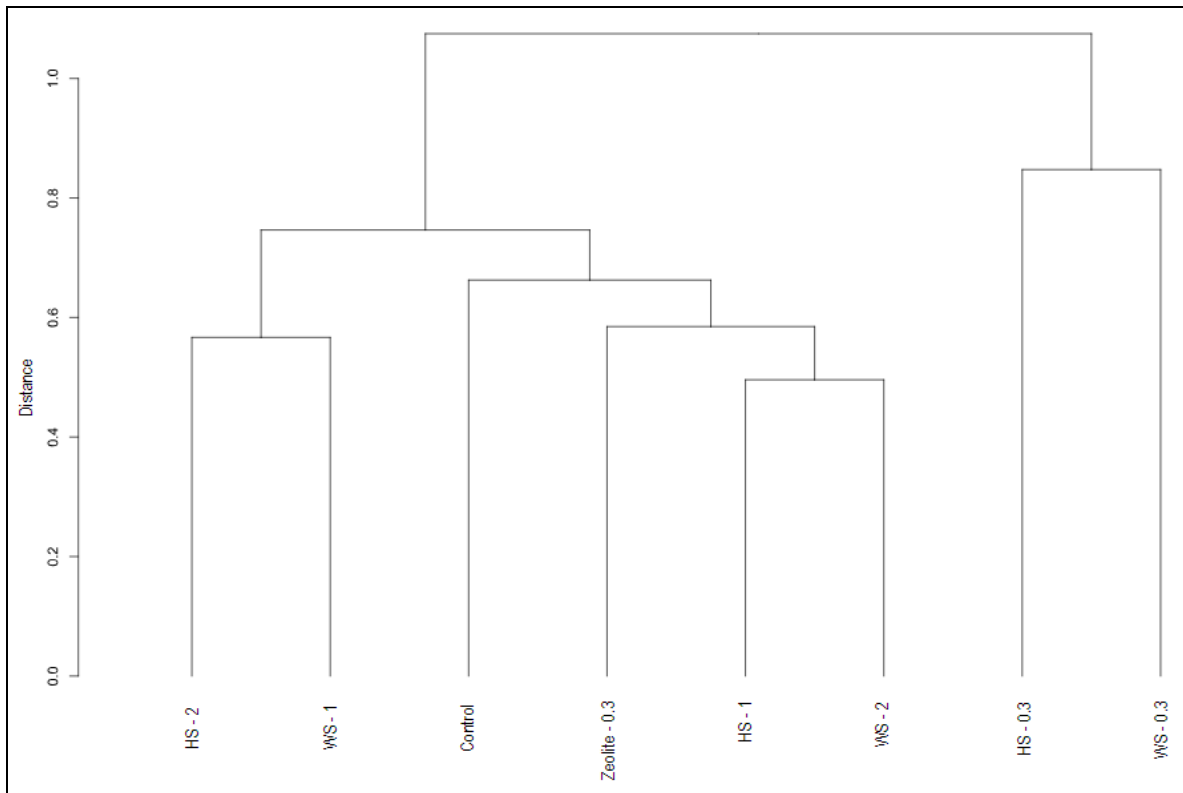


Figure 1. Dendrogram representing the relationships between different poultry diets, based on microbiome obtained with 16S DNA sequencing, recovered from the poultry' cloaca.

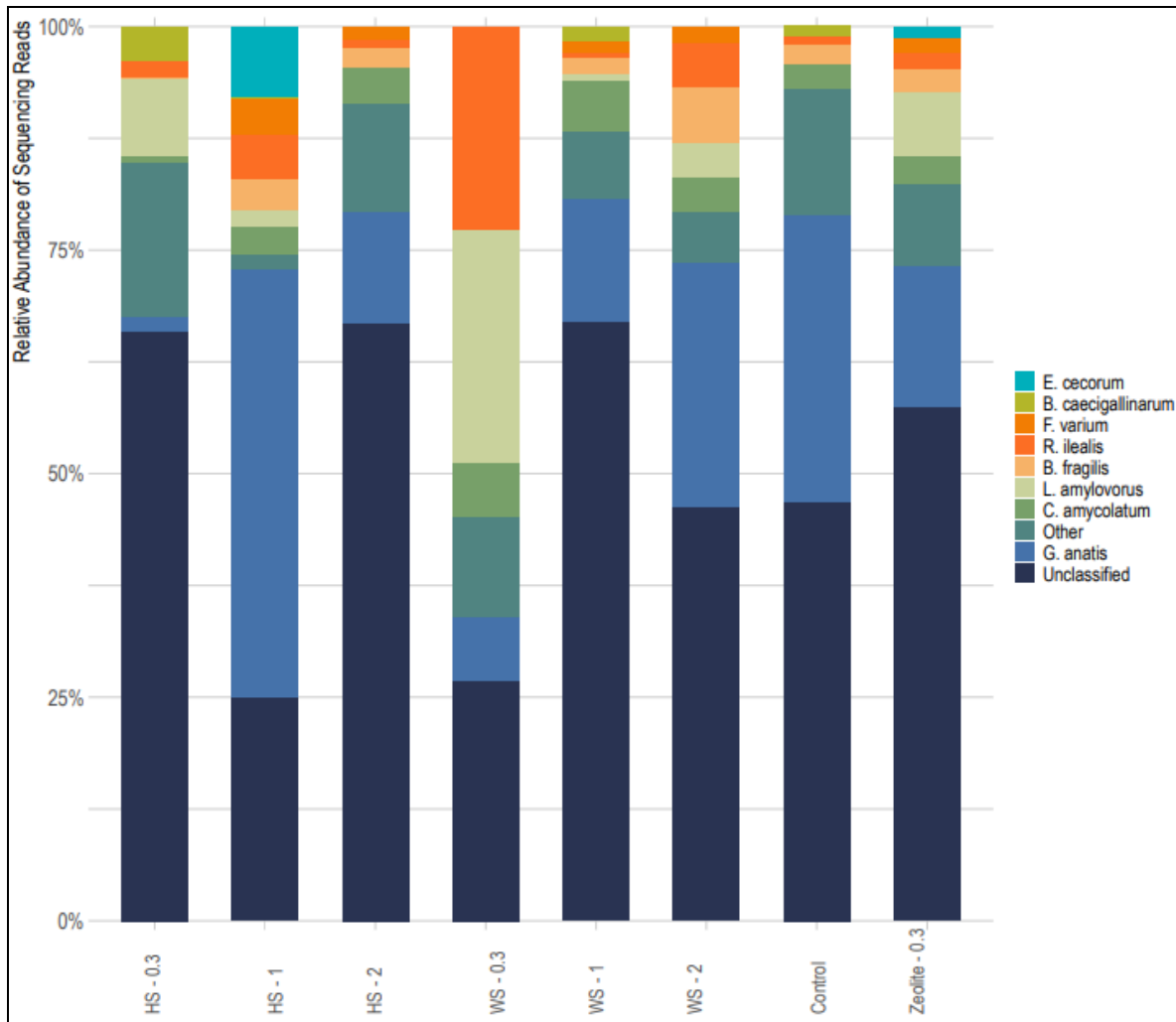


Figure 2. Relative abundance of different species of bacteria in treatments

Table 1. Description of *in vitro* and *in vivo* treatments.

Treatment	Description
<i>In vitro</i>	
Absolute control	Only bacteria
Zeolite – 0.1	Zeolite, 0.1 %
Zeolite – 0.4	Zeolite, 0.4 %
Zeolite – 1	Zeolite, 1 %
WS 500 – 0.1	Wheat straw biochar at 500 °C, 0.1 %
WS 700 – 0.1	Wheat straw biochar at 700 °C, 0.1 %
WS 500 – 0.4	Wheat straw biochar at 500 °C, 0.4 %
WS 700 – 0.4	Wheat straw biochar at 700 °C, 0.4 %
WS 500 – 1	Wheat straw biochar at 500 °C, 1 %
WS 700 – 1	Wheat straw biochar at 700 °C, 1 %
HS 500 – 0.1	Hazelnut shell biochar at 500 °C, 0.1%
HS 700 – 0.1	Hazelnut shell biochar at 700 °C, 0.1%
HS 500 – 0.4	Hazelnut shell biochar at 500 °C, 0.4%
HS 700 – 0.4	Hazelnut shell biochar at 700 °C, 0.4%
HS 500 – 1	Hazelnut shell biochar at 500 °C, 1%
HS 700 – 1	Hazelnut shell biochar at 700 °C, 1%
<i>In vivo</i>	
Control	Basal diet
Zeolite – 0.3	Basal diet + Zeolite, 0.1 %
WS – 0.3	Basal diet + Wheat straw biochar at 700 °C, 0.3 %
WS – 1	Basal diet + Wheat straw biochar at 700 °C, 1 %
WS – 2	Basal diet + Wheat straw biochar at 700 °C, 2 %
HS – 0.3	Hazelnut shell biochar at 700 °C, 0.3%
HS – 1	Hazelnut shell biochar at 700 °C, 1%
HS – 2	Hazelnut shell biochar at 700 °C, 2%

Table 2. Physicochemical, gravimetric, and elemental characteristics of wheat straw and hazelnut shell biochars obtained at 500 and 700°C.

Biochar	Wheat straw		Hazelnut Shell	
	500	700	500	700
Temperature (°C)	500	700	500	700
Physicochemical				
pH	8.6	8.8	7.5	7.0
Conductivity ($\mu\text{S cm}^{-1}$)	70.6	76.7	31.5	33.4
Iodine Value (mg g^{-1})	73.0	130.0	55.8	95.8
Water retention capacity (%)	164.1	158.7	79.2	70.5
Gravimetric				
Moisture (%)	1.79	1.51	0.90	0.96
Ashes (%)	17.42	20.00	1.78	1.75
Volatiles (%)	16.6	13.2	17.2	12.6
Fixed carbon (%)	65.9	66.8	81.0	85.7
Elemental				
Elemental analysis (%)				
C	75.7	76.2	91.8	95.3
H	2.67	1.11	2.89	1.27
N	0.89	0.94	0.58	0.51
O	3.32	1.75	2.93	1.17

Table 3. Bacterial strains growth at different incubation times.

Biochar	<i>Salmonella enterica</i> Log ₁₀ CFU μL ⁻¹			<i>Escherichia coli</i> Log ₁₀ CFU μL ⁻¹			<i>Staphylococcus aureus</i> Log ₁₀ CFU μL ⁻¹			<i>Enterococcus faecalis</i> Log ₁₀ CFU μL ⁻¹		
	at 24 hours	at 48 hours	at 72 hours	at 24 hours	at 48 hours	at 72 hours	at 24 hours	at 48 hours	at 72 hours	at 24 hours	at 48 hours	at 72 hours
Absolute control	5.851	5.577	5.583	5.638	5.510	5.166	5.596	5.806	5.335	5.255	5.035	4.847
Zeolite – 0.1	5.893	5.744	5.825	5.513	5.251	4.932	5.708	5.651	4.010*	5.089*	5.130	4.915
Zeolite – 0.4	5.915	5.650	6.097•	5.547	5.535	5.126	5.607	5.378*	4.153*	5.264	5.214	5.201•
Zeolite – 1	6.247	5.955	5.856	5.410	5.556	5.133	5.163*	4.035*	3.836*	5.638•	5.439•	5.162•
WS 500 – 0.1	5.913	5.951	5.797	5.638	5.376	5.201	6.125•	5.684	5.427	5.126	4.962	5.003
WS 700 – 0.1	6.008•	5.748	5.611	5.654	5.405	5.254	5.791	5.590	4.671*	5.234	5.050	4.951
WS 500 – 0.4	5.795	5.776	5.654	5.508	5.526	5.187	5.651	5.479	4.950	5.286	5.036	4.971
WS 700 – 0.4	5.808	5.710	5.721	5.597	5.439	5.280	6.141•	5.601	4.668*	5.254	5.077	5.152•
WS 500 – 1	5.904	5.569	5.712	5.384	5.036*	4.902	5.096*	4.924*	5.447	4.776*	4.975	5.229•
WS 700 – 1	5.857	5.692	5.756	5.635	5.217*	4.772*	5.328	5.218*	4.989	4.862*	4.813	4.976
HS 500 – 0.1	5.909	5.892	5.799	5.654	5.510	5.330	6.082•	5.623	4.666*	5.353	4.876	4.903
HS 700 – 0.1	5.987	5.955	5.628	5.787	5.651	5.476	6.191•	5.410	3.846*	5.082*	4.756	4.852
HS 500 – 0.4	5.887	5.850	5.566	5.508	5.569	5.259	6.245•	5.506	4.163*	5.066*	4.794*	4.824
HS 700 – 0.4	5.906	5.997•	5.987•	5.680	5.360	5.426	6.172•	5.697	4.114*	5.021*	4.855	4.692
HS 500 – 1	5.871	5.567	5.559	5.498	5.291	4.975	5.197*	5.253*	5.100	4.862*	4.854	4.759
HS 700 – 1	5.585	5.406	5.569	5.476	5.411	5.073	5.089*	5.426	5.388	4.731*	4.959	4.700*

*Statistically lower to absolute control. •Statistically superior to absolute control

Table 4. Effect of biochar on the growth of *Salmonella enterica* with biochar separation and without biochar separation.

Biochar	Log ₁₀ CFU μL ⁻¹ at 24 hours		Log ₁₀ CFU μL ⁻¹ at 48 hours		Log ₁₀ CFU μL ⁻¹ at 72 hours	
	No separation	Separation	No separation	Separation	No separation	Separation
	WS 500 – 0,1	5.91•	5.63	5.95•	5.49	5.80•
WS 700 – 0,1	6.01•	5.33	5.75•	5.33	5.61•	5.19
WS 500 – 0,4	5.79	5.55	5.78	5.55	5.65	5.49
WS 700 – 0,4	5.81	5.69	5.71	5.69	5.72•	5.30
WS 500 – 1	5.90•	5.42	5.57	5.42	5.71•	5.25
WS 700 – 1	5.86•	5.50	5.69	5.50	5.76	5.61
HS 500 – 0,1	5.91•	5.55	5.89•	5.55	5.80•	4.99
HS 700 – 0,1	5.99•	5.61	5.96•	5.61	5.63•	5.08
HS 500 – 0,4	5.89•	5.60	5.85•	5.60	5.57	5.63
HS 700 – 0,4	5.91	5.81	6.00	5.81	5.99•	5.63
HS 500 – 1	5.87•	5.64	5.57	5.64	5.56•	5.04
HS 700 – 1	5.59	5.49	5.41	5.49	5.57	5.58

• Statistically superior, T-Test

CAPÍTULO 3

Inclusión de biocarbón de paja de trigo y cáscara de avellana en dieta de aves de postura y su efecto en parámetros productivos y ambientales

INTRODUCCIÓN

La ganadería es importante para la producción de alimentos y/o nutrientes, la generación de empleo, entre otros. Sin embargo, esta actividad requiere de grandes extensiones de suelo, agua, alimentos y además, se le adjudica el 18 % de las emisiones antropocéntricas de gases de efecto invernadero a nivel mundial (Herrero et al., 2009), siendo óxido nitroso (N₂O), dióxido de carbono (CO₂) y metano (CH₄) los principales (Anderson et al., 2021). El metano es uno de los gases de efecto invernadero con un alto potencial de calentamiento global, 28 veces más que el dióxido de carbono (IPCC, 2013) y sistemas productivos avícolas que acumulan las excretas favorecen condiciones anaeróbicas que potencian las emisiones de metano (Anderson et al., 2021).

La creciente demanda de alimentos entre los que está la producción de huevos y carne de aves, intensifica los sistemas de producción avícola, lo cual genera mayores cantidades de desechos producidos. Las excretas de las aves al tener una humedad cercana al 70 % (Li et al., 2021) dificulta su manejo, generando consecuencias como la contaminación de suelos y napas subterráneas, además de altas emisiones de amoníaco (NH₃) (Bist et al., 2023; Wongkiew et al., 2021).

Diversas tecnologías para mitigar las emisiones de gases contaminantes han sido objeto de investigación, ya sea mediante sistemas de limpieza del aire dentro de las instalaciones pecuarias, manejo de las excretas o aditivos dietarios sin afectar negativamente la producción (Opaliński et al., 2015). El biocarbón es un producto con un reciente interés científico como aditivo dietario en aves de postura. Se pueden encontrar varias definiciones de biocarbón que varían según el contexto, pero en general, una definición oficial de biocarbón fue propuesta por la *International Biochar Initiative* como “un material sólido que se obtiene de la

conversión termoquímica de la biomasa en un ambiente limitado de oxígeno” (IBI, 2015). A la fecha, escasa información se tiene sobre los efectos de biocarbón sobre parámetros productivos y ambientales cuando se incluye como aditivo dietario a las aves de postura. Dentro de la información existente, autores demostraron que hay efectos benéficos potenciales con el uso de este aditivo en aves de postura, por ejemplo, biocarbón de residuos verdes leñosos sometido a pirólisis de 550 °C tuvo efecto mejorando la tasa de conversión alimentaria y el peso de los huevos, pero que otros aspectos evaluados como la fuerza y el grosor de la cáscara, además de las unidades Haugh (UH) no fueron afectadas con la inclusión de biocarbón en la dieta (Prasai et al., 2017). Asimismo, Kalus et al. (2020b), analizaron las excretas de aves de postura con un máximo de 24 h cuando se incluyó biocarbón de madera de Haya con dosis de 1% y 2% en la dieta, con el objetivo de evidenciar disminución en la emanación de amoníaco. Sin embargo, no obtuvieron resultados positivos de interés, atribuyendo este resultado a la actividad microbiana presente en las excretas, ya que es difícil de controlar y predecir. Se ha encontrado que el biocarbón puede tener un efecto benéfico para las aves a nivel gastrointestinal al actuar sobre bacterias patógenas. Willson et al. (2019) encontraron que biocarbón de residuos verdes leñosos pirolizado a 550 °C incluido al 2% en la dieta de aves de postura provocó una disminución de bacterias patógenas como *Gallibacterium anatis* y otras del género *Campylobacter*. Sin embargo, hay que continuar las investigaciones para que su potencial aplicación en la dieta de aves de postura sea algo seguro y eficiente (Kalus et al., 2020a).

Dentro de las principales características del biocarbón está su capacidad de adsorción, atributo que le da esa potencialidad de ser utilizado como aditivo dietario. Sin embargo, hay que tener en consideración la literatura que indica que el biocarbón puede adsorber calcio cuando está como fosfato cálcico (CaHPO_4) (Wang et al., 2021).

Estos antecedentes indican una potencial utilidad del uso de biocarbón en sistemas de producción avícola con un enfoque sustentable, pero se requiere profundizar en los tipos de biocarbón, dosis y efectos en las aves donde se garantice la producción de alimentos con mínimo impacto al medio ambiente.

HIPÓTESIS

La utilización de biocarbón como aditivo dietario en aves de postura disminuye el nitrógeno amoniacal y metano en heces y, además, reduce los microorganismos patógenos en el tracto digestivo de gallinas ponedoras de sistemas tradicionales, sin afectar los parámetros productivos.

OBJETIVO GENERAL

Evaluar el uso de biocarbón como estrategia nutricional para la mitigación del impacto ambiental y mejora del sistema productivo de aves de postura bajo sistema tradicional.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Comparar el efecto de biocarbón como aditivo dietario proveniente de la paja de trigo con biocarbón proveniente cáscara de avellana europea sobre parámetros productivos (producción y calidad de huevo) y ambientales (calidad de heces) en aves de postura.
- Evaluar el efecto de biocarbón en la estabilidad de las excretas generadas y en las pérdidas de nitrógeno y metano de gallinas ponedoras de sistema tradicional.
- Evaluar cantidades de biocarbón en la dieta que permita mejorar la eficiencia productiva de las aves de postura.

MATERIALES Y MÉTODOS

Todos los procedimientos utilizados en el estudio actual han sido revisados y aprobados por el Comité de Bioética de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad de Concepción, Chile (CBE-14-23).

Obtención de biocarbón.

La metodología que existe en literatura (EBC, 2022; Yaashikaa et al., 2020) y que se aplicó para la producción de biocarbón se basa en el proceso de pirólisis. La biomasa utilizada fue paja de trigo (PT) y cáscara de avellana europea (CA). Estas materias primas fueron sometidas térmicamente en ausencia de oxígeno a una temperatura de 700°C.

La producción de biocarbón se llevó a cabo en la Unidad de Desarrollo Tecnológico (UDT) de la Universidad de Concepción, respetando los límites establecidos por la “European Biochar Certificate” (EBC, 2022).

Dentro de la caracterización fisicoquímica (Tabla 1) de los biocarbones del estudio, el pH y la conductividad fueron determinados acorde a la caracterización estándar establecida por la “International Biochar Initiative” (IBI, 2015). Para el índice de yodo, se llevó a cabo el método volumétrico del tiosulfato de sodio. El resultado fue expresado en miligramos de yodo adsorbidos en 1 g de biocarbón (Ferrer et al., 2023). Utilizando vasos precipitados con agua, las muestras de biocarbón fueron preparadas en diferentes combinaciones y proporciones para observar la capacidad de retención de agua. Todos los días se registró la altura del agua en cada vaso precipitado hasta que no se presentara cambios, con ello se calculó el porcentaje de retención de agua en función de la diferencia de peso (Shafie et al., 2012). La caracterización gravimétrica se llevó a cabo siguiendo las normas ASRM D1506 e ISO 562, mientras que la caracterización elemental se realizó en un analizador elemental Leco CHNS 628 y 628 S (Tabla 2). Estos análisis se llevaron a cabo en la Unidad de Desarrollo Tecnológico de la Universidad de Concepción, Concepción, Chile.

Tabla 1. Caracterización fisicoquímica de los biocarbones

Biocarbón	pH	Conductividad ($\mu\text{S cm}^{-1}$)	Índice de yodo (mg g^{-1})	Capacidad de retención de agua (%)
PT	8,8	76,7	130,0	158,7
CA	7,0	33,4	95,8	70,5

PT: paja de trigo, CA: cáscara de avellana europea

Tabla 2. Caracterización gravimétrica y elemental de los biocarbones

Biocarbón	Humedad (%)	Ceniza (%)	Volátiles (%)	C. fijo (%)	Análisis elemental (%)			
					C	H	N	O
PT	1,51	20,00	13,2	66,8	76,2	1,11	0,94	1,75
CA	0,96	1,75	12,6	85,7	95,3	1,27	0,51	1,17

PT: paja de trigo, CA: cáscara de avellana europea

Alojamiento de las aves.

La ubicación del gallinero está a 25 km al nororiente de la ciudad de Chillán, sector “Quinquhua”, lugar donde se ubica la Estación Experimental “Marcelo Tima Péndola”. Se trabajó en un galpón cerrado y aislado, provisto de luz artificial con la cual se programó 16 h de luz y 8 h de oscuridad. Se adaptó una batería de postura tradicional, configurándose en una disposición vertical. Abajo de cada jaula se dispuso una cinta continua para el desalojo de las excretas y encima de esta cinta se colocó una bandeja de la misma área de la jaula para el muestreo de excretas. Las dimensiones de las jaulas de postura fueron las siguientes: frente de 65 cm; fondo de 48,5 cm; altura de 37 cm; y área (frente por fondo) de 3.152 cm². Se llevó un registro diario de la temperatura ambiental. Se ofreció agua *ad libitum* a las aves durante todo el estudio.

Aves y Dieta.

La unidad experimental fue la jaula donde se alojaron 7 gallinas. Los tratamientos fueron 8 que se resumen en la Tabla 3. Se tuvo un total de 5 repeticiones, por lo que el total de aves en el estudio fue de 280. El modelo estadístico utilizado fue el siguiente:

$$Y_{ij} = \mu + \tau_i + \varepsilon_{ij}$$

En donde Y_{ij} es el valor observado o variable respuesta con el tratamiento, μ es la media general, T_i es el efecto del tratamiento y E_{ij} es el efecto del error experimental.

Se trabajó con aves de postura Hy-Line de 49 semanas de edad. En total fueron 8 semanas de trabajo. Las primeras 2 fueron para acostumbramiento de las aves a la dieta y a las jaulas y en las 6 semanas restantes se evaluaron los parámetros productivos y ambientales.

Tabla 3. Tratamientos considerados en el experimento con las aves de postura

Tratamientos	Contenido
Control	Dieta Base
Zeolita	Dieta base + 0,3% zeolita
PT 0,3	Dieta base + 0,3% biocarbón paja de trigo
PT 1	Dieta base + 1% biocarbón paja de trigo
PT 2	Dieta base + 2% biocarbón paja de trigo
CA 0,3	Dieta base + 0,3 % biocarbón cáscaras de avellana
CA 1	Dieta base + 1 % biocarbón cáscaras de avellana
CA 2	Dieta base + 2 % biocarbón cáscaras de avellana

Todas las aves fueron alimentadas con la misma dieta base formulada acorde con los requerimientos nutricionales de aves de esta línea genética. Las dietas utilizadas fueron dietas tipo para esta ave ponedora y nivel productivo en sistemas

de producción intensiva (Tabla 4). La composición nutricional de la dieta se presenta en la Tabla 5.

Tabla 4. Ingredientes que componen la dieta base

Ingredientes	g ave⁻¹
Maíz	74,8
Soya	18,81
Conchuela	9,9
Harina de pescado	4,4
Fosfato bicálcico	1,54
Sal	0,22
Minerales	0,11
Vitaminas	0,22
Metionina	0,11
Cantidad total de alimento	110

Tabla 5. Contenido nutricional de la dieta base (g 100 g⁻¹)

Contenido nutricional	g 100 g⁻¹
Energía metabolizable Mcal 100 g ⁻¹	2,436
Proteína cruda	16,064
Fibra cruda	2,059
Extracto etéreo	2,868
Cenizas totales	16,179
Extractos no nitrogenados	62,829

Parámetros evaluados.

Para determinar los efectos de biocarbón como aditivo dietario en un plantel avícola con aves de postura, se evaluaron parámetros de producción, de calidad del huevo y de calidad de heces.

- Producción: El número de huevos se registró diariamente, el consumo diario de alimentos por jaula, estimado en unidad de ave se registró día por medio para cada unidad experimental. Con estos datos se obtuvo el rendimiento total de huevos por ave, porcentaje diario de huevos, rendimiento de huevo masa (porcentaje de postura por peso promedio de huevos), consumo de alimento, conversión alimentaria y eficiencia alimenticia.
- Calidad del huevo: Al principio, mitad y al final del periodo experimental, vale decir semana N°1, N°3 y N°6 se seleccionaron 2 huevos por unidad experimental en donde se evaluó: peso del huevo, altura de albúmina, color de yema, unidades Haugh, fuerza de ruptura de cáscara, grosor de cáscara e índice de yema. Estas mediciones fueron llevadas a cabo mediante la utilización de un Medidor digital de huevo, equipo DET6500 (Nabel, Japón).
- Calidad de heces:
 - Materia seca: En base a lo descrito por Cano-Hernández et al. (2016), se determinó la materia seca de las excretas por el método gravimétrico. Esto se realizó en la semana N°5 y el mismo día para la semana N°6 del ensayo. Se recolectó de cada unidad experimental una muestra de excreta, las cuales se guardaron separadamente en una bolsa de polietileno con cierre hermético y se transportaron inmediatamente en frío en una caja aislada térmicamente al laboratorio para su análisis. Para proceder, las muestras de excreta se cambiaron a una bolsa de papel Kraft y se registró su peso inicial usando una balanza analítica; luego, las muestras fueron secadas en un horno, a 105 °C por 48 h y se registró el peso de salida. Con las diferencias del peso inicial y final se obtuvo el contenido de humedad retenida en cada muestra, y por diferencia, el contenido de materia seca, el cual se expresó en porcentaje.
 - Nitrógeno: Para determinar el N-amoniaco se recogió una muestra de excreta de cada unidad experimental semanalmente por el

periodo de 6 semanas, desde el centro de la bandeja recolectora de estas y se guardaron en tubos Falcon de 50 mL con tapa rosca. Inmediatamente, las muestras se transportaron al laboratorio y se refrigeraron a -20°C hasta el análisis de N-NH_3 .

Una vez descongelada la muestra, se separó el sobrenadante, del cual se tomó una alícuota de 2,5 mL y se dispuso en un tubo Eppendorf, luego se centrifugó a $1.400 \times g$ por 20 minutos para aclarar el extracto. Posteriormente, se realizó una dilución de 1:40 considerando 0,25 mL de sobrenadante y 9,75 mL de agua destilada. De la dilución se tomó una alícuota de 100 μL a la cual se le agregó 4 mL de fenol y 4 mL de hipoclorito de sodio lo cual terminó en un compuesto de color azul, cuya absorbancia se leyó en espectrofotómetro UV visible Spectroquant $\text{\textcircled{R}}$ Pharo 400 a una longitud de onda de 625 nm. Las lecturas de absorbancia fueron establecidas dentro de la siguiente curva de concentración de amonio, con $R^2 = 0,9981$

$$y = 0,03x + 0,0635$$

- Metano: Al final del experimento, se seleccionaron 3 unidades experimentales (jaulas) al azar de cada tratamiento, en las cuales se recolectó la excreta de hasta 24 h en envases de vidrio herméticamente cerrados. Los envases se transportaron inmediatamente al laboratorio a temperatura ambiente. Con una balanza se pesó 25 g de cada muestra y se incubó a 25°C (Roy y Kashem, 2014). A las 6, 24 y 48 h de incubación, se midió el volumen de gas generado por la muestra utilizando un aparato de desplazamiento de agua (Fedorah y Hrudey, 1983). Además, se extrajo una muestra de gas por medio de una jeringa hermética y se guardó en un exetainer (Labco Ltd., High Wycombe, UK) para

analizar la cantidad de metano que emitió la muestra de excreta, utilizando cromatografía de gases (Agilent 7890B, Agilent Technologies, Inc., Santa Clara, USA) (Suescun-Ospina et al., 2022).

Análisis de datos.

El diseño del experimento fue completamente al azar. Los datos obtenidos fueron sometidos a un análisis de varianza (ANDEVA). Cuando correspondió, se realizaron pruebas de contraste con la prueba Duncan, con un nivel de significancia de $P \leq 0,05$. Para aquellos datos que no cumplieron con los supuestos de ANDEVA, se realizó transformación con la fórmula $1 \times^{-1}$ (Nunes et al., 2018). En aquellos casos que no fue posible corroborar los supuestos, se realizó la Prueba de Kruskal-Wallis. Estos análisis se realizaron con el software estadístico INFOSTAT.

RESULTADOS

Las aves estuvieron sanas durante todo el ensayo, lo cual se reflejó en términos de supervivencia, solo falleció un ave en los tratamientos con Zeolita, PT 0,3; y PT 2%. El valor de supervivencia fue igual o superior al 97% para todos los tratamientos. Los decesos se pueden atribuir principalmente a muerte natural, sin causa patológica. Otros estudios de inclusión de biocarbón de diferente materia prima también alcanzan valores de supervivencia por sobre el 95% (Prasai et al., 2017), lo cual indica que este producto no afecta la salud de las aves. En general ya sea con o sin aditivo dietario en aves de postura, se considera que una supervivencia igual o superior al 95% es un buen indicador (Kumar y Bhattacharya, 2019).

Parámetros productivos.

Los parámetros de producción de las aves obtenidos en este estudio se presentan en la Tabla 6. En términos simples, los parámetros productivos consideran

producto e insumo, lo que en este contexto son huevos producidos y cantidad de ración entregada.

Tabla 6. Parámetros de producción de las aves de postura Hy-Line sometidas a 3 concentraciones de biocarbón obtenidos de paja de trigo y cáscara de avellana europea a 700°C.

Tratamiento	Producción promedio diaria de huevos (% ave ⁻¹ día ⁻¹)	Rendimiento de huevo masa (g ave ⁻¹ día ⁻¹)	Consumo alimento (g ave ⁻¹ día ⁻¹)*	Conversión alimentaria (g g ⁻¹)	Eficiencia alimenticia (g ave ⁻¹ día ⁻¹)
Control	89,05%	57,71 a	106,55	1,85	31,42
Zeolita	86,65%	56,18 abc	108,28	1,94	29,32
PT 0,3	83,20%	52,51 bc	105,19	1,89	28,17
PT 1	79,52%	51,46 c	106,21	2,07	25,02
PT 2	82,79%	52,28 bc	106,25	2,04	25,91
CA 0,3	86,33%	57,84 a	104,71	1,82	32,12
CA 1	84,56%	53,37 abc	106,86	2,02	26,85
CA 2	89,59%	57,23 ab	102,85	1,80	32,16
Valor-p		0,0214	0,9791	0,1707	0,0644

PT: paja de trigo, CA: cáscara de avellana europea. Letras iguales en sentido vertical indican que no hay diferencias entre tratamientos. *Se realizó análisis no paramétrico

Respecto al rendimiento de huevo masa, los tratamientos con zeolita y biocarbón de cáscara de avellana en todas sus dosis obtuvieron el mismo efecto ($P > 0,05$). Por otra parte, para biocarbón PT 1 se tuvo numéricamente el valor más bajo. Sin embargo, al considerar el consumo de alimento y la conversión alimentaria, no hubo diferencias significativas. La eficiencia alimenticia de todos los tratamientos fue estadísticamente igual al grupo control (Tabla 6).

Calidad del huevo

En la Tabla 7 se observan los resultados obtenidos referentes a calidad de huevo de las aves de postura alimentadas con y sin biocarbón, para la primera, tercera y sexta semana de ensayo.

Respecto al peso del huevo, ninguno de los tres periodos evaluados se evidenció diferencias significativas. Si se considera la norma USDA, los huevos están entre la clasificación “Grande” y “Extragrande”.

La altura de la albúmina y las unidades Haugh tampoco presentaron un efecto de los tratamientos que consideraban biocarbón (Tabla 7) ($P > 0,05$).

Un aspecto visual importante para la decisión de compra de huevos es el color de la yema, el cual con biocarbón de cáscara de avellana a dosis intermedia fue superior, encontrándose de 0,6 hasta 0,8 puntos por sobre el control, pero a su vez, el biocarbón de paja de trigo en la dosis más elevada, causó un decrecimiento en este indicador, encontrándose hasta por 1,1 puntos de color por debajo que el control.

La fuerza de cáscara y el grosor de cáscara son aspectos muy importantes de medir, ya que, el biocarbón por tener capacidad de adsorción de compuestos, podría interferir en la absorción de calcio, elemento necesario para formar el cascarón del huevo. Sin embargo, tal como se aprecia en la Tabla 7, no hay una disminución que sea constante y significativa en la fuerza de ruptura de la cáscara ni en el grosor de cáscara del huevo, asumiendo que no hubo efecto de los tratamientos en la absorción de este elemento.

Finalmente, respecto al índice de yema, sólo biocarbón PT 2 y CA 2 fueron significativamente superiores en el primer periodo evaluado, pero en los otros dos períodos estudiados no se obtienen diferencias respecto al control.

Tabla 7. Atributos de calidad de huevos de aves de postura Hy-Line sometidas a 3 concentraciones de biocarbón obtenidos de paja de trigo y cáscara de avellana europea a 700°C.

Tratamiento	P (g)	AA (mm)*	CY*	UH*	FC (Kgf)	GC (mm)**	IY**
Semana inicial							
Control	63,81	8,30	7,90 ab	89,50	4,06	0,45 a	0,4258 b
Zeolita	65,64	8,62	7,90 b	91,39	4,27	0,37 b	0,4279 b
PT 0,3	63,14	8,76	8,00 ab	92,79	3,65	0,35 b	0,4304 b
PT 1	63,33	8,17	7,90 ab	88,75	3,97	0,36 b	0,4314 b
PT 2	64,54	8,52	6,80 c	90,95	4,02	0,35 b	0,4788 a
CA 0,3	69,26	8,60	7,11 bc	90,89	4,24	0,38 b	0,4423 b
CA 1	64,22	7,50	8,70 a	84,25	4,30	0,36 b	0,4280 b
CA 2	63,13	9,06	7,70 bc	94,16	4,39	0,35 b	0,4500 ab
Valor-p	0,1869	0,1751	0,0015	0,1136	0,5149	0,0001	0,0159
Semana intermedia							
Control	64,81	7,96	6,9 ab	87,22	4,17	0,36	0,4081
Zeolita	63,87	8,02	6,5 b	88,21	4,24	0,37	0,4325
PT 0,3	63,16	8,21	6,3 b	88,97	3,79	0,36	0,4213
PT 1	64,14	8,50	6,9 ab	91,02	4,43	0,37	0,4391

PT: paja de trigo, CA: cáscara de avellana. P, peso del huevo; AA, altura albúmina; CY, color de yema; UH, unidades Haugh; FC, Fuerza de ruptura de la cáscara; GC, grosor cáscara; IY, índice de yema. Letras iguales en sentido vertical indican que no hay diferencias entre tratamientos. *Se realizó Prueba de Kruskal-Wallis. **Para cumplir supuestos de ANDEVA se transformaron los datos con 1/x

Tabla 7 (continuación). Atributos de calidad de huevos de aves de postura Hy-Line sometidas a 3 concentraciones de biocarbón obtenidos de paja de trigo y cáscara de avellana europea a 700°C.

Tratamiento	P (g)	AA (mm)*	CY*	UH*	FC (Kgf)	GC (mm)**	IY**
PT 2	60,67	8,84	6,8 b	93,73	3,52	0,34	0,4270
CA 0,3	66,16	7,98	6,9 ab	86,37	4,45	0,36	0,4250
CA 1	62,38	8,36	7,6 a	90,76	4,66	0,37	0,4200
CA 2	65,52	8,40	6,9 ab	90,14	4,02	0,36	0,4360
Valor-p	0,0545	0,7389	0,0080	0,3885	0,1089	0,2350	0,1902
Semana final							
Control	65,82	8,02	6,5 abc	87,87	4,02	0,37	0,453
Zeolita	65,00	8,26	6,5 abc	89,21	3,66	0,36	0,427
PT 0,3	63,05	8,38	6,2 c	90,67	4,16	0,37	0,415
PT 1	66,65	8,44	7,0 ab	89,79	3,96	0,34	0,427
PT 2	64,23	8,55	6,0 c	90,98	4,16	0,35	0,429
CA 0,3	65,57	7,39	6,2 bc	84,29	4,50	0,36	0,401
CA 1	62,75	7,69	7,1 a	86,90	4,40	0,36	0,417
CA 2	62,97	7,48	6,3 abc	83,90	4,01	0,35	0,410
Valor-p	0,2279	0,0938	0,0497	0,1120	0,4938	0,4710	0,0559

PT: paja de trigo, CA: cáscara de avellana. P, peso del huevo; AA, altura albúmina; CY, color de yema; UH, unidades Haugh; FC, Fuerza de ruptura de la cáscara; GC, grosor cáscara; IY, índice de yema. Letras iguales en sentido vertical indican que no hay diferencias entre tratamientos. *Se realizó Prueba de Kruskal-Wallis. **Para cumplir supuestos de ANDEVA se transformaron los datos con $1/x$

Calidad de Heces

El contenido de materia seca, de nitrógeno amoniacal y de metano emanado de las excretas, se presentan en la Tabla 8. Para analizar el comportamiento que tuvieron en el tiempo los gases, se registraron semanalmente las emisiones de nitrógeno amoniacal (Figura 1) y de metano obteniendo un flujo hasta las 48 h post incubación (Figura 2). No hubo un efecto de los tratamientos de biocarbón utilizados en el porcentaje de materia seca de las excretas ($P>0,05$). Respecto al nitrógeno amoniacal, adicionar biocarbón de paja de trigo al 2 % en la dieta causó una disminución en la emanación de este gas. En el caso del metano, el efecto de casi todos los tratamientos no se diferenció del control a excepción del biocarbón de cáscara de avellana al 2 %, que aumentó la emanación.

Tabla 8. Contenido de materia seca (%), nitrógeno amoniacal (g kg MS^{-1}) y metano (mg g MS^{-1}) de las excretas de aves de postura Hy-Line sometidas a 3 concentraciones de biocarbón obtenidos de paja de trigo y cáscara de avellana europea a 700°C .

Tratamiento	Materia seca excreta (%)	N-NH ₃ (g kg MS^{-1})	CH ₄ (mg g MS^{-1})
Control	30,45	1,00 ab	0,0075 b
Zeolita	31,34	1,02 ab	0,0199 b
PT 0,3	31,08	0,83 bc	0,0103 b
PT 1	31,49	0,82 bc	0,0109 b
PT 2	31,91	0,71 c	0,0144 b
CA 0,3	29,96	1,05 ab	0,0188 b
CA 1	33,08	1,01 ab	0,0123 b
CA 2	29,91	1,13 a	0,0427 a
Valor-P	0,3955	0,0282	0,0335

PT: paja de trigo, CA: cáscara de avellana europea. Letras iguales en sentido vertical indican que no hay diferencias entre tratamientos.

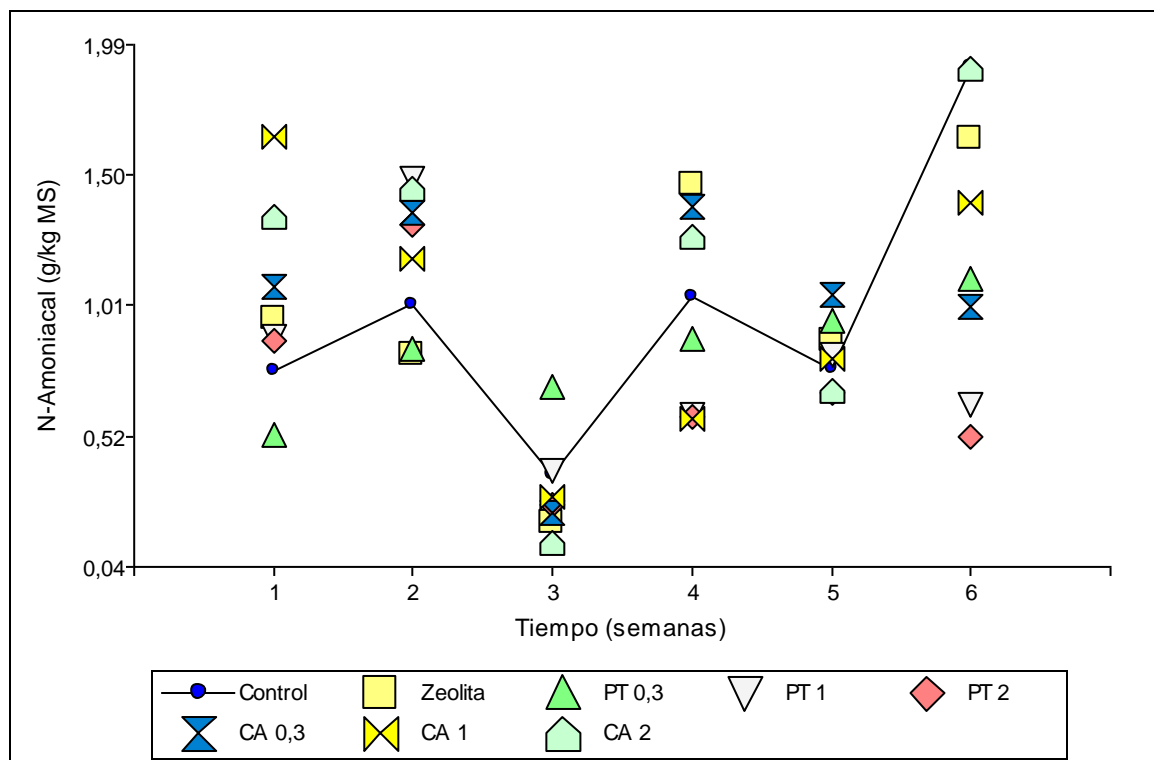


Figura 1. Emanaciones de nitrógeno amoniacal desde las excretas de las aves alimentadas con las dietas experimentales en un total de seis semanas. PT: biocarbón de paja de trigo, CA: biocarbón de cáscara de avellana europea. Los números en la leyenda representan la dosis de biocarbón en la dieta de las aves

DISCUSIÓN

El índice de supervivencia de las aves utilizadas en el estudio fue superior al reportado en la literatura (Prasai et al., 2017), esto implica que el estado sanitario de las aves se mantuvo favorable y constante, lo cual demuestra que los tratamientos evaluados no impactaron en este parámetro.

En los parámetros productivos, sólo en el rendimiento de huevo masa se obtuvo que el uso de biocarbón de paja de trigo en sus tres concentraciones fue inferior al control. Por otro lado, tanto el consumo de alimentos, como la conversión alimentaria, no presentaron diferencias entre los tratamientos. Hay estudios donde se demuestra que el uso de biocarbón afecta positivamente los parámetros productivos de aves de postura como el caso de Prasai et al. (2017), en donde se trabajó con

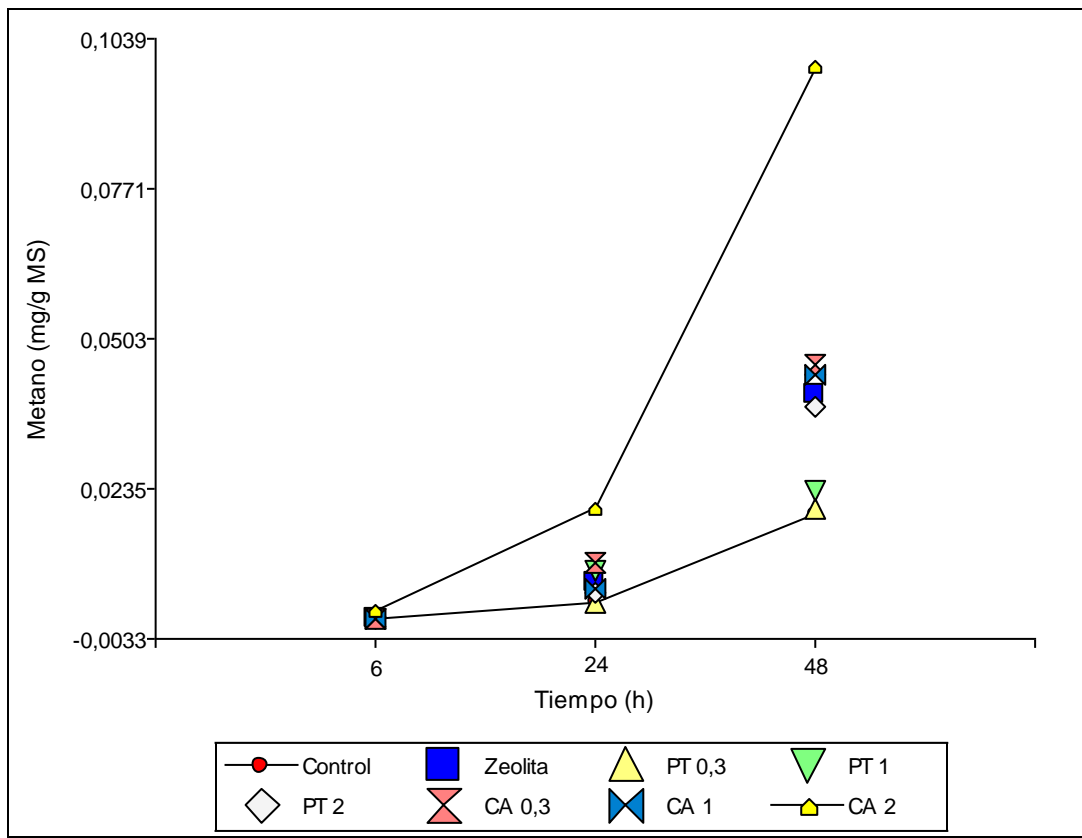


Figura 2. Emanaciones de metano desde las excretas de las aves alimentadas con las dietas experimentales producto de las incubaciones a 6, 24 y 48 h. PT: biocarbón de paja de trigo, CA: biocarbón de cáscara de avellana europea. Los números en leyenda representan la dosis de biocarbón en la dieta de las aves.

biocarbón de residuos verdes leñosos con pirólisis de 500 °C y se observó una mejora en la producción de huevos, específicamente en el rendimiento de huevo masa. Pese a lo anterior, se tiene que, debido a las diferentes calidades de cada biocarbón, hay una amplia diversidad de respuestas que se pueden obtener, donde no siempre permiten mejorar la productividad (Kalus et al., 2020b). En el estudio de Goiri et al. (2021) se utilizó astillas de madera como materia prima y se realizó una pirólisis de 800 °C. En este caso, se tuvieron resultados positivos en los parámetros de producción en aves, destacándose una mejora (reducción) en la conversión alimentaria, pero se atribuyó a que el biocarbón fue previamente tratado biológicamente con probióticos para suministrar como aditivo dietario. Este antecedente, en conjunto con dendrograma (capítulo 2, Figura 1) que muestra un alto

nivel de similitud genética entre las especies bacterianas presentes en las aves de postura alimentadas con distintos biocarbones en sus dietas, permiten inferir que en el presente estudio no se generó un cambio suficiente en la población bacteriana gastrointestinal de las aves de postura como para que se reflejara en un beneficio en términos de parámetros de producción. Es importante destacar que en general, los parámetros de producción tampoco decrecieron con la adición de estos aditivos.

Para realizar un análisis de calidad de huevo, no bastan solo parámetros básicos como peso del huevo, se deben considerar aspectos más complejos como índice de yema que sirve para analizar frescor del huevo y unidades Haugh como una forma de estudiar la calidad interna del huevo.

Luego de dos semanas de haber iniciado el ensayo, se evidenció que en la primera semana de evaluación se produjo diferencia significativa en color de yema, grosor de cáscara e índice de yema, pero con el paso de las semanas estos indicadores comienzan a dejar de presentar diferencias entre los distintos tratamientos con excepción de uno. El color de la yema continuó con resultados disímiles en donde se tuvo los valores más bajos con el biocarbón de paja de trigo al 2%. Pese a lo anterior todos los tratamientos tuvieron un color de yema por sobre el mínimo aceptable, el cual es sobre 4.0 dentro de la escala del abanico de colores de yema (Tang et al., 2015). Las unidades Haugh no fueron afectadas por la inclusión de biocarbón en la dieta, indistintamente de la materia prima o de la dosis utilizada, pero cabe destacar que los valores obtenidos están por sobre 72 UH, valor propuesto por el Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (USDA) que indica una calidad interna óptima del huevo (Arthur y O'Sullivan, 2005). Es relevante establecer que el uso de biocarbón como aditivo dietario no impacta negativamente las unidades Haugh, ya que este parámetro se ve afectado por pérdidas de agua (Giampietro-Ganeco et al., 2012) y es sabido que el biocarbón se caracteriza entre otras cosas por tener capacidad de retención de agua. En general, no es de extrañar que las unidades Haugh no se vean afectadas, ya que según Luo et al. (2020) el principal factor que genera un efecto negativo en este indicador es la temperatura de almacenamiento del huevo. Es importante considerar que en promedio la

temperatura ambiente del estudio fue de 16 °C y 29 °C como mínima y máxima respectivamente.

La cáscara del huevo es un aspecto clave en la comercialización, distribución y aceptación del huevo. Estudios sobre biocarbón realizados fuera del ámbito ganadero informan que el calcio puede ser adsorbido por la superficie del biocarbón gracias a una atracción electrostática (Xue et al., 2021). Al analizar los resultados, se puede inferir que el biocarbón no estaría afectando el calcio presente en la dieta, que se utiliza para la formación de la cáscara de huevo, ya que tanto la fuerza de ruptura de cáscara como el grosor de esta no se vieron afectados a mitad y final del ensayo. Lo anterior indica que el biocarbón se puede utilizar en la alimentación de aves de postura sin efectos negativos para la calidad de huevo en términos de calcio en cáscara. Una de las causas que explicaría por qué el calcio no se estaría afectando, es que las partículas del mismo, presentes en la dieta de aves de postura son grandes comparadas con las partículas de biocarbón, encontrándose entre 0 a 4 mm (De Cristofaro, 2017).

La menor emanación de nitrógeno amoniacal desde excretas provenientes de aves alimentadas con biocarbón de paja de trigo, en especial al 2% en la dieta, radica en que al tener este mayor índice de yodo y mayor capacidad de retención de agua (Tabla 1), podría traducirse en una mayor adsorción de gases en la superficie del biocarbón tal como han indicado algunos autores (Prasai et al., 2017). Otros autores demostraron que el biocarbón de paja de trigo alcanza su máximo valor de superficie específica a los 600 °C, obteniendo 438 m² g⁻¹ (Chun et al., 2004), mientras que, para el caso de la cáscara de avellana, el valor máximo se da a los 800°C obteniendo solo 197 m² g⁻¹ (Zhao et al., 2020), por lo que con estos antecedentes se refuerza la idea de que el potencial de adsorción de nitrógeno amoniacal está ligado a la superficie específica que presenta biocarbón de paja de trigo obtenido a 700°C. A pesar de lo anterior, también se tiene que, en los resultados de secuenciación de ADN 16S presentados en el capítulo 2 (Figura 2) realizados a muestras obtenidas de la cloaca de las gallinas de este estudio, se evidenció una mayor abundancia relativa de la bacteria *Bacteroides fragilis* para el tratamiento de biocarbón de paja de trigo al 2 % en la dieta, bacteria que puede utilizar el amoníaco como fuente de nitrógeno

(Yamamoto et al., 1984). Es por esto por lo que habría una relación entre la abundancia relativa bacteriana a nivel gastrointestinal con las emanaciones de amoníaco desde las excretas, pero lo anterior requiere de mayor profundización científica.

No hubo diferencias entre tratamientos en el metano emanado de las excretas, salvo con biocarbón de cáscara de avellana al 2%, que genera una mayor emanación y como se aprecia en la Figura 2, la emanación generada por este tratamiento tiene un comportamiento cercano a logarítmico. El biocarbón al tener la capacidad de ser un hábitat para los microorganismos debido a su porosidad, este podría también ser colonizado por arqueas metanogénicas (Qiu et al., 2019). Estos son microorganismos procariontes, los cuales viven en un ambiente anaeróbico y se caracterizan por su producción de metano como forma de obtener energía. Autores aseguran que el grado de adsorción de metano en los microporos de los biocarbones es mucho más fuerte en comparación con los meso y/o macroporos (Sadasivam y Reddy, 2015). Si bien en este estudio no se evaluó la distribución de porosidad, el índice de yodo puede ser tomado como punto de referencia para concluir que la adsorción por parte de biocarbón de cáscara de avellana es más débil comparado con biocarbón de paja de trigo, sumado a que el biocarbón de cáscara de avellana al tener menor porosidad y superficie específica, contribuiría a una condición de anaerobiosis, sobre todo cuando la dosis de este biocarbón es más alta (2 %).

CONCLUSIONES

La incorporación de biocarbón de paja de trigo y cáscara de avellana europea a la dieta de las aves de postura no afecta los parámetros de producción y de calidad de huevo en las condiciones evaluadas. El calcio presente en la dieta de las aves no estaría siendo adsorbido por biocarbón, ya que el grosor y fuerza de cáscara no se vieron afectados.

En términos ambientales, el biocarbón de paja de trigo disminuyó la emanación de nitrógeno amoniacal desde las excretas de las aves logrando al 2 % de este aditivo la emanación más baja, mientras que en la emanación de metano no hubo efecto, salvo para biocarbón de cáscara de avellana al 2 % en la dieta que lo aumentó.

Este trabajo sirve de base para futuros ensayos experimentales de biocarbón en aves de postura en donde pueden considerarse períodos de tiempo más prolongados o utilizar mezclas de diferentes tipos biocarbón en la dieta.

REFERENCIAS

Anderson, K., Moore, P. A., Martin, J., Ashworth, A. J., Anderson, K. ;, Moore, P. A. ;, Martin, J. ;, & Ashworth, A. J. (2021). Evaluation of a Novel Poultry Litter Amendment on Greenhouse Gas Emissions. *Atmosphere* 2021, Vol. 12, Page 563, 12(5), 563. <https://doi.org/10.3390/ATMOS12050563>

Arthur, J. A., & O'Sullivan, N. (2005). Breeding chickens to meet egg quality needs. *International Hatchery Practice*, 19(7), 7–11.

Bist, R. B., Subedi, S., Chai, L., & Yang, X. (2023). Ammonia emissions, impacts, and mitigation strategies for poultry production: A critical review. *Journal of Environmental Management*, 328, 116919. <https://doi.org/10.1016/J.JENVMAN.2022.116919>

Cano-Hernández, M., Bennet-Eaton, A., Silva-Guerrero, E., Robles-González, S., Sainos-Aguirre, U., & Castorena-García, H. (2016). Caracterización de bioles de la fermentación anaeróbica de excretas bovinas y porcinas. *Agrociencia*, 50(4), 471–479.

Chun, Y., Sheng, G., Chiou, G. T., & Xing, B. (2004). Compositions and sorptive properties of crop residue-derived chars. *Environmental science & technology*, 38(17), 4649–4655. <https://doi.org/10.1021/ES035034W>

De Cristofaro, A. M. (2017). Importancia del calcio y fósforo en la formación de la cáscara de huevo en gallinas ponedoras (Doctoral dissertation, Universidad Nacional de La Plata).

EBC. (2022). *European Biochar Certificate - Guidelines for a Sustainable Production of Biochar*. <http://european-biochar.org>

Fedorah, P. M., & Hruday, S. E. (1983). A simple apparatus for measuring gas production by methanogenic cultures in serum bottles. *Environmental Technology*, 4(10), 425–432.

Ferrer, V., Flores, M., Grandón, H., Escalona, N., & Segura, C. (2023). Ammonia Removal in Activated Carbons Prepared from Olive Oil Industry Waste. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 34, 287–301.

Giampietro-Ganeco, A., Scatolini-Silva, A. M., Borba, H., Boiago, M. M., Lima, T. M. A., & Souza, P. A. (2012). Comparative Study Of Quality Characteristics Of Egg Stored In Domestic Refrigerators. *Ars Veterinaria*, 28(2), 100–104.

Goiri, I., Ruiz, R., Atxaerandio, R., Lavin, J. L., Díaz de Otálora, X., & García-Rodríguez, A. (2021). Assessing the potential use of a feed additive based on biochar on broilers feeding upon productive performance, pH of digestive organs, cecum fermentation and bacterial community. *Animal Feed Science and Technology*, 279, 115039. <https://doi.org/10.1016/J.ANIFEEDSCI.2021.115039>

Herrero, M., Thornton, P. K., Gerber, P., & Reid, R. S. (2009). Livestock, livelihoods and the environment: understanding the trade-offs. *Current Opinion in Environmental Sustainability*, 1(2), 111–120. <https://doi.org/10.1016/J.COSUST.2009.10.003>

IBI. (2015). Standardized Product Definition and Product Testing Guidelines for Biochar That Is Used in Soil. *International Biochar Initiative*. <http://www.biochar-international.org/characterizationstandard>.

IPCC, A. (2013). Climate change 2013: the physical science basis. *Contribution of working group I to the fifth assessment report of the intergovernmental panel on climate change*, 1535.

Kalus, K., Konkol, D., Korczyński, M., Koziel, J. A., & Opaliński, S. (2020a). Effect of Biochar Diet Supplementation on Chicken Broilers Performance, NH₃ and Odor Emissions and Meat Consumer Acceptance. *Animals* 2020, Vol. 10, Page 1539, 10(9), 1539. <https://doi.org/10.3390/ANI10091539>

Kalus, K., Konkol, D., Korczyński, M., Koziel, J. A., & Opaliński, S. (2020b). Laying Hens Biochar Diet Supplementation—Effect on Performance, Excreta N Content, NH₃ and VOCs Emissions, Egg Traits and Egg Consumers Acceptance. *Agriculture* 2020, Vol. 10, Page 237, 10(6), 237. <https://doi.org/10.3390/AGRICULTURE10060237>

Kumar, I., & Bhattacharya, J. (2019). Assessment of the role of silver nanoparticles in reducing poultry mortality, risk and economic benefits. *Applied Nanoscience (Switzerland)*, 9(6), 1293–1307. <https://doi.org/10.1007/S13204-018-00942-X/METRICS>

Li, M. X., He, X. S., Tang, J., Li, X., Zhao, R., Tao, Y. Q., Wang, C., & Qiu, Z. P. (2021). Influence of moisture content on chicken manure stabilization during microbial agent-enhanced composting. *Chemosphere*, 264, 128549. <https://doi.org/10.1016/J.CHEMOSPHERE.2020.128549>

Luo, W., Xue, H., Xiong, C., Li, J., Tu, Y., & Zhao, Y. (2020). Effects of temperature on quality of preserved eggs during storage. *Poultry Science*, 99(6), 3144–3157. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.psj.2020.01.020>

Nunes, R. V., Broch, J., Wachholz, L., De Souza, C., Damasceno, J. L., Oxford, J. H., ... Pesti, G. M. 2018. Choosing sample sizes for various blood parameters of broiler chickens with normal and non-normal observations. *Poultry science*, 97(10), 3746-3754.

Opaliński, S., Korczyński, M., Szoltysik, M., Dobrzański, Z., & Kołacz, R. (2015). Application of aluminosilicates for mitigation of ammonia and volatile organic compound emissions from poultry manure. *Open Chemistry*, 13(1), 967–973. <https://doi.org/10.1515/CHEM-2015-0115/MACHINEREADABLECITATION/RIS>

Prasai, T. P., Walsh, K. B., Midmore, D. J., Bhattarai, S. P., Prasai, T. P., Walsh, K. B., Midmore, D. J., & Bhattarai, S. P. (2017). Effect of biochar, zeolite and bentonite feed supplements on egg yield and excreta attributes. *Animal Production Science*, *58*(9), 1632–1641. <https://doi.org/https://doi.org/10.1071/AN16290>

Qiu, L., Deng, Y. F., Wang, F., Davaritouchaee, M., & Yao, Y. Q. (2019). A review on biochar-mediated anaerobic digestion with enhanced methane recovery. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, *115*, 109373. <https://doi.org/10.1016/J.RSER.2019.109373>

Roy, S., & Kashem, Md. A. (2014). Effects of Organic Manures in Changes of Some Soil Properties at Different Incubation Periods. *Open Journal of Soil Science*, *2014*(03), 81–86. <https://doi.org/10.4236/OJSS.2014.43011>

Sadasivam, B. Y., & Reddy, K. R. (2015). Adsorption and transport of methane in landfill cover soil amended with waste-wood biochars. *Journal of Environmental Management*, *158*, 11–23. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2015.04.032>

Shafie, S. T., Salleh, M. M., Hang, L. L., Rahman, M., & Ghani, W. (2012). Effect of pyrolysis temperature on the biochar nutrient and water retention capacity. *Journal of purity, utility reaction and environment*, *1*(6), 293–307.

Suescun-Ospina, S. T., Vera, N., Astudillo, R., Yunda, C., Williams, P., Allende, R., & Ávila-Stagno, J. (2022). Effects of País grape marc inclusion in high and low forage diets: ruminal fermentation, methane production and volatile fatty acids, *21*(1), 924–933. <https://doi.org/10.1080/1828051X.2022.2076620>

Tang, S. G. H., Sieo, C. C., Kalavathy, R., Saad, W. Z., Yong, S. T., Wong, H. K., & Ho, Y. W. (2015). Chemical Compositions of Egg Yolks and Egg Quality of Laying Hens Fed Prebiotic, Probiotic, and Synbiotic Diets. *Journal of Food Science*, *80*(8), C1686–C1695. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.12947>

Wang, Z., Miao, R., Ning, P., He, L., & Guan, Q. (2021). From wastes to functions: A paper mill sludge-based calcium-containing porous biochar adsorbent for phosphorus removal. *Journal of Colloid and Interface Science*, *593*, 434–446. <https://doi.org/10.1016/J.JCIS.2021.02.118>

Willson, N. L., Van, T. T. H., Bhattarai, S. P., Courtice, J. M., McIntyre, J. R., Prasai, T. P., Moore, R. J., Walsh, K., & Stanley, D. (2019). Feed supplementation with biochar may reduce poultry pathogens, including *Campylobacter hepaticus*, the causative agent of Spotty Liver Disease. *PLOS ONE*, *14*(4), e0214471. <https://doi.org/https://doi.org/10.1371/journal.pone.0214471>

Wongkiew, S., Koottatep, T., Polprasert, C., Prombutara, P., Jinsart, W., & Khanal, S. K. (2021). Bioponic system for nitrogen and phosphorus recovery from chicken

manure: Evaluation of manure loading and microbial communities. *Waste Management*, 125, 67–76. <https://doi.org/10.1016/J.WASMAN.2021.02.014>

Xue, J., Wang, H., Li, P., Zhang, M., Yang, J., & Lv, Q. (2021). Efficient reclaiming phosphate from aqueous solution using waste limestone modified sludge biochar: Mechanism and application as soil amendments. *Science of The Total Environment*, 799, 149454. <https://doi.org/10.1016/J.SCITOTENV.2021.149454>

Yaashikaa, P. R., Kumar, P. S., Varjani, S., & Saravanan, A. (2020). A critical review on the biochar production techniques, characterization, stability and applications for circular bioeconomy. *Biotechnology Reports*, 28, e00570. <https://doi.org/10.1016/J.BTRE.2020.E00570>

Yamamoto, I., Abe, A., Saito, H., & Ishimoto, M. (1984). The pathway of ammonia assimilation in *Bacteroides fragilis*. *The Journal of General and Applied Microbiology*, 30(6), 499–508.

Zhao, C., Liu, X., Chen, A., Chen, J., Lv, W., & Liu, X. (2020). Characteristics evaluation of bio-char produced by pyrolysis from waste hazelnut shell at various temperatures. <https://doi.org/10.1080/15567036.2020.1754530>

CONCLUSIONES GENERALES

El uso de biocarbón como aditivo dietario en aves de postura representa una oportunidad en el manejo alimentario de estos animales para obtener efectos benéficos en parámetros productivos y ambientales.

Dado lo incipiente de este producto en la avicultura, aún no se tienen resultados que motiven un uso productivo del biocarbón en este rubro, sin embargo, en este estudio se evidenció que hay efectos en el crecimiento de bacterias de interés en la industria del huevo, logrando una disminución en la población de *Staphylococcus aureus* y por otro lado un aumento de *Enterococcus faecalis*. Estos resultados permiten ver un potencial comportamiento, ya que en el tracto gastrointestinal de las aves, estas poblaciones bacterianas estarán por mucho más tiempo. Pese a lo anterior, la microbiota intestinal a nivel de cloaca no se afecta por el uso de biocarbón en la dieta.

Los resultados de disminución en la emanación de nitrógeno amoniacal con biocarbón de paja de trigo hacen ver que existe una potencial utilidad de este aditivo dietario para ser una opción real como estrategia nutricional para la mitigación del impacto ambiental de las aves de postura, sin que se afecten negativamente los parámetros productivos.