



2016

Cindy Vanessa Ballardo Matos

Tesis Doctoral UAB

# VALORIZACIÓN DE RESIDUOS SÓLIDOS ORGÁNICOS COMO SUSTRATO PARA EL CRECIMIENTO DE *Bacillus thuringiensis* MEDIANTE FERMENTACIÓN EN ESTADO SÓLIDO:

Aplicación a la Fracción Orgánica de Residuos Municipales para la producción de compost con efecto biopesticida

Tesis Doctoral  
Cindy Vanessa Ballardo Matos  
2016

ESCOLA DE ENGINYERIA

DEPARTAMENT D'ENGINYERIA QUÍMICA, BIOLÒGICA I AMBIENTAL

**VALORIZACIÓN DE RESIDUOS SÓLIDOS ORGÁNICOS COMO SUSTRATO PARA EL CRECIMIENTO DE *Bacillus thuringiensis* MEDIANTE FERMENTACIÓN EN ESTADO SÓLIDO: Aplicación a la Fracción Orgánica de Residuos Municipales para la producción de compost con efecto biopesticida.**

Tesis Doctoral

**Cindy Vanessa Ballardo Matos**

Supervisado por

**Dra. Adriana Artola y Dra. Raquel Barrena**

Bellaterra, 2016





Universitat Autònoma  
de Barcelona

ADRIANA ARTOLA CASACUBERTA profesora agregada del Departamento de Ingeniería Química, Biológica y Ambiental de la Universitat Autònoma de Barcelona y RAQUEL BARRENA GÓMEZ investigadora Postdoctoral del mismo departamento,

CERTIFICAN:

Que Cindy Vanessa Ballardo Matos ha realizado bajo nuestra dirección el trabajo, con el título **“VALORIZACIÓN DE RESIDUOS SÓLIDOS ORGÁNICOS COMO SUSTRATO PARA EL CRECIMIENTO DE *Bacillus thuringiensis* MEDIANTE FERMENTACIÓN EN ESTADO SÓLIDO: Aplicación a la Fracción Orgánica de Residuos Municipales para la producción de compost con efecto biopesticida”**, que se presenta en esta memoria, la cual constituye su Tesis para optar al Grado de Doctor.

Y para que se tenga conocimiento y conste a los efectos oportunos, presentamos Universitat Autònoma de Barcelona la citada Tesis, firmando el presente certificado.

Bellaterra, 16 de Setiembre de 2016

Dra. Adriana Artola Casacuberta

Dra. Raquel Barrena Gómez



*A mi Padre celestial por su inmenso amor  
comprensión y generosidad....*

*A mi Madre Ela Luz, por su paciencia y  
fuerza en estos años de lejanía...*

*A mi Padre José Antonio, por haber hecho  
posible mi existencia...*



Agradezco al Ministerio de Economía y Competitividad español por la financiación de este trabajo mediante los proyectos “Del residuo al producto: aplicación de la fermentación en estado sólido para la obtención de enzimas de interés (lipolíticas, proteolíticas y lignocelulósicas) a partir de residuos industriales orgánicos” (Plan Nacional de I+D+i, Ref. CTM2012-33663, Convocatoria 2008-2011) y “Estrategias de optimización de procesos de obtención de bioproductos a partir de residuos orgánicos mediante fermentación en estado sólido (BIOPRO)” (Programa Estatal de Investigación, Desarrollo e Innovación Orientada a los Retos de la Sociedad, Ref. CTM2015-69513-R, Convocatoria 2015).

Mi agradecimiento al Ministerio de Educación de Perú, al Programa Nacional de Becas y crédito Educativo (PRONABEC) por el financiamiento y la confianza depositada que sin su ayuda este doctorado no se hubiera podido realizar.







## AGRADECIMIENTOS

La culminación de esta tesis doctoral no habría sido posible sin la orientación, el apoyo y colaboración de muchas personas que han estado a mi lado durante estos tres años de mi vida de doctorado. A través de estas líneas quiero realizar un sincero agradecimiento a estas personas.

En primer lugar, agradecer al Dr. Antoni Sánchez por haberme recibido en el grupo de investigación GICOM y haberme dado la oportunidad de participar en los distintos proyectos del Gobierno de España que contribuyeron en mi formación como investigadora.

También quiero agradecer a mis Directoras de tesis, Adriana y Raquel, quienes me han acompañado siempre y en todo momento en este camino tan largo, con su apoyo incondicional, su dirección, comprensión y estima en estos años en el transcurso de la tesis, esto no hubiera sido posible sin ellas.

Gracias a los doctores Teresa Gea, Xavier Font y Fela Vázquez por los conocimientos que he podido adquirir de ellos en estos años.

Agradezco también a la Doctora María de los Ángeles Calvo del área de microbiología de la Facultad de Veterinaria, por acogerme y ayudarme en la parte microbiológica de esta investigación. Gracias Leo por tu valiosa ayuda, palabras de apoyo y enseñanzas en el laboratorio y en aquella incesante búsqueda de seguir adelante con el tema de tesis.

Mi agradecimiento sincero a Juliana Abraham, compañera y amiga desde mis inicios en la Escuela de Ingeniería a la que agradezco todas sus enseñanzas, consejos, recomendaciones e ideas para continuar con el tema apasionante del estudio del *Bacillus thuringiensis* y la FES.

Al Instituto de Ciencia y Tecnología de Medio ambiental ICTA. Gracias especiales a la Dra. Monserrat Sarra por su buena disposición y a Cristina por las facilidades prestadas en los trámites e informes del ICTA.

Gracias a todas las personas del grupo de investigación con los que he tenido la oportunidad de coincidir a lo largo de todos estos años Pedro, Ahmad, Sheila, Mamdouh, Nora, Rebeca, Ana Belén, María, Oscar, Natividad, Beatriz, Amanda,

Alejandra, Eva, Lucia, por el ambiente de trabajo, sinceramente ha sido un placer trabajar a vuestro lado.

De la misma manera también quiero agradecer a Pily, Rosi y Manuel quienes me acompañaron, enseñaron y me hicieron la vida más fácil en los laboratorios del Departamento de Ingeniería Química Biológica y Ambiental

A todo el personal Administrativo del Departamento de Ingeniería Química Biológica y Ambiental en especial a Miriam por ser tan amable y servicial.

Gracias a mis amig@s que, de una forma u otra, me han acompañado a lo largo de este arduo recorrido en especial a Hatisha, Lijuan Su, Josefina, Carlos Chan, Francisco, Luis, Dylan, Fabiola, Irina.

Quiero agradecer también a Ulises por su paciencia, compañía y por compartir triunfos y dificultades en esta lucha por salir adelante tratando de cumplir con las metas y objetivos planteados cada uno en su doctorado, con una competencia sana de lograr ser mejor cada día, y su optimismo siempre presente ¡lo lograremos!

Por último, pero sin duda, la parte más importante, agradecer a toda mi familia por el cariño, paciencia, apoyo y consejos dados que han contribuido en grandísima medida a la finalización del presente trabajo, aunque vía Skype siempre me apoyaron en los momentos difíciles sin ustedes nada de esto hubiera resultado posible.

A Karen y Carlos en especial a mi sobrino Flavio, mi familia en Barcelona, gracias por hacer de mi estancia la más reconfortante y especial, A Karen por recordarme la sazón de nuestra tierra y no olvidar los platillos especiales tan añorados.

## RESUMEN

Ante la creciente producción de residuos a todos los niveles se ha considerado la posible utilización de estos como materia prima. Esta investigación persigue la valorización de residuos sólidos orgánicos como sustrato para el crecimiento de *Bacillus thuringiensis* (Bt) utilizando la Fermentación en Estado Sólido (FES). El Bt es una bacteria empleada como agente de control biológico para el control selectivo de insectos plaga.

El objetivo principal del trabajo ha sido determinar la factibilidad de utilizar residuos orgánicos sin pre-tratamiento a una escala piloto. Se trabajó en 4 fases principales: en la primera fase se utilizó residuo de procesado de soja a escala laboratorio y en reactores de 10 L mediante FES; en la segunda fase se utilizó la Fracción Orgánica de Residuos Municipales de recogida selectiva (FORM) esterilizada y sin esterilizar, mediante fermentación sumergida (FmS); en la tercera fase también se utilizó FORM esterilizada y sin esterilizar mediante diferentes estrategias en fermentación en estado sólido (FES); y en la última fase se utilizaron residuos de fruta y verduras (asimilable a residuos de cocina) a escala real (400 L), en compostador doméstico. Además, en la última fase se evaluó la toxicidad del compost para su utilización como enmienda orgánica en el suelo. Se ha determinado la viabilidad del crecimiento en condiciones estériles a temperatura constante de 30°C y en FES de Bt, tanto en residuo de soja como en FORM. Se ha demostrado la supervivencia de Bt en residuo de soja en FES a temperatura no controlada a escala de 10 L, manteniéndose constante la población aún a temperaturas por encima de los 60°C. Por lo que a la FORM se refiere, se han optimizado las condiciones de proceso hasta conseguir escalar a reactores de 10 L mediante una estrategia de operación (inoculación de Bt después de etapa termófila) que permite desarrollar el proceso en semicontínuo (el contenido de un reactor sirve de inóculo para los siguientes). Aplicado a compostador doméstico, se consigue un producto final conteniendo Bt sin efectos tóxicos para el suelo. Además, esta investigación da apertura al estudio y desarrollo de un compost con propiedades biopesticidas.

Este es el primer trabajo en este campo que se realiza en el grupo de compostaje de la UAB y va a tener continuidad dentro del proyecto europeo DECISIVE (H2020), que propone una gestión y valorización descentralizada de bioresiduos.



## ABSTRACT

Given the growing generation of solid residues, several attempts have been made to exploit these residues as raw material for diverse applications. This study focuses on the valorization of solid organic residues of different characteristics as substrate for the growing of the strain *Bacillus thuringiensis* (Bt) growth through Solid State Fermentation (SSF). Bt is a bacteria employed as biological pest control for the selective control of some insects. The aim of the study is the assessment of different process strategies in order to identify the feasibility of Bt growth at 0.5L, 4.5L, 10L and 400L scale with and without previous sterilization of the residues. The research has undergone four main stages: First, using soy fiber residues at 0.5 and 10L scale. Second, using the organic fraction of municipal solid waste (OFMSW) through submerged fermentation (SmF). Third, testing different operational strategies with OFMSW through SSF, and finally, using the organic fraction of kitchen residues (KR) in a home composting system (400L). In Home compost, toxicity has been also determined. It was found that Bt is able to grow properly when soy fiber residues and OFMSW were sterilized, in SSF at constant temperature (30°C). Similarly, at non controlled temperature conditions (4.5L and 10L), Bt survived even when temperatures reached values beyond 60°C, remaining the Bt concentration in a similar level than the initial one.

Regarding OFMSW, SSF process has been optimized in a 10L scale. In this scenario a semi-continuous strategy allowing Bt to grow in the solid medium, has been settled reaching a final sanitized material containing Bt.

In the case of the home composting system, the final product also contains a significant Bt population remaining a non-toxic material for the soil. It is remarkable that Bt has grown in solid medium, and there is no need for sterilization of the residues for achieving good results. Considering this, presented strategies are a first approach to obtain compost with biopesticides properties. This is the first project in this area, developed by the UAB composting research group. It will be further and deeply investigated in the framework of the European project DECISIVE (H2020).



## **ESTRUCTURA DE LA MEMORIA**

Esta memoria se ha estructurado en los siguientes capítulos:

**Capítulo I.** En este capítulo introductorio se describen aspectos de importancia que dan sentido a la tesis con la finalidad de articular el tema de investigación relacionando la FES y *Bacillus thuringiensis* en un acercamiento a la obtención de un Biopesticida.

**Capítulo II.** Plasma los objetivos relevantes del desarrollo de esta tesis.

**Capítulo III.** Detalla los Materiales y Métodos, donde se describen los procedimientos y técnicas de laboratorio utilizadas en esta investigación, iniciando desde la preparación del inóculo de Bt, detallando los protocolos seguidos y finalizando con los métodos empleados para su evaluación.

**Capítulo IV.** Es el punto de partida de la valorización de los residuos orgánicos incorporando a Bt en la fermentación en estado sólido. En este capítulo se trabajó con el residuo de fibra de soja estéril y no estéril comprobando la viabilidad del proceso con la opción de utilizarlo como medio para producir Bt y/o la posibilidad de utilizar el producto final (compost).

**Capítulo V.** Se presentan los resultados alcanzados del estudio de las cinéticas de crecimiento de Bt empleando la Fracción Orgánica de Residuos Municipales procedente de recogida selectiva (FORM). La finalidad es evaluar el crecimiento de Bt en FORM estéril y no estéril comparando este crecimiento con el obtenido en un medio comercial en fermentación sumergida.

**Capítulo VI.** Se muestran los resultados de la viabilidad del crecimiento de Bt en FORM mediante la Fermentación en Estado Sólido utilizando diferentes estrategias de operación para optimizar el crecimiento en FORM no esterilizada.

**Capítulo VII.** Se estudia el efecto de la adición de Bt a un compostador doméstico en el camino para la obtención de un compost con propiedades biopesticidas, empleando como sustrato residuos de frutas y hortalizas.

**Capítulo VIII.** Se enlistan las conclusiones de esta tesis.

**Capítulo IX.** Se recogen las referencias bibliográficas empleadas para la elaboración de esta memoria.





## ÍNDICE DE CONTENIDOS

1	INTRODUCCION.....	3
1.1	Interés del estudio .....	3
1.2	Fermentación en Estado Sólido .....	3
1.2.1	Parámetros de la Fermentación en Estado Sólido .....	4
1.2.2	Aplicaciones de la FES .....	6
1.2.3	Ventajas y desventajas de la FES .....	7
1.2.4	FES y compostaje.....	8
1.2.5	Microorganismos en el proceso de FES.....	11
1.2.6	Escalado de reactores en FES .....	12
1.2.7	Estabilidad biológica del material final obtenido en el proceso de FES .....	13
1.2.8	Toxicidad del material final obtenido en el proceso de FES para el suelo.....	13
1.3	Biopesticidas .....	15
1.4	<i>Bacillus thuringiensis</i> .....	17
1.4.1	Origen de <i>Bacillus thuringiensis</i> .....	17
1.4.2	Biología de <i>Bacillus thuringiensis</i> .....	18
1.4.3	Clasificación de las proteínas Cry de Bt.....	20
1.5	Producción de biopesticidas a base de <i>Bacillus thuringiensis</i> .....	22
2	OBJETIVO GENERAL .....	29
2.1.	<i>Objetivos específicos</i> .....	29
3	MATERIALES Y MÉTODOS .....	33
3.1	Introducción .....	33
3.2	Cepas de Bt y medios de cultivo .....	33
3.2.1	Cepas de Bt .....	33
3.2.2	Medios de cultivo .....	34
3.3	Metodología.....	34
3.3.1	Obtención de inóculo de Bt para su uso en FES.....	34
3.3.2	Determinación de las cinéticas de crecimiento de Bt en medio comercial.....	38
3.3.3	Procedimientos para la estandarización del inóculo de Bt en medio comercial OXOID® en fermentación sumergida (líquida) .....	39
3.4	Montaje experimental .....	39
3.4.1	Reactores utilizados en la investigación.....	39
3.4.2	Sistemas de control de aireación.....	45
3.5	Métodos analíticos.....	48
3.6	Parametros respirométricos: IRD y AT <sub>4</sub> .....	50
3.7	Técnicas de seguimiento e identificación de toxina de Bt .....	52

3.7.1	Identificación morfológica del cristal (endotoxina) mediante microscopio electrónico de barrido .....	52
3.7.2	Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida (SDS PAGE) .....	52
3.7.3	Determinación de la actividad de proteasa .....	53
3.8	Técnicas microbiológicas para el seguimiento y evaluación de Bt.....	53
3.8.1	Contaje de colonias en placa.....	53
3.8.2	Análisis microbiológico en medios selectivos.....	54
3.8.3	Identificación de Bt a partir de extracto de ADN.....	56
3.9	Análisis de toxicidad del material final para su utilización como enmienda orgánica en suelo: Test de Germinación.....	57
4	VALORIZACIÓN DEL RESIDUO DE SOJA A TRAVÉS DE FES PARA LA PRODUCCIÓN DE COMPOST ENRIQUECIDO CON <i>BACILLUS THURINGIENSIS</i> .....	63
4.1	Introducción .....	63
4.2	Materiales y Métodos .....	64
4.3	Resultados y Discusión .....	65
4.3.1	Cinética de crecimiento de Bt en medio comercial .....	65
4.3.2	Fermentación en estado sólido en reactores de 500 mL de capacidad en condiciones estériles .....	66
4.3.3	Fermentación en estado sólido en reactores de 500 mL de capacidad en condiciones no estériles .....	68
4.3.4	Escalado de la FES de residuo de soja inoculada con Bt a reactores de 10 L en condiciones no estériles .....	71
5	VIABILIDAD DE UTILIZAR LA FRACCIÓN ORGÁNICA DE RESIDUOS MUNICIPALES COMO MEDIO DE CRECIMIENTO DE <i>BACILLUS THURINGIENSIS</i> .....	81
5.1	Introducción .....	81
5.2	Materiales y Métodos .....	82
5.3	Resultados y Discusión .....	83
5.3.1	Crecimiento de Bt en FORM estéril en medio líquido. Comparación con el crecimiento en medio comercial.....	85
5.3.2	Crecimiento de Bt en FORM no estéril en fermentación sumergida .....	91
5.3.3	Otras determinaciones realizadas para la comparación entre el crecimiento de Bt en medio comercial y en FORM (medio líquido).....	96
6	ESTRATEGIAS PARA EL CRECIMIENTO DE <i>BACILLUS THURINGIENSIS</i> EN FORM MEDIANTE FERMENTACION EN ESTADO SÓLIDO .....	103
6.1	Introducción .....	103
6.2	Materiales y Métodos .....	103
6.3	Resultados y Discusión .....	105

6.3.1	Viabilidad de crecimiento de Bt en FORM mediante FES en reactores de 500 mL a temperatura y caudal de aire constante .....	105
6.3.2	Viabilidad del crecimiento de Bt durante FES en FORM - reactores 4.5 y 10 L ..	121
7	PRODUCCIÓN DE COMPOST CON EFECTO BIOPESTICIDA EN UN PROCESO ESTÁNDAR DE COMPOSTAJE DOMÉSTICO .....	151
7.1	Introducción .....	151
7.2	Materiales y Métodos .....	151
7.3	Resultados y Discusión .....	155
7.3.1	Puesta en marcha y seguimiento de los compostadores domésticos.....	155
7.3.2	Segunda fase: Inoculación y seguimiento de los compostadores domésticos ....	158
8	CONCLUSIONES.....	179
9	REFERENCIAS .....	185



## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.1 Aplicación de la fermentación en estado sólido (Santis, 2013) .....	7
Tabla 1.2 Bioplásticos y fitofortificantes de distribución aprobada (Agrocabildo, 2014).....	16
Tabla 1.3 Investigaciones en Fermentación sumergida (SmF) utilizando Bt.....	23
Tabla 1.4 Investigaciones utilizando fermentación en estado Sólido y Bt. ....	24
Tabla 3.1 Variedades de cepas de <i>Bacillus thuringiensis</i> utilizadas en el desarrollo de la tesis	33
Tabla 3.2 Composición de los medios comerciales de OXOID®.....	34
Tabla 4.1 Resultados obtenidos para distintos parámetros de proceso a los 6 días de fermentación en condiciones estériles y no estériles en los experimentos de FES con residuos de fibra de soja y con inóculo de Bt en reactores de 500 mL .....	69
Tabla 4.2 Valores iniciales y finales de pH, humedad, IRD, oxígeno total consumido, conteo de esporas y células viables obtenidos en la FES de residuo de soja + Bt reactores de 10 L. .....	73
Tabla 4.3 Porcentaje de germinación, porcentaje de elongación de raíz de rábano e índice de germinación del test utilizando semillas de rábano.....	76
Tabla 5.1 Características de la FORM utilizada en este estudio (media y desviación estándar de al menos tres valores obtenidos a lo largo de la investigación).....	84
Tabla 5.2 Parámetros de otros medios utilizados para el crecimiento de Bt según distintos autores.....	84
Tabla 5.3 Relación entre UFC mL <sup>-1</sup> y tiempo en la fase exponencial de crecimiento de Bt <i>kurstaki</i> , con respecto a DO <sub>660nm</sub> y peso seco. ....	88
Tabla 5.4 Relación entre UFC mL <sup>-1</sup> y tiempo en la fase exponencial de crecimiento de Bt <i>israelensis</i> , con respecto a DO <sub>660nm</sub> y peso seco.....	89
Tabla 5.5 Velocidad de crecimiento de Bt en FmS de FORM esterilizada, sin esterilizar y medio comercial de Bt <i>kurstaki</i> e <i>israelensis</i> . ....	96
Tabla 6.1 Valores iniciales y finales de H, MO, pH y valores finales de sOUR, AT <sub>4</sub> y fase de latencia en reactores de 500 mL con FORM sin inocular .....	106
Tabla 6.2 Valores iniciales y finales obtenidos en el proceso de FES con FORM esterilizada inoculada con Bt en reactores de 500 mL de capacidad. ....	107
Tabla 6.3 Valores iniciales y finales de parámetros en estudio con FORM sin esterilizar y con diferente porcentaje de inóculo de Bt en reactores de 500mL .....	111
Tabla 6.4 Comparación de sOUR y AT <sub>4</sub> para residuo de FORM y de soja .....	112
Tabla 6.5 Actividad de proteasa en FORM y en residuo de soja con inóculo de Bt en reactor de 500 mL.....	119
Tabla 6.6 Valores iniciales y finales de pH, humedad, MO, sOUR, conteo de células viables y esporas en reactor de 10 L de capacidad empleando un control oxígeno en el proceso de FES.....	123
Tabla 6.7 Valores iniciales y finales de pH, humedad, MO, sOUR, conteo de células viables y esporas en reactor de 10 L de capacidad empleando un control OUR en el proceso de FES.....	126

Tabla 6.8 Valores iniciales y finales de parámetros característicos en el proceso de FES aplicando la Estrategia 2. ....	130
Tabla 6.9 Parámetros de interés en R1 y R2, réplica de la Estrategia 2 con la variedad <i>kurstaki</i> .....	133
Tabla 6.10 Parámetros de interés en reactores 4 y 5 con <i>Bt israelensis</i> .....	136
Tabla 6.11 Valores iniciales y finales de parámetros característicos en el proceso de FES aplicando la Estrategia 3 .....	140
Tabla 6.12 Valores iniciales y finales de parámetros característicos en el proceso de FES aplicando la Estrategia 3 con volteos periódicos del material .....	143
Tabla 7.1 Parámetros iniciales y finales de proceso de FES de FORM en reactores de 50 L para obtener el preinoculo de Bt para el compostador doméstico.....	156
Tabla 7.2 Parámetros evaluados en el proceso control (reactor y compostador doméstico control) según etapa de proceso.....	158
Tabla 7.3 Parámetros evaluados en el proceso con Bt (reactor y compostador doméstico control) según etapa de proceso.....	159
Tabla 7.4 Población de Bt procedente de muestras de compostador doméstico inoculado en tres tiempos diferentes de evaluación (días totales de proceso).....	162
Tabla 7.5 Caracterización de compost del día 148 de proceso total (día 79 de maduración) de compostador control sin inóculo de Bt y de compostador inoculado con Bt.....	168
Tabla 7.6 IRD máx y AT4 de compostador doméstico con y sin inóculo.....	169
Tabla 7.7 Índice de germinación de muestras de compost, compostadores domésticos con y sin inóculo de Bt a los 79 días de maduración .....	169
Tabla 7.8 Análisis microbiológico de compost procedente de muestras de compostador control (sin inóculo de Bt) en tres tiempos de evaluación correspondiente a período de maduración.....	171
Tabla 7.9 Análisis microbiológico del compost procedente de compostador inoculado con Bt en tres tiempos de evaluación correspondientes al período de maduración.....	172
Tabla 7.10 Evaluación de muestras de compostador control y compostador inoculado con Bt en tres tiempos diferentes. Incluye cepas del género <i>Bacillus</i> , bacterias y hongos.....	173
Tabla 7.11 Supervivencia y reproducción de <i>F. candida</i> en un suelo agrícola (control) y la mezcla de éste con un compost convencional i con compost enriquecido con Bt. ....	175

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1 Sucesión microbiana y evolución de la temperatura y el pH durante el compostaje (Moreno y Mormeneo, 2008).....	10
Figura 1.2 Características microscópicas de <i>Bacillus thuringiensis</i> (cristales paraesporales y esporas). Imagen recogida de Iriarte y Caballero (2001). .....	17
Figura 1.3 Ciclo biológico de <i>Bacillus thuringiensis</i> , fase vegetativa (Fuente: Iriarte y Caballero, 2001) .....	18
Figura 1.4 Diagrama del proceso de esporulación de Bt.....	20
Figura 1.5 Proteínas CryI, III y IV que controlan estadios larvarios de insectos plaga de Lepidópteros, Coleópteros y Dípteros respectivamente. ....	21
Figura 3.1 Recepción de cepa de Bt y preparación de materiales para su reconstitución (a y b), observación de la cepa liofilizada y verificación según código y fecha (c y d). Confirmación de crecimiento de la cepa reconstituida de Bt .....	35
Figura 3.2 Prueba de confirmación de Bt mediante tinción de Gram (a), Confirmación de esporas mediante tinción de Schaeffer y Fulton con verde malaquita (b), Células y esporas sin tinción por contraste de fases (c y d) observadas al microscopio óptico (100X) .....	36
Figura 3.3 Reactores de 500 mL sumergidos en baños termostatzados y sistema de medición y de control del caudal de aire y concentración de O <sub>2</sub> y temperatura. ....	41
Figura 3.4 Esquema del montaje experimental de reactores de 500 mL (Almeira y col., 2015) ..	42
Figura 3.5 a) Reactores de 10; b) Reactores de 4.5 L.....	43
Figura 3.6 Esquema del sistema de montaje de reactores de 10 y 4.5 L.....	44
Figura 3.7 Reactores de 50 L de acero inoxidable .....	44
Figura 3.8 Esquema del sistema de control feedback de oxígeno (Puyuelo, 2012).....	45
Figura 3.9 Esquema de las leyes de control establecidas para el controlador OUR en reactor de 50 L. F: Flujo de aire (L min <sup>-1</sup> ), OUR: <i>Oxigen uptake rate</i> (gO <sub>2</sub> h <sup>-1</sup> ) (Puyuelo, 2012) ...	48
Figura 3.10 Resultado de la higienización de un residuo mediante un proceso de FES (lado izquierdo muestra inicial con enterobacterias, derecho muestra final una vez higienizada). .....	55
Figura 3.11 Test de germinación de semillas de rábano desde el inicio de germinación (a), germinación en agua como control de crecimiento (b) germinación en sustrato (c) y la medida de la longitud de raíz (d).....	59
Figura 4.1 Cinética de crecimiento de Bt en medio comercial OXOID utilizando 10% (v/v) de inóculo inicial mediante densidad óptica en función del tiempo en Fermentación sumergida.....	66
Figura 4.2 Perfil de consumo de oxígeno sOUR en reactores de 500 mL con residuo de soja esterilizado y Bt.....	67
Figura 4.3 Reactores: a) R1 (control, sin Bt); b) R2 (Bt inoculado) y c) R3 (Bt inoculado). Perfil de OUR y Temperatura R1, R2 y R3. Perfil de población de UFC g <sup>-1</sup> R2 y R3.....	74



Figura 4.4 Imágenes de SEM de los cristales paraesporales y las esporas de Bt: a) muestra obtenida a escala de laboratorio en Erlenmeyer (10kX); b, c y d) muestras tomadas después de 60 h de proceso en reactores de 10 L (70 KX) .....	77
Figura 5.1 Comparación entre (a) FORM fresca y (b) FORM esterilizada .....	85
Figura 5.2 Representación de la cinética de crecimiento de Bt cepa CECT 4497 variedad <i>kurstaki</i> en condiciones estériles y en el medio comercial OXOID® seguida mediante conteo de células viables (UFC mL <sup>-1</sup> ); densidad óptica <sub>660 nm</sub> y peso seco (mg mL <sup>-1</sup> ) .....	86
Figura 5.3 Representación de la cinética de crecimiento de Bt cepa CECT 5904 variedad <i>israelensis</i> en UFC mL <sup>-1</sup> ; DO <sub>660nm</sub> y peso seco en mg mL <sup>-1</sup> en condiciones estériles y en medio comercial .....	87
Figura 5.4 Perfil de cinéticas de crecimiento de <i>Bt kurstaki</i> crecidas en FORM esterilizada y de <i>Bt kurstaki</i> crecidas en medio comercial .....	90
Figura 5.5 Placa con extracto de FORM sin esterilizar y sin cepas de Bt .....	92
Figura 5.6 Placas de extracto de FORM sin esterilizar a las 24 horas de incubación : células viables (izquierda) esporulado (derecha) .....	93
Figura 5.7 Placas de extracto de FORM esporulado cultivado por 18 a 20 horas (izquierda). Placas de extracto de FORM sin esporular incubadas más de 24 horas con presencia de hongos, otras colonias diferentes y Bt (derecho) .....	93
Figura 5.8 Comportamiento de Bt kurtaski con inóculo proveniente de una placa petri en FORM no esterilizada .....	94
Figura 5.9 Comparación del crecimiento de Bt <i>kurstaki</i> en FORM esterilizada y sin esterilizar .....	95
Figura 5.10 Gel de electroforesis de Bt crecido en medio comercial OXOID® a las 12, 24 y 48 horas de fermentación .....	97
Figura 5.11 Gel de electroforesis del producto comercial Compo® de extractos de muestras Dse (disruptado sin esporular), Dd (disruptado esporulado) Dde (disruptado diluido esporulado) .....	99
Figura 6.1 (a) inóculo de Bt en FORM después de centrifugar a 3500 rpm por 10 min y eliminar sobrenadante (b) mezcla y homogenización de inóculo de Bt .....	104
Figura 6.2 Perfil de seguimiento de Bt (UFC g <sup>-1</sup> MS) en FORM esterilizada e inoculada con el 10% (v/p) Bt y perfil de 8 repeticiones de sOUR (g O <sub>2</sub> kg <sup>-1</sup> MS h <sup>-1</sup> ) en FES. ....	107
Figura 6.3 Comparación de crecimiento de células viables y esporas de Bt en FORM esterilizada en FmS y FES expresados en UFC/g de materia seca .....	109
Figura 6.4 Diagrama de caja de comparación de los valores de sOUR máx. en función de la FES utilizando FORM sin Bt, FORM esterilizada y sin esterilizar con Bt. ....	112
Figura 6.5 Diagrama de caja de comparación de los valores de sOUR máx. en función de la FES, utilizando el residuo de soja sin Bt, residuo de soja esterilizado y sin esterilizar con Bt. ....	113
Figura 6.6 Diagrama de caja de comparación de los valores de consumo acumulado a cuatro días en función de la FES, utilizando el residuo de soja imagen a) y FORM imagen b)..	114

Figura 6.7 Variación del recuento de células viables, usando diferentes porcentajes de inóculo en FORM sin esterilizar y comparada con la FORM esterilizada. ....	115
Figura 6.8 Variación del recuento de esporas, usando diferentes porcentajes de inóculo en FORM sin esterilizar y comparada con la FORM esterilizada. ....	116
Figura 6.9 Perfiles de seguimiento de sOUR en FORM con 7, 9 y 12% de inóculo de Bt (a, b y c) y control (d) respectivamente. ....	118
Figura 6.10 Actividad de proteasa en relación a concentración de células viables y esporas (UFC g <sup>-1</sup> MS) en residuo de FORM esterilizada y no esterilizada con inóculo de Bt al 10% (v/p) en reactores de 500 mL en FES. ....	120
Figura 6.11 Proceso de FES en reactores de 10 L, con inóculo cultivado en FORM esterilizada en medio líquido (Estrategia 1) .....	122
Figura 6.12 a) Perfiles de seguimiento de sOUR, temperatura y contaje de células viables y esporas de Bt de reactor 1 y 2). b) Perfiles de seguimiento de sOUR y temperatura de reactor 3 control sin inóculo de Bt. usando control de oxígeno en todos los reactores....	124
Figura 6.13 a) Perfiles de seguimiento de población de Bt con inóculo inicial en reactores 1 y 2, y temperatura. b) Perfil de seguimiento de temperatura y sOUR de reactor 3 (control sin inóculo). ....	127
Figura 6.14 Estrategia de inoculación en dos tiempos diferentes, el primero después del rango termófilo y el segundo desde inicio con mayor porcentaje de inóculo (v/p).....	129
Figura 6.15 Perfil de evolución de la población de Bt, velocidad de consumo de oxígeno y temperatura del reactor R1 (Estrategia 2).....	131
Figura 6.16 Perfil de evolución de la población de Bt en UFC, velocidad de consumo de oxígeno y temperatura del reactor 2 inicialmente inoculado con Bt (estrategia 2) .....	132
Figura 6.17 Perfiles de sOUR, temperatura y población de <i>Bt kurstaki</i> en (a) R1, inoculado después de la etapa termófila (temperaturas superiores a 45°C) y (b) R2 inoculado con <i>Bt kurstaki</i> desde inicio de proceso. ....	135
Figura 6.18 Perfiles de sOUR, temperatura y población de <i>Bt israelensis</i> en (a) R4, inoculado después de la etapa termófila (temperaturas superiores a 45°C) y (b) R5 inoculado con <i>Bt israelensis</i> desde inicio de proceso.....	137
Figura 6.19 Estrategia 3, incorporación de inóculo a R1 tras el rango termófilo y separación de la matriz inoculada en dos nuevos reactores.....	139
Figura 6.20 Perfil de temperatura y sOUR de todo el proceso de fermentación de la estrategia 3. Incluye proceso de higienización, incorporación de inóculo de Bt, mezcla y separación en a) RA y b) RB .....	141
Figura 6.21 Replica de Estrategia 3 (con volteos periódicos). Perfil de temperatura y sOUR de todo el proceso de fermentación incluye proceso de higienización, incorporación de inóculo de Bt, mezcla y separación en a) RC y b) RD. ....	144
Figura 6.22 Imagen de células y cristales en muestra esporulada (Reactor RC, a las 24 horas de proceso, réplica Estrategia 3).....	145
Figura 6.23 Imagen de cristales en muestra esporulada (reactor RC, réplica estrategia 3) ....	146

Figura 6.24 Imagen de cristal en una muestra sin esporular a las 24 horas de proceso (reactor RD, réplica estrategia 3).....	146
Figura 7.1a) Compostadores domésticos de 400 L; b) Preparación de lecho para compostaje rellenando con capas de tierra; c) Incorporación de estructurante y compost en ambos compostadores; d) Incorporación de FORM verde más estructurante .....	154
Figura 7.2 Evolución de la temperatura y la sOUR de la FORM inoculada con Bt en reactor de 50 L. Valores iniciales y finales de células viables y esporas.....	157
Figura 7.3 Perfil de temperatura en reactores de 50 L y en compostador doméstico control e inoculado. Seguimiento de población de Bt (células viables y esporas) en compostador doméstico inoculado.....	160
Figura 7.4 Porcentaje de Phylum identificados mediante pirosecuenciación en muestras de compost estándar y compost con Bt. ....	164
Figura 7.5 Porcentaje de <i>Bacillus</i> identificados mediante pirosecuenciación en muestras de compost estándar y compost con Bt.....	165
Figura 7.6 Imagen de cristales, esporas y células de Bt obtenida mediante SEM de compost enriquecido con Bt.....	166
Figura 7.7 Dimensiones de esporas (1.25 x 0.74 $\mu\text{m}$ ) y de Bt (3.26 x 1.19 $\mu\text{m}$ ) de material de compost doméstico enriquecido con Bt.....	166
Figura 7.8 Dimensiones de cristal paraesporal (1.14 x 0.32 $\mu\text{m}$ ) de Bt en el compost enriquecido con Bt.....	167
Figura 7.9 Resultados del análisis por SEM del material del compostador doméstico control, sin inóculo de Bt .....	167

# CAPÍTULO 1

---



## 1 INTRODUCCION

### 1.1 *Interés del estudio*

El aumento de la población y el consumo actual tiene como consecuencia el incremento de los residuos generados. El compostaje y la digestión anaerobia son tecnologías amigables con el medio ambiente que permiten reducir y gestionar una parte de la gran cantidad de residuos orgánicos que se generan por la concentración de población en núcleos urbanos y el nivel de vida de las personas (Artola y col., 2009). Sin embargo, la fermentación en estado sólido (FES) se presenta también como una gran alternativa en cuanto a la valorización de estos residuos (Santis y col., 2011). El creciente interés por valorizar los residuos orgánicos biodegradables a través de la FES ha estimulado la realización de diversas investigaciones incorporando sustratos y microorganismos específicos para la producción de metabolitos de interés tales como enzimas hidrolíticas, biosurfactantes, ácidos orgánicos, pigmentos, aromas, biofertilizantes y biopesticidas (Pandey y col., 1999)(Sánchez y col., 2015).

La producción de biopesticidas mediante FES se presenta como una alternativa atractiva y respetuosa con el medio ambiente para el control biológico de plagas. Sin embargo, la mayoría de investigaciones centradas en la obtención de biopesticidas utilizando residuos orgánicos (entre los que destacan los lodos de depuradora), se han realizado a escala de laboratorio, utilizando pocos gramos de muestra, y en la mayoría de casos con los residuos pretratados, es decir, esterilizados o sometidos a algún tratamiento térmico que elimine la carga bacteriana nativa de dichos residuos y reduzca la competencia a la hora de inocular un microorganismo específico.

Esta investigación presta especial atención a dilucidar y optimizar las condiciones de crecimiento de *Bacillus thuringiensis* (Bt) en FES utilizando residuos sólidos orgánicos sin pretratar y a escala semipiloto como primera etapa en la obtención de un producto final con propiedades biopesticidas que pueda ser aplicado de forma segura al suelo.

### 1.2 *Fermentación en Estado Sólido*

La FES es un bioproceso que ocurre en ausencia o casi ausencia de agua libre, empleando normalmente un sustrato natural que actúa como fuente de carbono o energía, aunque también puede ser inerte. Se desarrolla por tanto en una fase sólida discreta en la que los microorganismos crecen en la superficie de las partículas

húmedas, así como dentro y entre ellas. El espacio entre las partículas está ocupado por una fase gaseosa continua (Pandey y col., 2013).

### **1.2.1 Parámetros de la Fermentación en Estado Sólido**

Son varios los factores que pueden afectar al desarrollo del proceso de FES. La selección de una cepa adecuada, el sustrato y su relación con los parámetros físicos, químicos y bioquímicos del proceso influirán en la evolución de la FES y en la obtención del producto final (Pandey y col., 2003).

#### ***Temperatura***

Dentro de los parámetros ambientales, la temperatura influye en la velocidad de crecimiento de los microorganismos. Existe una temperatura o rango de temperaturas óptimas para el crecimiento de un microorganismo. A temperaturas fuera de este rango, el crecimiento se ralentiza o es inexistente. Por otro lado, en función de las condiciones de la FES es importante tener en cuenta que se puede generar una gran cantidad de calor que es directamente proporcional a la actividad metabólica de los microorganismos (Pandey y col., 2013). Este incremento térmico puede afectar directamente al crecimiento microbiano, a la producción de esporas y/o a las propiedades del producto final. Por ello, en función del objetivo de la FES es conveniente dotar a los fermentadores de mecanismos que permitan disipar el calor, siendo lo más frecuente la circulación de aire por el interior del reactor (Moyano, 2014).

#### ***Aireación***

La aireación durante la FES es un factor de gran importancia ya que, por un lado, proporciona oxígeno a los microorganismos mientras que elimina simultáneamente el dióxido de carbono y, por otro, como ya se ha comentado, elimina el calor del fermentador y distribuye el vapor de agua y los metabolitos gaseosos y volátiles producidos (Graminha y col. 2008), evitando que la composición de la fase gaseosa afecte a la actividad de la biomasa (Raimbault, 1998). Una aireación insuficiente puede derivar en una sustitución de los microorganismos aerobios por anaerobios, con el consiguiente retraso en la descomposición, la aparición de sulfuro de hidrógeno y la producción de malos olores. Por otro lado, el exceso de ventilación podría provocar el enfriamiento de la masa y una alta desecación de ésta con la consiguiente reducción de la actividad metabólica de los microorganismos (Haug, 1993).

### **Humedad**

El contenido de humedad es un parámetro crucial de los procesos de FES. Esta variable influye significativamente en el desarrollo microbiano. El valor óptimo de contenido de humedad depende tanto del microorganismo como de la matriz sólida que se utiliza. Haug (1993) recomienda para una matriz orgánica a fermentar valores de humedad entre 40-60%. Porcentajes altos de humedad dan como resultado una baja porosidad del sustrato que a su vez impide la penetración y circulación de aire en la matriz, mientras que un bajo contenido de humedad conduce a una mala difusión de los nutrientes que obstaculizará el crecimiento microbiano (Pandey y col., 2003). Temperatura, aireación y humedad, como se ve, están directamente relacionados.

### **Tamaño de partícula**

El tamaño inicial de las partículas de la matriz sólida es otro factor importante para la optimización del proceso, ya que cuanto mayor sea la superficie expuesta al ataque microbiano por unidad de masa, más rápida y completa será la reacción. El desmenuzamiento del material facilita el ataque de los microorganismos y aumenta la velocidad del proceso. Sin embargo, aunque un pequeño tamaño de partícula provoca una gran superficie de contacto para el ataque microbiano, también reduce el espacio entre partículas aumentando las fuerzas de fricción (Haug, 1993); esto limita la difusión de oxígeno hacia el interior y de dióxido de carbono hacia el exterior, lo cual restringe la proliferación microbiana y puede dar lugar a un colapso microbiano al ser imposible la aireación por convección natural.

### **pH**

Generalmente el pH se autoregula durante el proceso, pero es difícil de supervisar y controlar en procesos de FES, debido a la naturaleza de los materiales fermentados, por ser sólidos en ausencia de agua libre. A pesar de estas dificultades, es un parámetro importante y es necesario realizar su seguimiento durante todo el proceso fermentativo, con el fin de poder prevenir la muerte de los microorganismos por valores que éstos no toleran. Adicionalmente, utilizar un pH adecuado durante procesos de FES de hongos y levaduras, reduce o elimina los riesgos de contaminación bacteriana (Raimbault, 1998). Los valores óptimos de pH para que los microorganismos se desarrollen están entre 5 y 8, aunque la mayoría de los hongos se encuentran adaptados para trabajar en un rango más amplio (Haug, 1993).



### **Agitación**

Una buena agitación de la masa en fermentación garantiza la homogeneidad con respecto a las partículas y la humedad. Adicionalmente, promueve la transferencia de calor y materia, y la distribución uniforme de los nutrientes añadidos gradualmente durante el curso de la fermentación, si se da el caso. Sin embargo, en función del tipo de FES, al realizar la agitación de un lecho que contiene partículas sólidas, que suelen tener un hongo filamentoso creciente en sus superficies, se pueden dañar las hifas del hongo (Mitchell y col. 2011), y por ende se plantean inconvenientes como daños ocasionados al micelio, reducción de la porosidad de la matriz afectando negativamente en la formación del producto. Por otro lado, la agitación de la matriz sólida supone un gasto energético adicional y según el material empleado, sobre todo si es mezcla de varios residuos, resulta complicado conseguir una mezcla homogénea.

#### **1.2.2 Aplicaciones de la FES**

La FES se ha estudiado en la producción de alimentos, enzimas (pectinasas, lipasas, celulasas etc.), ácidos orgánicos, sabores y compuestos bioactivos, metabolitos secundarios, biofertilizantes, biopesticidas, compuestos aromatizantes, etc. (Pandey y col., 2013). El uso de FES puede dar un valor añadido a los residuos agrícolas, a través de su bioconversión. La mayoría de los residuos agrícolas no son utilizados adecuadamente, desaprovechando su potencial. Estos residuos incluyen desde semillas, a plantas o partes de éstas, a cáscara de fruta y las mismas frutas, y están constituidos por celulosa, que representan una fuente potencial de azúcares y energía (Pandey y col., 2003; Raimbault, 1998).

En la Tabla 1.1 se presentan en detalle algunas de las aplicaciones de la FES y los respectivos productos de valor añadido obtenidos.

Tabla 1.1 Aplicación de la fermentación en estado sólido (Santis, 2013)

AREA	APLICACIÓN	EJEMPLO DE PRODUCTOS
Procesos para obtener productos de alto valor añadido	Biotransformación de cultivos o residuos de cultivos	Biotransformación de la yuca y los residuos de yuca para la mejora de la nutrición. Bioconversión de residuos de cultivos lignocelulósicos para enriquecer con proteínas la alimentación de los rumiantes.
	Pulpeo biológico	Pulpeado biológico de virutas de madera sin la necesidad de tratamiento en autoclave o de enriquecimiento nutricional.
	Producción de compuestos bioactivos	Producción de micotoxinas, endotoxinas bacterianas, factores de crecimiento de las plantas, antibióticos, medicamentos inmunosupresores, alcaloides etc.
	Producción de enzimas	Celulasa, b-glucosidasa, lacasa, xilanasas, proteasa, lipasas, glutaminasa.
	Producción de ácidos grasos	Ácido cítrico, ácido fumárico, ácido láctico, ácido oxálico.
	Producción de biopesticidas	Producción de <i>Beauveria bassiana</i> en el control biológico de las plagas de plátano, caña de azúcar, soja y café.
	Producción de biocombustibles	Producción de etanol a partir de la pulpa de manzana, algarrobas, sorgo, almidón de arroz.
	Producción de aromas	Aroma de piña. Producción de 2.5- dimetilpirazina (2.5-DMP) y tetramethylprazine (TTMP).
	Producción de otros compuestos inertes	Otros diversos productos tales como ácido L glutámico, pigmentos, carotenoides, xantano, goma, vitaminas, biosurfactantes, etc.

### 1.2.3 Ventajas y desventajas de la FES

A continuación, se presentan algunas de las ventajas y desventajas más resaltantes de la FES respecto a la fermentación sumergida (SmF) según diferentes autores (Botella y col. 2005; Couto y Sanromán 2006; Hölker y col. 2004; Pandey y col., 2003; Pandey y col., 2013).

#### **Ventajas de la FES**

- Reducción de costes, debido a la baja necesidad de agua, que implica al final del proceso un menor volumen de agua residual a tratar.
- Mayor rendimiento y menores inversiones de capital, donde los sustratos utilizados son generalmente residuos agroindustriales.
- Ausencia de formación de espuma.

- Baja demanda de energía para calentamiento.
- Control de la contaminación más fácil.
- Se facilita la aireación forzada por la porosidad que otorga el estructurante, lo que permite una alta transferencia de oxígeno al microorganismo.
- Mejor crecimiento de la biomasa y mayor productividad de la enzima. Fermentación de sustratos sólidos insolubles en agua.

### **Desventajas de la FES**

- Medio compuesto por tres fases de difícil homogenización. Aparición de gradientes de temperatura y composición.
- La extracción del calor metabólico puede ser un problema, sobre todo cuando se trabaja a gran escala y es difícil controlar la temperatura del proceso.
- La naturaleza sólida del sustrato dificulta la medición y monitorización de parámetros de la fermentación, tales como el pH, la temperatura, el contenido de humedad y la concentración de sustrato y productos.
- El tiempo de fermentación es mayor, debido a que generalmente se utilizan microorganismos que presentan bajas velocidades específicas de crecimiento.

### **1.2.4 FES y compostaje**

Un proceso de FES se realiza mediante la fermentación de un sustrato sólido en ausencia de agua libre. Esta es una definición muy genérica que engloba procesos aerobios y anóxicos, como por ejemplo el proceso de compostaje y el de ensilado ampliamente extendidos. La FES se puede realizar con el sustrato esterilizado o sin esterilizar. Cuando el material es estéril, la FES se puede llevar a cabo con la incorporación de un solo o varios microorganismos. Cuando el material no es estéril no se descarta la incorporación de algún microorganismo, aunque la biomasa nativa del residuo desarrolle una actividad muy importante en el proceso de degradación. Es el caso del compostaje.

El compostaje es un proceso complejo regido por la acción de una amplia y diversa población microbiana. Bacterias y hongos determinan, a través de sus capacidades metabólicas, las propiedades fisicoquímicas que condicionan el desarrollo del proceso (Anastasi y col., 2005).

El proceso de compostaje normalmente se desarrolla en dos etapas: la descomposición (fase bio-oxidativa) y la maduración (Moreno y Mormeneo, 2008). La etapa de descomposición se produce al comienzo del proceso y corresponde a la transformación de la materia orgánica fácilmente biodegradable en moléculas orgánicas e inorgánicas simples por la actividad metabólica de los microorganismos. Esta etapa se caracteriza por la producción de calor y por las elevadas tasas de consumo de oxígeno (Haug, 1993). La actividad metabólica de los microorganismos incluye el uso de su batería de enzimas, o incluso la producción de enzimas para degradar la materia orgánica y obtener los nutrientes necesarios para adaptarse a su desarrollo. En el período inicial, los microorganismos dominantes son mesófilos (los que crecen mejor a temperaturas de 10 a 42°C), utilizan el oxígeno disponible para oxidar el carbono de la matriz sólida y así obtener energía y materiales para construir nueva biomasa y producir CO<sub>2</sub> y agua. Este crecimiento produce calor y la temperatura de la matriz se eleva sobre 45°C. A estas temperaturas, los microorganismos mesófilos mueren o se vuelven inactivos (Haug, 1993). En consecuencia, en este punto los microorganismos termófilos se activan, consumiendo los materiales que son fácilmente disponibles y multiplicándose rápidamente, desapareciendo las especies mesofílicas. La temperatura puede alcanzar valores de hasta 70°C. Esta fase se llama termófila y se considera muy importante para la inactivación de patógenos y la destrucción de las semillas (Soliva, 2001; Moreno y Mormeneo, 2008).

La etapa de maduración sucede cuando las fuentes de carbono fácilmente disponibles se agotan, la actividad termófila disminuye y la temperatura baja. Es cuando los microorganismos mesófilos comienzan a dominar el proceso hasta que las fuentes de energía disponibles se hayan consumido por el agotamiento de los compuestos fácilmente biodegradables (Haug, 1993; Moreno y Mormeneo, 2008). Finalmente, el material llega a temperatura ambiente. Esta etapa es importante porque es cuando el nitrógeno obtenido de la biomasa transformada se incorpora en compuestos de alto peso molecular que son resistentes a la descomposición microbiana, formando una reserva de nitrógeno (Haug, 1993).

En la Figura 1.1 se presenta la sucesión microbiana y la evolución de factores como la temperatura y el pH durante el compostaje, especificando las diferentes fases.

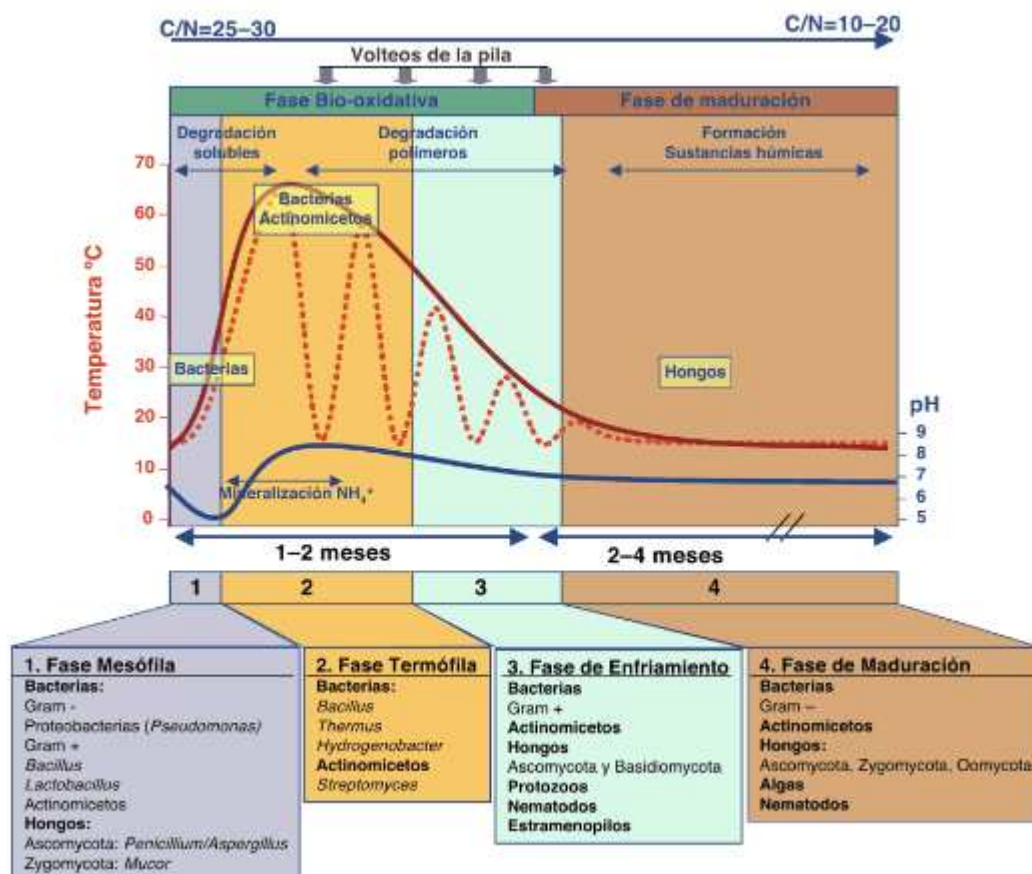


Figura 1.1 Sucesión microbiana y evolución de la temperatura y el pH durante el compostaje (Moreno y Mormeneo, 2008).

En el proceso de compostaje, después de la caracterización inicial de los residuos, éstos suelen ser mezclados con un material estructurante, como trozos de madera, de modo que se consiga una adecuada humedad y porosidad. Es importante además conocer la relación entre el carbono y el nitrógeno (C/N) del residuo a compostar (Haug, 1993; Ruggieri y col 2008). Se recomienda una relación inicial C/N de entre 15 a 30 como apropiada para materiales a compostar (Haug, 1993). Los valores más bajos promoverán las pérdidas de nitrógeno en forma de  $\text{NH}_3$ , mientras que los valores más altos pueden ralentizar el proceso de descomposición debido a la falta de nitrógeno para apoyar la actividad microbológica.

El grupo de Investigación de Compostaje GICOM de la UAB utiliza una FES aerobia y termófila en condiciones de residuo no estéril, escalable de acuerdo con el conocimiento existente del proceso de compostaje (Gea y col., 2014; Abraham, 2013).

### 1.2.5 Microorganismos en el proceso de FES

Como ya se mencionó en el apartado anterior, el proceso de FES se puede realizar con sustratos estériles o no estériles. En condiciones de laboratorio y a pequeña escala es factible esterilizar el sustrato con fines diversos como es el caso de evaluar el comportamiento de un solo microorganismo ó evaluar alguna actividad enzimática específica. Cuando se trabaja a escalas mayores, se deben considerar las implicaciones económicas y ambientales de esterilizar el material de partida. El mismo proceso de FES realizado bajo condiciones de evolución natural de la temperatura con material no estéril puede facilitar la higienización del sustrato, en un proceso natural de fermentación donde están involucrados los microorganismos propios del sustrato. La posible inoculación de un microorganismo específico puede realizarse posteriormente u obtener el producto deseado mediante microorganismos nativos.

Los microorganismos sobreviven en un determinado hábitat porque son capaces de colonizarlo y utilizar los recursos contenidos en el mismo. La degradación de la materia orgánica ocurre en la superficie de las partículas orgánicas (Moreno y Mormeneo, 2008). Por ello, como ya se ha comentado, la composición del sustrato, su estructura, la temperatura, concentración de oxígeno, contenido de humedad y pH, son concluyentes del tipo de actividad de los microorganismos (Liang y col., 2003). Por ejemplo, la microbiota encontrada en el proceso de compostaje es diversa, dependiendo de los sustratos a fermentar, del tipo de operación y las condiciones ambientales externas. Aunque esto dificulta generalizar un patrón de diversidad microbiana, en estudios reportados el predominio de microorganismos se replica de acuerdo a los siguientes: *Bacteroidetes*, *Proteobacterias*, *Actinobacterias* y géneros bacterianos *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Actinomiceto*, *Streptomyces*. Los *Bacillus* son un género extendido de *Firmicutes* en sistemas de compostaje lignocelulósico debido a su termotolerancia (Gannes y col., 2013; Mayende y col., 2006). Los hongos y levaduras pertenecen a las clases *Ascomycetes*, *Zygomycetes*, *Sacharomycetes*. Los géneros fúngicos, *Aspergillus* y *Penicillium*, seguidos de los géneros *Mucor*, *Acremonium*, *Morteriell*, *Fusarium*. Las levaduras corresponden a los géneros *Candida*, *Rhodotorula*, *Kluyveromyces*, *Pichia*, *Torulopsis* y *Trichosporon* (Moreno y Mormeneo, 2008). Zhang y col. (2016) reportan haber obtenido compost de mazorcas de maíz y estiércol de vaca, y encontrado, a los 3 meses de proceso, los *phylum* dominantes *Firmicutes*, *Proteobacteria*, *Bacteroidetes* y *Actinobacteria*. En comparación con la comunidad bacteriana, la estructura de la comunidad de hongos fue más estable con *Ascomycota* como el *phylum* dominante exclusivo.

Los principales patógenos microbianos encontrados en restos orgánicos de distinta naturaleza utilizados como materia prima en compostaje son, por ejemplo, en restos vegetales los hongos *Phytophthora*, *Pythium*, *Rhizoctonia*, *Botrytis*, *Fusarium*, *Stromatinia* y las bacterias *Clavibacter*, *Listeria*, *Pseudomonas*, *Ralstonia*, en lodos de depuradora, se han encontrado las bacterias: *Listeria*, *Salmonella*, *Escherichia*, *Mycobacterium*, *Clostridium*, *Enterococos* (Moreno y Mormeneo, 2008).

### 1.2.6 Escalado de reactores en FES

El escalado es el paso de un proceso productivo de pequeña escala a una escala superior. Las condiciones de FES a pequeña escala no son por lo general exportables, debido a que los procesos de transporte de materia y calor y el comportamiento celular son diferentes (Grau, 1999). Los procesos de FES son difíciles de escalar debido a la naturaleza heterogénea del sustrato, las diversas fases existentes y los gradientes existentes en el interior del reactor en parámetros claves como temperatura, pH, humedad, oxígeno y concentraciones de biomasa activa (Sánchez y col., 2015).

El control en la transferencia de calor es uno de los principales problemas en el diseño y operación de fermentadores en estado sólido a gran escala. Como ya se ha comentado, el calor generado por la actividad metabólica de los microorganismos puede conducir a un aumento de la temperatura del material cuando no se elimina correctamente, lo que afecta el crecimiento óptimo de los microorganismos y a la distribución de las comunidades microbianas. De hecho, la ausencia de agua libre durante la fermentación dificulta aspectos importantes del proceso, tales como la accesibilidad a los nutrientes, o la existencia de un contenido de humedad y pH homogéneos (Sánchez y col., 2015).

La mayoría de investigaciones reportadas con FES trabajan a escala Erlenmeyer (Mona Fatin y col., 2016; Patil y col., 2013; Smitha y col., 2013; Wu y col., 2013) con cantidades pequeñas de sustrato, y en su mayoría emplean sustratos esterilizados antes de incorporar un microorganismo concreto. Pocas son las investigaciones que se realizan con mayor cantidad de sustrato como por ejemplo el trabajo de Zhuang y col. (2011), quienes trabajaron en reactores de 8 L con 4 tipos de sustrato diferente, y el de Zhang y col. (2013), que trabajaron en reactores de 35, 40 y 45 L de capacidad con restos de cocina incorporando *Bacillus thuringiensis*.

### **1.2.7 Estabilidad biológica del material final obtenido en el proceso de FES**

Una vez obtenido el producto de interés en un proceso de FES, este puede ser o no separado de la matriz sólida dónde se ha producido para su utilización. En el primer caso, el material orgánico residual puede seguir un proceso de estabilización biológica que permita su aprovechamiento como enmienda orgánica. En este caso, se seguirá un proceso de compostaje y el Índice Respirométrico Dinámico (IRD) permitirá determinar la estabilidad del producto final.

El IRD permite evaluar la estabilidad de una muestra orgánica (Barrena y col., 2006). Se determina midiendo la diferencia en la concentración de O<sub>2</sub> entre la entrada y la salida de un flujo de aire que pasa a través de la muestra debidamente acondicionada. Las diferentes versiones del método dinámico se pueden encontrar en la literatura (Adani y col., 2004; Barrena y col. 2006; Scaglia y col., 2000; Tremier y col., 2005;). Aunque no existe un límite oficial, se considera un material estable, si el valor de IRD, promedio de las 24 h de máxima velocidad de consumo de oxígeno, es igual o inferior a 1000 mg O<sub>2</sub> kg<sup>-1</sup> MO h<sup>-1</sup> (Adani y col., 2004). La medida de la actividad microbiana se ha convertido en un parámetro importante para la determinación de la estabilidad biológica del compost. Además, la actividad biológica puede ser considerada una medida de la biodegradabilidad de un residuo y también se puede utilizar para el seguimiento del proceso de compostaje. Los microorganismos respiran a tasas más altas en presencia de grandes cantidades de materia orgánica biodisponible, mientras que la tasa respiratoria es la más lenta si este tipo de material es escaso (Artola y col., 2009).

### **1.2.8 Toxicidad del material final obtenido en el proceso de FES para el suelo como enmienda orgánica.**

El Real Decreto 506/2013, de 28 de junio, sobre productos fertilizantes y compost, detalla que el suelo agrícola es un recurso inestimable y limitado, cuyo potencial agronómico actual se debe a la labor desarrollada por el hombre durante siglos. La degradación irreversible de este recurso supone no sólo destruir el bien más preciado de los agricultores, sino hipotecar las oportunidades agrícolas de generaciones futuras. Por este motivo, la protección del suelo constituye un objetivo prioritario en un buen abonado, para garantizar su fertilidad y su valor agronómico, presente y futuro (BOE, 2013).

Como se ha comentado, en un proceso de FES, dependiendo cual sea la finalidad del estudio, se pueden extraer compuestos o metabolitos de interés y posteriormente los



residuos se puede estabilizar y convertir en compost para darles un destino final. No es factible aplicar directamente al suelo un material proveniente de FES en la mayoría de los casos si contiene materia orgánica biodegradable sin estabilizar. Es necesario, en función del caso, alargar el proceso de degradación o un período de maduración adecuado, para su aplicación al suelo como enmienda orgánica. Estudios realizados por Abraham y col. (2014) han demostrado que el pelo residual del despelaje en la industria de curtidos se puede gestionar satisfactoriamente mediante FES con lodos de depuradora obteniendo proteasas. Posteriormente, la matriz sólida resultante se puede compostar hasta la obtención de un compost apto para su aplicación agrícola, cerrando de este modo el ciclo de la materia orgánica al reintroducirla en el suelo una vez estabilizada.

Entre las pruebas de toxicidad para los suelos en Europa que se han estandarizado, se encuentra la de mortalidad y los ensayos de reproducción de la lombriz de tierra *Eisenia foetida* (ISO / DIS 11268-1 e ISO / DIS 11268-2, 1997) y la prueba de la reproducción con el colémbolo *Folsomia candida* (ISO / FDIS 11267; Crouau y Cazes, 2003). La prueba de reproducción con el colémbolo *Folsomia candida* se encuentra entre las más ampliamente utilizadas. Los primeros pasos hacia su normalización se llevaron a cabo a finales de 1980 (Filser y col., 2014). Esta prueba consiste en exponer al colémbolo a un área de suelo probable contaminado y no contaminado (control) para evaluar la tasa de reproducción. La tasa de desarrollo depende, entre otros factores que se controlan (como la temperatura) de la presencia de contaminantes en la muestra (Crouau y Cazes, 2003).

### **Fitotoxicidad**

El compost destinado a ser incorporado en el suelo debe mantener alta la materia orgánica. Sin embargo, es crucial que la materia orgánica sea estable y madura (Vázquez y col., 2015). Ensayos de fitotoxicidad son idóneos para evitar riesgos ambientales, y la madurez del compost suele ser evaluada mediante ensayos de germinación (Pierantozzi y col., 2012). El número de semillas germinadas y la longitud de elongación de la raíz se utilizan para calcular el índice de germinación de un extracto líquido (Zucconi y col., 1981). Se considera que el compost puede tener efectos de inhibición, si se obtienen índices de germinación por debajo del 80% (Tiquia y col., 1996).

### **1.3 Biopesticidas**

Los pesticidas químicos pueden tener ciertas ventajas a la hora de compararlos con los biopesticidas como, por ejemplo, la supresión de forma permanente de ciertas plagas, el almacenamiento a largo plazo y el hecho de tener un efecto rápido y visible (Patyka y col., 2016). Sin embargo, tienen otras desventajas importantes como la contaminación química, los cambios en el equilibrio de los ecosistemas, los problemas de rebrotes de plagas, la resistencia y los peligros para el medio ambiente y la salud humana (Pimentel, 2014). Todo ello ha contribuido a crear regulaciones estrictas sobre los pesticidas químicos. Los esfuerzos de control de plagas más reflexivos están incorporando cada vez más el control biológico a través de biopesticidas (Blackburn y col., 2016). A nivel mundial, el mercado de bioplaguicidas está creciendo a una tasa anual del 44% en América del Norte, 20% en Europa y Oceanía, 10% en América del Sur y del 6% en Asia. (De la Cruz y col., 2014).

La utilización de residuos agroindustriales y la tecnología de fermentación en estado sólido ofrecen alternativas en la producción de biopesticidas con ventajas frente a las fermentaciones sumergidas convencionales, como la reducción de costes y consumo de energía, la baja producción de agua residual y la obtención de productos de alta estabilidad (De la Cruz y col., 2014).

En general, la aplicación de los productos de biocontrol se realiza por aspersion en una suspensión que contiene una alta concentración de esporas, pero hay casos en los que se utiliza la materia fermentada en el suelo; en este caso, la aplicación se realiza en formato granular (Ash, 2010; Babu y col., 2004)

En la Tabla 1.2 se presentan productos formulados a base de organismos patógenos bioplaguicidas y fitofortificantes que cumplen con las legislaciones actuales de comercialización APA/1470/2007 (Agrocabildo, 2014).

Tabla 1.2 Bioplagicidas y fitofortificantes de distribución aprobada en base al Reglamento (CE) no 1107/2009 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 21 de octubre de 2009, relativo a la comercialización de productos fitosanitarios (Agrocabildo, 2014)

COMPOSICIÓN O MATERIA ACTIVA	EFFECTO	CULTIVOS AUTORIZADOS
<i>Bacillus subtilis</i> 15,67% (5,13 x 10 <sup>10</sup> UFC/g) (esporas)	Fungicida, bactericida	Berenjena, fresaes, frutales de hueso, lechugas y similares, manzano, peral, pimienta, tomate y vid.
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> 10 <sup>7</sup> UFC/mL + <i>Bacillus licheniformis</i> 10 <sup>7</sup> UFC/mL + <i>Bacillus pumilus</i> 10 <sup>7</sup> UFC/mL	Inductor de resistencia sistémica y activador de autodefensas en plantas y cultivos frente a condiciones bióticas adversas causadas principalmente por el ataque de diferentes tipos de patógenos como <i>Botrytis</i> , <i>Sclerotinia</i> , <i>Stemphylium</i> .	Plantas y cultivos
<i>Bacillus licheniformis</i> 4,0x10 <sup>8</sup> UFC/mL + <i>Bacillus pumilus</i> 1,0x10 <sup>8</sup> UFC/mL	Producto fitofortificante obtenido de microorganismos de las especies <i>Bacillus pumilus</i> y <i>Bacillus licheniformis</i>	Plantas y cultivos
<i>Bacillus subtilis</i> 1,37% (1,7 x 10 <sup>10</sup> UFC/g) (esporas)	Fungicida, bactericida	Fresas y tomates
<i>Bacillus thuringiensis Aizawai</i> 15% (15 mill. DE U.I./G) [WG] p/p	Insecticida	Algodonero, hortalizas del género <i>brassicas</i> , pimienta, tomate, vid, arroz, horticolas y olivo.
<i>Bacillus thuringiensis Kurstaki</i> 32% (32 mill. DE U.I./G) [WG] p/p	Insecticida	Alcornoques, algodónero, cítricos, coníferas, encinas, fresaes, frutales de hoja caduca, horticolas, olivo, platanera, robles, arroz y vid.
Bacterias ácido lácticas + levaduras + bacterias fototrópicas + agua + melaza de caña de azúcar + vinagre de vino + extracto de plantas	Actúa como repelente de insectos, tiene efecto insecticida natural, reduce y favorece el control de enfermedades causadas por hongos, aumenta la resistencia natural de las plantas e inhibe el desarrollo de patógenos del suelo.	Plantas y cultivos
<i>Beauveria bassiana</i> 2,3% (2,3 x 10 <sup>9</sup> conidias viables/mL) [OD] p/v	Insecticida	
<i>Trichoderma harzianum</i> 0,5% (1x10 <sup>8</sup> UFC/g) + <i>T. viride</i> 0,5% (1x10 <sup>8</sup> UFC/g) [WG] p/p	Fungicida	Calabacín, fresaes, pepino, pimienta, simientes de remolacha azucarera y tomate
<i>Verticillium lecanii</i> 14,8% (1 x 10 <sup>10</sup> esporas/g) [WP] p/p	Insecticida	Pimienta y tomate.

## 1.4 *Bacillus thuringiensis*

*Bacillus thuringiensis* (Bt) es uno de los agentes de control biológico más utilizados para el control de larvas de insectos plaga, ocupa una posición dominante en el campo de los biopesticidas y es ampliamente utilizado para el control de insectos de las órdenes de lepidópteros, dípteros y coleópteros (Wang y col., 2014). Bt es un bacilo Gram positivo, de flagelación peritrica, que mide de 3 a 5  $\mu\text{m}$  de largo y de 1 a 1,2  $\mu\text{m}$  de ancho y que tiene la característica de desarrollar esporas de resistencia elipsoidales (Caballero y Ferré, 2001).

El uso de Bt como bioinsecticida comercial es debido a la notable capacidad de esta bacteria para producir grandes cantidades de proteínas cristalinas insecticidas durante la fermentación (Khedher y col., 2011). La principal diferencia entre Bt y otros bacilos radica en la formación de un cristal proteico en el momento de la esporulación (Schnepf y col., 1998). En la Figura 1.2 a) se puede observar dentro de las células vegetativas, esporas y cristales de Bt una imagen de microscopio óptico de contraste de fases ( $\times 1000$ ). En la Figura 1.2 b) se observan las esporas y los cristales ( $\times 18\ 000$ ) en una imagen de microscopía electrónica de barrido.

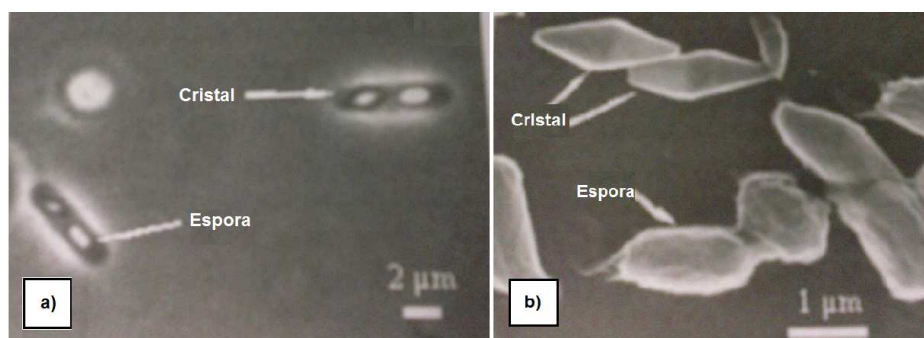


Figura 1.2 Características microscópicas de *Bacillus thuringiensis* (cristales paraesporales y esporas). Imagen recogida de Iriarte y Caballero (2001).

### 1.4.1 Origen de *Bacillus thuringiensis*

El conocimiento de organismos capaces de generar enfermedades en los insectos se remonta a la antigüedad cuando fueron descritos por primera vez en China los efectos del hongo *Cordyceps* sobre el gusano de seda *Bombyx mori*. Desde entonces, el número de enfermedades citadas ha ido en aumento, viéndose incrementado especialmente a partir del siglo XIX, coincidiendo con el desarrollo de la microbiología (Caballero y Ferré, 2001).

El desarrollo de las primeras formulaciones de bioinsecticida basadas en Bt se remonta a las primeras décadas del siglo pasado, tras las primeras publicaciones por el bacteriólogo Japonés Shigetane Ishiwata en 1901 y posterior reaslamiento en 1911 por el alemán Ernst Berliner, quién publicó la descripción de una bacteria similar aislada en la región alemana de Turingia a partir de larvas enfermas de la polilla mediterránea de la harina, *Ephestia kuehniella*, y la nombró *Bacillus thuringiensis*, en honor a su procedencia (Caballero y Ferré, 2001).

En 1938 se desarrolló en Francia el primer producto comercial de Bt “Sporeine,” pero fue apartir de los años 60 cuando se comenzaron a realizar pruebas de campo contra plagas agrícolas. En la década de los años 80 se da el descubrimiento de Bt *israelensis* y la comercialización de productos para el control de mosquitos, especialmente contra vectores de enfermedades. A través de los años se han realizado diversas investigaciones con este microorganismo, sin embargo, los estudios de su impacto en la microflora del suelo son limitados, del mismo modo que son escasos los estudios sobre los efectos de Bt en suelo (Rausell y col., 2001).

#### 1.4.2 Biología de *Bacillus thuringiensis*

El ciclo de vida de Bt inicia con la germinación de las esporas (fase vegetativa), proceso que tiene una duración de unos pocos minutos, cuando emerge la célula vegetativa. No se conoce con exactitud cuáles son los requerimientos para la germinación de la spora en el suelo, pero se sabe que el factor fundamental que lo provoca dentro del intestino de los insectos es el pH alcalino. La célula vegetativa se multiplica en condiciones aerobias y se duplican por bipartición (Iriarte y Primitivo, 2001). En la Figura 1.3 se presenta el ciclo biológico de Bt en su fase vegetativa.

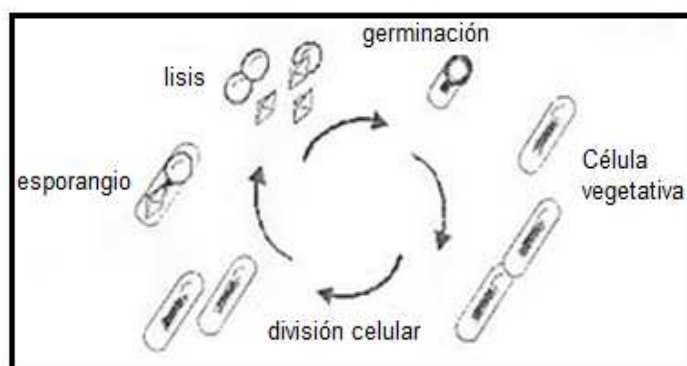


Figura 1.3 Ciclo biológico de *Bacillus thuringiensis*, fase vegetativa (Fuente: Iriarte y Caballero, 2001)

### **Fase de esporulación**

La fase de esporulación inicia cuando la célula de Bt sufre un período de privación de nutrientes, dentro de ella comienzan una serie de cambios genéticos, metabólicos, estructurales, llamado proceso de esporulación, que conducen a la diferenciación, en el interior de la célula vegetativa original, de una célula durmiente (la endospora) y un cristal paraesporal. La célula-madre (o sea, la célula vegetativa original que generó la endospora) finalmente se autolisa, liberando la espora y el cristal. La espora es capaz de permanecer en estado durmiente varios años (Iriarte y Primitivo, 2001).

La espora de Bt es de contorno elipsoidal y ocupa una posición subterminal dentro de la célula vegetativa. Es altamente refringente. Resiste temperaturas extremas de 70-80°C, resistente a la desecación y a muchos desinfectantes. Simultáneamente a la formación de la espora tiene lugar la formación del cristal paraesporal. Las esporas son fácilmente diseminadas por el aire y cuando caen en medios ricos en nutrientes, se desencadena su germinación, se reinicia la actividad metabólica, de modo que cada espora genera una nueva célula vegetativa (Iriarte y Caballero 2001).

### **Formación de la espora y cristal paraesporal de Bt**

En la Figura 1.4 se presenta el diagrama de formación del cristal paraesporal y la espora en siete fases según se describe en Caballero y col. (2001):

- Fase I, el ADN forma un eje longitudinal en la bacteria (célula viable).
- Fase II, se forma un septo transversal que divide a la célula en dos partes asimétricas, encerrando una copia de ADN en cada una de ellas, la membrana de la célula mayor crece rodeando a la más pequeña (preespora).
- Fase III, el córtex, espacio comprendido entre esas dos membranas, se rellena de un único peptidoglucano, que protege a la bacteria de la presión osmótica. Y se forma el cristal paraesporal.
- Fase IV, hay acumulación de proteínas altamente resistentes que forman la cubierta de la espora.
- Fase V, se desarrolla entre la fase IV y VI donde el cristal define su forma.
- Fase VI, la espora se rodea de una capa más fina llamada exosporio.
- Fase VII, la espora madura en esporangio intacto.

Finalmente, para liberar a las esporas y los cristales se requieren enzimas líticas. Cada cristal paraesporal, está constituido por proteínas tóxicas y presenta una importante diversidad de formas dependiendo de las proteínas que lo integran, encontrándose cristales bipiramidales, cúbicos, romboides, esféricos, rectangulares,

triangulares e irregulares. Estas proteínas tóxicas se conocen como proteínas Cry, codificadas por los genes Cry.

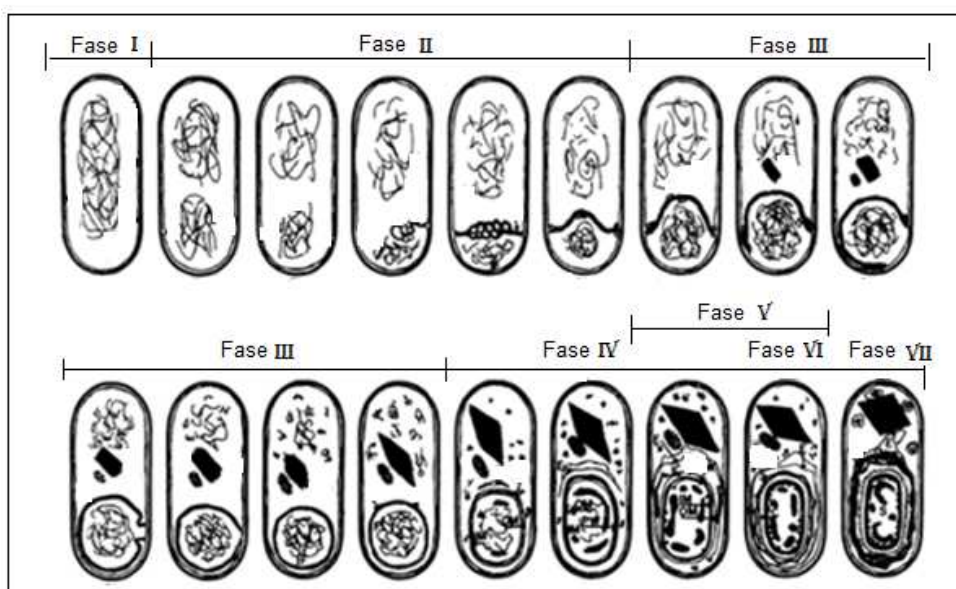


Figura 1.4 Diagrama del proceso de esporulación de Bt

### 1.4.3 Clasificación de las proteínas Cry de Bt

Una primera clasificación de las proteínas Cry de Bt fue propuesta por Höfte y Whiteley en 1989, basándose en el espectro insecticida de estas proteínas. Los genes conocidos hasta entonces se agruparon en cuatro clases: Cry I (toxinas frente a lepidópteros), Cry II (toxinas frente a lepidópteros y dípteros), Cry III (toxinas frente a coleópteros) y Cry IV (toxinas frente a dípteros). Más tarde se encontraron nuevos genes que codificaban nuevas proteínas insecticidas frente a lepidópteros, coleópteros y nematodos y se incluyeron en esta clasificación como clases Cry V y Cry VI (Iriarte y Caballero 2001).

Hasta ahora, se han clonado y secuenciado más de 200 genes Cry, cuyas proteínas Cry se han distribuido en 50 grupos y varios subgrupos, cada uno presentando una toxicidad muy concreta a un determinado tipo de insecto (Caballero y Ferré, 2001). El aumento en el número de nuevos genes Cry descubiertos hizo que la clasificación vigente hasta ese momento se quedara obsoleta. Esto desencadenó el diseño una nueva nomenclatura propuesta por Crickmore y col. (1998), basada en la similitud de la secuencia primaria. En esta nueva nomenclatura se coloca el nombre genérico de la familia (Cry), los números romanos se cambian por números arábigos, que agrupan a las que comparten el 45% de identidad (Cry 1, 2, 3, etc), a continuación le sigue una

letra mayúscula donde aumenta la identidad entre 45 y 78% (Cry1A, Cry1B, etc.), en tercer lugar se asigna una letra minúscula que corresponde a identidades de entre 78 - 95% (Cry1Aa, Cry1Ab, etc.) y finalmente se utiliza de nuevo un número arábigo para identidades superiores al 95% (Cry1Aa1, Cry1Aa2, etc.) (Bravo, 2001). Se cree que la elevada diversidad de estas proteínas insecticidas es debida a un alto grado de plasticidad genética. Muchos de estos genes están asociados a elementos transponibles que puede facilitar la amplificación del gen, lo que lleva a la evolución de nuevas toxinas (Bravo, 2001).

La Figura 1.5 presenta la clasificación de los géneros Lepidóptera, Coleóptera y Díptera según la proteína Cry I, III y IV respectivamente, así como también según la especificidad de la toxina (Höfte y Whiteley, 1989).

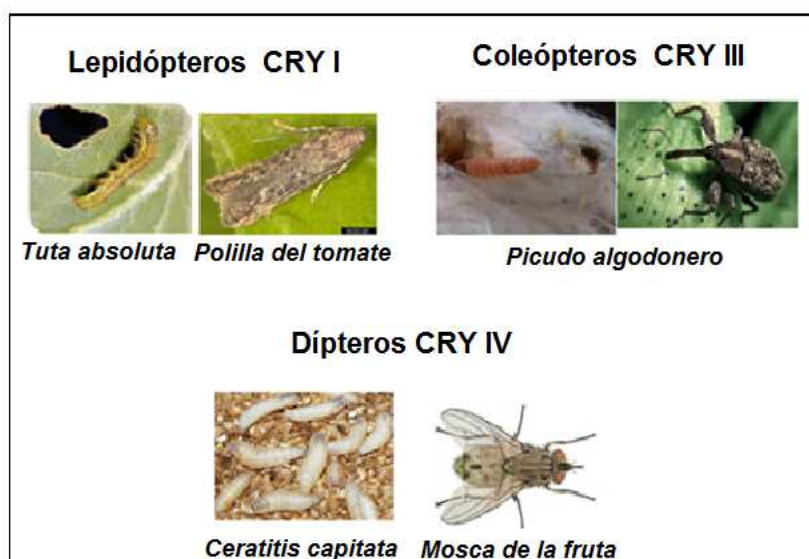


Figura 1.5 Proteínas CryI, III y IV que controlan estadios larvarios de insectos plaga de Lepidópteros, Coleópteros y Dípteros respectivamente.

### **Modo de acción de las proteínas paraesporales de Bt**

El modo de acción de Bt implica su ingestión por parte de las larvas de insectos plaga para ser activado y ejercer su efecto insecticida, de manera que la velocidad de actuación resulta más lenta que cuando se utilizan insecticidas químicos que pueden actuar por ingestión o contacto. Aunque el biopesticida sea más lento en controlar a los organismos plaga, es efectivo en controlar el daño a las hojas de los cultivos, debido a que la larva sufre una parálisis bucal a las pocas horas de haber ingerido la toxina (Iriarte y Caballero, 2001). Además, estas proteínas son biodegradables, por lo que no contaminan suelos ni aguas y son inocuas para el ser humano. Por estos



motivos, esta bacteria está siendo utilizada como una alternativa ecológicamente sostenible a los pesticidas químicos (Caballero y col 2001).

Los síntomas que se observan a partir de que las larvas de insectos susceptibles que ingieren los cristales y esporas de Bt son: cese de la ingesta, parálisis del intestino, diarrea, parálisis total y finalmente la muerte. De manera general se acepta que las toxinas Cry son toxinas formadoras de poro que ejercen su actividad tóxica al provocar un desequilibrio osmótico en las células epiteliales donde se insertan en la membrana (Bravo y col., 2011).

### **1.5 Producción de biopesticidas a base de *Bacillus thuringiensis***

La producción de Bt para su uso comercial se ha garantizado debido a que es una bacteria que solo afecta a los organismos objetivo (coleópteros, lepidópteros y dípteros), segura contra humanos, animales, fauna y el medio ambiente (Wang y col., 2014). Sin embargo, su coste elevado de producción hace que su aplicación a gran escala sea reducida. Estudios publicados determinan que en el proceso de producción convencional de Bt (mediante fermentación sumergida), el coste de las materias primas varía entre un 30 y un 40% del coste total en función de la capacidad de producción de la planta (Tirado y col., 2001). Por lo tanto, la viabilidad de la producción de este bioinsecticida dependerá del sustrato utilizado. En la búsqueda de los medios de crecimiento adecuados para la producción industrial de Bt se han realizado diversos estudios en Fermentación sumergida (SmF) que se resumen en la Tabla 1.3 donde se detalla el objetivo, las condiciones del experimento, los resultados y las referencias.

Aunque se utilicen materiales residuales como sustratos, el uso de fermentación sumergida para la producción de Bt en muchas ocasiones no resulta económicamente viable debido al alto costo de los equipos requeridos tales como:

- El mismo fermentador con la instrumentación necesaria.
- Centrífuga de alta velocidad de enfriamiento.
- Instalaciones de secado, por ejemplo, secador en spray.

Tabla 1.3 Investigaciones en Fermentación sumergida (SmF) utilizando Bt

Objetivo	Condiciones de experimento	Resultados	Referencias
Mezclar Bt con fertilizantes de plantas (NPK) para control de larvas de <i>Aedes aegypti</i> .	Las formulaciones experimentales se realizaron de 0,1% piriproxifeno, 0,1 y 0,5% spinosad, 0,25% diflubenzuron y 1 y 5% Bt israelensis (10 y 50 g L <sup>-1</sup> de NPK).	El incluir Bt <i>israelensi</i> al NPK no tuvo buen resultado debido a que Bti queda entre las partículas de fertilizante y no en contacto con las lavas.	(Darriet, 2015)
Estudiar el efecto de la aireación en la cinética de fermentación de Bt	Trabajo con 2%(v/v) de inóculo de Bt crecido en caldo de triptosa fosfato en fermentación por 12 h y evaluaron proteína mediante Bradford.	Los resultados muestran que la demanda de oxígeno de las bacterias para el crecimiento y la esporulación no son idénticas.	(Rahbani y col., 2015)
Evaluar el crecimiento de Bt en residuo industrial del licor de maíz y en triptosa con y sin adición de glucosa	Las fermentaciones se realizaron en matraces Erlenmeyer de 250 mL con 50 mL de medio de cultivo, colocados en un incubador, con agitador a 150 rpm, 30°C durante 120 horas	Los mejores resultados se obtuvieron utilizando el licor de maíz suplementado con glucosa que resultó ser también el medio de cultivo más económico.	(Ernandes y col., 2013)
Mejorar la producción de bioinsecticidas, investigando el shock y estrés térmico en la adaptación de las esporas al calor	Se usó contaje de UFC y shock térmico a 80 °C durante 10 min para determinar esporas	EL shock térmico no afectó a la capacidad de las esporas de Bt para crecer. Por lo tanto, el shock térmico no causó letalidad celular y no hubo disminución de la delta-endotoxina	(Khedher y col., 2011)
Producir biopesticida empleando agua industrial del residuo de almidón	Utilización de inóculo de Bt al 2% (v/v) cultivado en caldo de soja tréptico y agua residual del residuo de almidón	Residuo de almidón esterilizado fermentado de 8 a 12 horas. El seguimiento de población se realizó mediante contaje de UFC/mL	(Khanh Dang y col., 2009)
Evaluar la viabilidad de utilizar aguas residuales agroindustriales y lodos de aguas residuales para la producción de Bt var. kurstaki	Aguas residuales de la industria del almidón, aguas residuales de matadero y lodos secundarios de tratamiento de aguas residuales fueron utilizados para la producción de Bt	El lodo de aguas residuales secundario demostró ser un medio adecuado para la producción de toxinas de Bt y proteasas alcalinas usando un fermentador de 100L de volumen de trabajo.	(Yezza y col., 2006)
Comparar el crecimiento de Bt en lodos hidrolizados y sin hidrolizar en fase líquida	Se utilizaron muestras de lodos en tres preparaciones diferentes: sin pre-tratamiento, con tratamiento con ácido (lodo hidrolizado) y el sobrenadante obtenido después de la centrifugación de los lodos hidrolizado.	Lodos hidrolizados producen mayores recuentos de células y esporas en comparación con los lodos no hidrolizados y el sobrenadante del lodo hidrolizado. Se produjo un crecimiento de células viables (2.0E+07 CFU/mL) y el recuento de esporas (1.8E+07 CFU/mL).	(Tirado y col., 2001)

La metodología de la FES ofrece un enfoque alternativo y ventajas como el bajo requerimiento de agua y el menor volumen de los equipos. En la Tabla 1.4 se resumen las investigaciones encontradas que reportan la producción de Bt en FES.

Tabla 1.4 Investigaciones utilizando fermentación en estado Sólido y Bt.

Objetivo	Condiciones del experimento	Resultados	Referencias
Producir biopesticida incorporando Bt en fermentación semisólida.	Estudio en fermentación semi sólida: 60% de salvado de trigo con 40% lodos de aguas residuales y el 60% de paja de arroz con 40% lodos de aguas residuales. Lodos esterilizados antes de su uso. 10 días de incubación.	Los resultados indican el potencial de los lodos de aguas residuales en una fermentación semi-sólida utilizando salvado de trigo y paja de arroz como una materia prima alternativa para la producción de <i>Bacillus thuringiensis</i> .	(Mona Fatin y col., 2016)
Explorar un método rentable para la producción masiva de Bt por FES	Se utilizó el sustrato gastado del cultivo de champiñón y se realizaron 4 combinaciones con diferentes sustratos utilizando inóculo de Bt 10% (v/v) en cada una. Investigación a escala Erlenmeyer de 250 mL.	Los resultados sugieren que el sustrato de hongo es una materia prima muy rentable para la producción masiva de Bt y que la FES proporciona una solución para el tratamiento de este residuo.	(Wu y col., 2014)
Explorar la viabilidad de los residuos del gusano de seda para el cultivo Bt en semi- FES	La investigación se realizó utilizando como sustratos de crecimiento el residuo de crisálida y las heces del gusano de seda por separado, esterilizados y molidos.  Escala Erlenmeyer	Se obtuvieron resultados similares para los dos residuos, con un máximo en la producción de esporas de 3E+10 UFC/g a las 96h de incubación.	(Patil y col., 2013)
Explora la eficacia de la harina de patata cruda (PF) como suplemento al medio comercial Luria bertani	Medios usados (g/l): M1 LB M2 LB + 10% (w/v) de harina de patata  Escala Erlenmeyer	Los mejores resultados para la producción de endotoxina de Btk se obtuvieron en M2, con un aumento de producción respecto a M1 de 6 veces.	(Smitha y col., 2013)
Demostrar la viabilidad del uso de residuos de cocina para la producción de bio pesticidas	Se usó una mezcla de 55,21% residuos de cocina, 22,08% de salvado de trigo, 1,04% torta de soja, 11,04% de cáscara de grano, y 0,63% de iones mixtos.  En reactores de 35, 40, 45 L de capacidad.	En las condiciones optimizadas de FES, se obtuvo un recuento de esporas de 5,01E+10 UFC/g y entomotoxicidad de 15.200 UI/mg después de 48 h de fermentación	(Zhang y col., 2013)
Investigar la viabilidad de utilizar lodos de aguas residuales como sustrato para producción de Bt a bajo costo por FES	Mediante una fermentación secuencial se trabajaron con dos cepas Bt <i>israelensis</i> y Bt. <i>sphaericus</i> .  Las cepas se cultivaron en LBL. Con FES se trabajó en reactores de 8 L y 4 tipos diferentes de sustrato esterilizado.	Este estudio sugiere que los lodos de aguas residuales son un sustrato adecuado para la producción de Btk por FES. La mezcla de lodo y salvado de trigo dio el más alto rendimiento de células viables (5,98E+10 CFU/g), recuentos de esporas (5,26E+10 CFU/g)	(Zhuang y col., 2011)

Como se puede ver en la Tabla 1.4, de forma general las investigaciones desarrolladas hasta el momento se han realizado a escala laboratorio, utilizando pocos gramos de material, y en condiciones muy controladas. El escalado del proceso será pues un reto importante para determinar la viabilidad industrial de la FES para la producción de Bt. Las investigaciones resumidas en la Tabla 1.4 se han realizado siempre sobre residuo previamente esterilizado. Trabajar con residuo sin esterilizar será otro reto importante.



## CAPÍTULO 2

---



El Grupo de Compostaje de la UAB trabaja actualmente en una línea de investigación enfocada a obtener productos de valor añadido a partir de residuos orgánicos mediante fermentación en estado sólido, intentando desarrollar los procesos, productos y sus posibles aplicaciones en el marco de un cambio de paradigma, del residuo al producto. Esta línea de investigación se impulsó mediante el proyecto “*Del residuo al producto: aplicación de la fermentación en estado sólido para la obtención de enzimas de interés (lipolíticas, proteolíticas y lignocelulósicas) a partir de residuos industriales orgánicos*” (WA2PRO, Ref. CTM2012-33663, Convocatoria: Plan Nacional I+D+i 2008-2011) y continua en el actual proyecto “*Estrategias de optimización de procesos de obtención de bioproductos a partir de residuos orgánicos mediante fermentación en estado sólido*” (BIOPRO, CTM2015-69513-R, Programa Estatal de Investigación, Desarrollo e Innovación Orientada a los Retos de la Sociedad (convocatoria 2015). Además, tendrá continuidad en el proyecto europeo DECISIVE (*A DECentralized management Scheme for Innovative Valorization of urban biowaste*, grant agreement No 689229, Horizon 2020) recientemente iniciado en Setiembre de 2016 que tiene entre sus objetivos la producción de biopesticidas a gran escala a partir de digestatos de FORM y su aplicación agrícola.

En estos proyectos se enmarca este trabajo que pretende alcanzar los siguientes objetivos:

## **2 Objetivo General**

Utilización de residuos sólidos orgánicos biodegradables de amplia producción como sustrato para el crecimiento de *Bacillus thuringiensis* mediante fermentación en estado sólido sin pretratamiento previo. Las propiedades de este microorganismo conferirán al producto final características biopesticidas sin consecuencias tóxicas para su aplicación al suelo como enmienda orgánica.

### **2.1. Objetivos específicos**

1. Evaluar los residuos locales disponibles como sustrato mediante parámetros fisicoquímicos.



2. Seleccionar las cepas adecuadas de *Bacillus thuringiensis* para obtener propiedades biopesticidas frente a una determinada plaga.
3. Determinar los métodos analíticos (procedimientos microbiológicos) adecuados para el seguimiento del comportamiento del microorganismo en un proceso de FES en condiciones de residuo inicial estéril y no estéril.
4. Evaluar diferentes estrategias de operación para asegurar la sobrevivencia y el crecimiento del microorganismo incorporando diferentes cantidades de inóculo a la muestra en estudio y con diferente residuo.
5. Realizar el proceso de FES a escala laboratorio, semipiloto y piloto.
6. Escalar el proceso empleando el compostaje doméstico.
7. Evaluar la calidad del producto final de la FES para su utilización como enmienda orgánica.

## CAPÍTULO 3

---



### 3 MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1 Introducción

En este capítulo se describen los materiales y los métodos generales que se han utilizado como base para la realización del trabajo experimental de la tesis. Los residuos empleados se describen en cada capítulo concreto, así como los métodos y equipos utilizados exclusivamente en ellos.

El trabajo de investigación de la presente tesis se ha desarrollado en el Departamento de Ingeniería Química, Biológica y Ambiental de la Universitat Autònoma de Barcelona. Los experimentos de fermentación líquida, sólida (reactores de 500 mL, 4.5 y 10 L de capacidad) y sus análisis correspondientes se llevaron a cabo en los laboratorios del mismo Departamento. El escalado a reactores de 50 L de capacidad y el montaje de los compostadores domésticos se realizaron en la planta piloto del grupo de investigación en compostaje (GICOM), situada en la zona exterior del edificio de la Escuela de Ingeniería.

#### 3.2 Cepas de *Bt* y medios de cultivo

##### 3.2.1 Cepas de *Bt*

Para el desarrollo del trabajo experimental se estudió el comportamiento de tres cepas comerciales de *Bacillus thuringiensis*, la primera adquirida de “American Type Culture Collection” - ATCC y otras dos variedades obtenidas de la “Colección Española de cultivos tipo” – CECT. En la Tabla 3.1 se enumeran las cepas según la variedad y código correspondiente.

Tabla 3.1 Variedades de cepas de *Bacillus thuringiensis* utilizadas en el desarrollo de la tesis

Variedad	Código
Variedad <i>kurstaki</i>	HD-73 ATCC 35866
Variedad <i>kurstaki</i>	CECT 4497
Variedad <i>israelensis</i>	CECT 5904

La utilización de dos cepas de variedad *kurstaki* de distinto origen en el desarrollo de esta investigación fue debido a la necesidad de renovar la cepa de trabajo, HD 73 ATCC 35866, disponible de un trabajo de investigación anterior. Por la disponibilidad y costos se adquirió una nueva cepa variedad *kurstaki* de la Colección Española de Cultivos tipo CECT

### 3.2.2 Medios de cultivo

Siguiendo las recomendaciones de ATCC y CECT, el medio de cultivo utilizado para el crecimiento de Bt en medio líquido fue Nutrient Broth n°2 (OXOID®), a sí como Nutrient agar (OXOID®) para el cultivo en placa Petri. En la Tabla 3.2 se presentan las características de estos dos medios de cultivo comerciales.

Tabla 3.2 Composición de los medios comerciales de OXOID®

	Nutrient Broth n°2	Nutrient agar
Formula Típica	25g/L	28g/L
Polvo "Lab-Lemco"	10	1.0
Peptona	10	5.0
Cloruro de sodio	5	5.0
pH	7.5 ± 0.2	7.4 ± 0.2
Extracto de levadura	-	2.0
Agar	-	15.0

### 3.3 Metodología

#### 3.3.1 Obtención de inóculo de Bt para su uso en FES

##### **Reconstitución de la cepa liofilizada de Bt**

Las cepas adquiridas de la CECT se presentan liofilizadas. Según la Colección Española de cultivos tipo ([www.cect.org](http://www.cect.org)) se deben tener en cuenta las siguientes consideraciones:

- Conservar adecuadamente las ampollas que contienen el inóculo que no se abran inmediatamente, protegerlas de la luz y mantenerlas a temperatura controlada (entre 4 y 24°C, preferiblemente 18°C).

- No congelar. En este estado la viabilidad puede mantenerse por períodos de tiempo muy largos, se aconseja planificar la recuperación de los liófilos tan pronto como sea posible tras su recepción y en todo caso no más tarde de un año.
- Comprobar que dispone del medio de cultivo recomendado para cada cepa. Además del medio líquido necesario para la reconstitución del liófilo, en la mayoría de los casos es conveniente que cuente también con medio sólido (placas de agar).
- Los medios a emplear deben estar recién preparados o conservados en buenas condiciones (no resecos ni con humedad excesiva, sin contaminantes ni precipitados y por un período máximo de tiempo que depende de su composición).
- Utilizar toda la suspensión para inocular un medio sólido (tubo con agar inclinado o placa Petri) y un tubo con 5-10 mL de medio líquido que deberá ser incubado hasta observar crecimiento antes de escalar a volúmenes mayores.

En la figura 3.1(a y b) se observan imágenes de la recepción de la cepa de Bt y la preparación de materiales (agar sólido y líquido) para la reconstitución de dicha cepa. En las imágenes (c y d) se observa la ampolla donde viene la cepa liofilizada y la verificación de la dicha cepa según código y fecha.

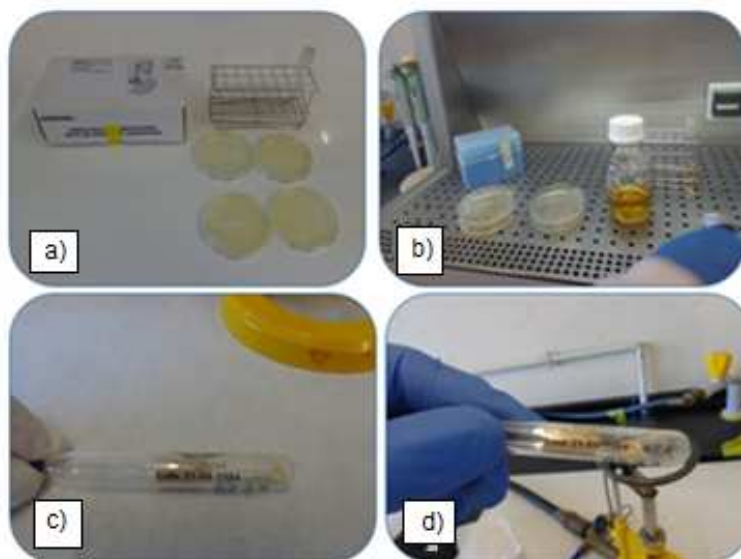


Figura 3.1 Recepción de cepa de Bt y preparación de materiales para su reconstitución (a y b), observación de la cepa liofilizada y verificación según código y fecha (c y d). Confirmación de crecimiento de la cepa reconstituida de Bt

Realizada la reconstitución de la cepa de Bt en medio sólido se procede a la observación de las unidades formadoras de colonias y a su confirmación mediante la observación en microscopio óptico. La identificación de Bt se realiza utilizando la tinción de Gram y la confirmación de esporas con la tinción de Schaeffer y Fulton, mediante coloración con verde malaquita (Figura 3.2 a y b).

Bt también fue observado mediante contraste de fases sin necesidad de tinción, encontrando *bacillus* bien diferenciados con cristal paraesporal y espora en cada célula vegetativa (Figura 3.2 c y d). La confirmación de crecimiento y pureza de Bt se verifica en placa, evaluando la existencia de colonias diferentes en estructura, color, tamaño y forma con respecto a las características propias de Bt.

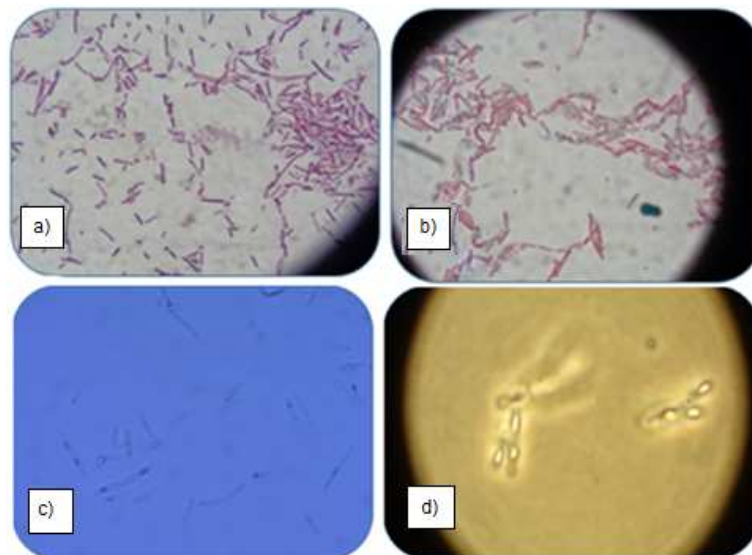


Figura 3.2 Prueba de confirmación de Bt mediante tinción de Gram (a), Confirmación de esporas mediante tinción de Schaeffer y Fulton con verde malaquita (b), Células y esporas sin tinción por contraste de fases (c y d) observadas al microscopio óptico (100X)

Confirmada la identificación de la cepa pura en líquido (Nutrient Broth n°2) y sólido (Nutrient agar) se procede a su utilización como primer inóculo para pasar a volúmenes mayores. En el caso de que se requiera conservar la cepa original, las colonias, previa identificación y confirmación de pureza en placa, se extraen de la placa con el líquido protector del criovial y se guardan en viales con crioperlas (sistema estéril de conservación de cepas microbiológicas, consistente en un criovial de 2mL con faldón, conteniendo 25 crioperlas de vidrio tratadas con crioprotectores que actúan como conservantes del microorganismo). Gracias a este sistema se dispone de un perfecto medio de conservación, y se pueden obtener hasta 25 réplicas de una misma

generación microbiana para utilizar progresivamente durante años. Además, se facilita la inoculación del medio bacteriológico, ya que cada perla equivale a un cultivo, y se evita la formación de cristales de hielo en la recuperación, minimizando el riesgo de la contaminación cruzada. Los viales son congelados a -80°C para su posterior utilización.

### ***Tinción de Gram***

Las bacterias Gram positivas poseen una capa gruesa de peptidoglicán y carecen de membrana externa, mientras que las Gram negativas tienen una capa más delgada de peptidoglicán y poseen una membrana externa (Rodríguez y col., 2005). La tinción de Gram involucra varios pasos:

- **Tinción inicial.** Las células se tiñen con cristal violeta, el cual es el colorante primario. En este paso todas las células se tiñen de morado.
- **Mordente.** Se adiciona yoduro (lugol) que reacciona con el cristal violeta y forma un complejo cristal violeta-yoduro. En este punto todas las células continúan de color morado.
- **Decoloración.** Se adiciona un solvente, el cual actúa lavando el complejo cristal violeta-yoduro de las células Gram negativas. De esta manera, las bacterias Gram positivas continúan moradas y las Gram negativas quedan incoloras. Este es un paso crítico de la tinción, ya que un exceso de solvente puede llegar a decolorar las Gram positivas, mientras que si se utiliza en poca cantidad no decolora las Gram negativas.
- **Contratinción.** Se vuelve a teñir con safranina o fucsina, de manera que las bacterias Gram negativas, que habían sido decoloradas, se tiñen de color rosa a fucsia según el colorante empleado; en tanto, las bacterias Gram positivas no se ven afectadas con la contra tinción y permanecen moradas.

### ***Tinción de Schaeffer y Fulton***

Las esporas son formas resistentes de Bt con una serie de cubiertas muy poco permeables lo cual provoca que sean difíciles de teñir, excepto si se calienta la preparación para permeabilizarlas (Rodríguez y col., 2005). La endoespora ocupa una posición característica dentro de la célula, que puede ser terminal, central o subterminal. Esta localización y el tamaño varía según la especie bacteriana. Para lograr introducir el colorante dentro de la espora es necesario aplicar calor. El colorante verde malaquita se utiliza como colorante primario que posteriormente será



lavado eliminando el color del resto de la célula, pero no de la espora. Como contra tinción se emplea safranina que solo tiñe la célula vegetativa.

Los pasos que se siguieron para la observación de esporas se describen a continuación:

- Sobre un portaobjetos de vidrio, limpio y seco, se coloca un loop de muestra de placa y se extiende en el portaobjetos en una gota de agua miliQ.
- Sobre el extendido se incorpora el colorante verde malaquita, se extiende cuidadosamente y se calienta durante 10 min.
- El calor debe ser homogéneo en toda la muestra extendida, debe haber emisión de vapor sin que la preparación llegue a hervir o secarse. Se puede añadir más colorante si la muestra se empieza a secar.
- Se deja enfriar la lámina por 1 o 2 minutos y se lava con agua durante 30 segundos. Se cubre la preparación con safranina durante 30 segundos más. Posteriormente se lava, escurre y se deja secar para su observación al microscopio.

### **3.3.2 Determinación de las cinéticas de crecimiento de Bt en medio comercial**

Para determinar la velocidad de crecimiento de Bt después de la primera inoculación, fase de latencia si se da, el crecimiento de las células a una velocidad constante (fase exponencial) y analizar la velocidad de crecimiento cuando los nutrientes se van agotando (fase estacionaria), se realizaron cinéticas de crecimiento que se realizaron en condiciones estériles empleando medio comercial OXOID®. Estas cinéticas se iniciaron a partir de la obtención de Bt de una crioperla, la cual fue incorporada a un Erlenmeyer de 250 mL conteniendo 100 mL de medio comercial. Se incubó a 130 rpm y 30°C por un período de 20 horas. La pureza del inóculo se comprobó obteniendo una muestra del medio de crecimiento y sembrando en placa de agar nutriente, las cinéticas se evaluaron mediante muestreos puntuales.

Las cinéticas se realizaron para cada cepa adquirida de Bt, es decir, para Bt *kurstaki* e *israelensis*. El crecimiento se evaluó a través de contaje de células viables y esporas como se detalla más adelante en el punto de Técnicas de seguimiento de Bt. Simultáneamente se separaron muestras del cultivo en estudio para la evaluación de la densidad óptica y el peso seco. La toma de muestras se realizó a las 0, 2, 4, 16, 18, 20, 22, 24, 26 y 42 horas.

La densidad óptica (DO) se midió a 660 nm ( $DO_{660nm}$ ) en un espectrofotómetro (modelo Cary® 50 Bio). Este equipo mide la cantidad de luz dispersada o transmitida a través de la muestra del cultivo de Bt. Todos los bacillos suspendidos dispersan la luz, siendo la dispersión de la luz dentro de ciertos límites, proporcional a la masa del cultivo. A medida que Bt crecía se realizaron diluciones para su óptima evaluación.

### **3.3.3 Procedimientos para la estandarización del inóculo de Bt en medio comercial OXOID® en fermentación sumergida (líquida)**

Para obtener el inóculo de Bt que pueda ser incluido en todos los experimentos con características similares en población ( $UFC\ mL^{-1}$ ) se realizaron cinéticas de crecimiento como se ha descrito anteriormente.

Se utilizaron 100 mL de medio Nutriente broth N°2 con el 10% (v/v) de inóculo de Bt incubándose a 130 rpm a 30°C por un promedio de 20 horas ya que a las 20 horas aproximadamente se encuentra en etapa exponencial de crecimiento, momento óptimo para su uso como inóculo de un medio comercial o de un residuo. Pasado este tiempo se determina densidad óptica, peso seco y recuento de unidades formadoras de colonias y esporas. Según la cantidad de inóculo que se requiera para futuros experimentos continua el proceso de escalado añadiendo siempre al medio de cultivo el 10% (v/v) de Bt crecido en 20 horas. Para obtener el inóculo de Bt concentrado se procede a centrifugar el caldo de cultivo a 3500 rpm por 10 minutos.

## **3.4 Montaje experimental**

### **3.4.1 Reactores utilizados en la investigación**

En el desarrollo de esta tesis doctoral se han utilizado reactores de diferente volumen para fermentación sumergida (líquida) y fermentación en sólido (500 mL, 1,5 L, 10 L y 50L).

#### ***Reactores para fermentación sumergida***

Los reactores para fermentación sumergida fueron adaptados en el laboratorio, siguiendo las premisas que deben proporcionar un ambiente controlado que permita el crecimiento eficaz de las células y la formación del producto (Owen, 1989).

Los reactores fueron vasos Scott para bioprocesos de marca Duran de 2000 mL. Estos reactores fueron adaptados para la producción de Bt, incorporándoles un sistema de agitación con un brazo mecánico adaptado a un pequeño motor de 6 voltios de corriente continua y con el suministro continuo de aire de red. Los reactores se mantuvieron dentro de un baño termostatzado modelo STUART- SBS40 de 335 x 580 x 330 mm (w x d x h) a 30°C. A cada reactor se le incorporó un sistema de mangueras para la entrada y salida de aire. La entrada de aire se controló mediante un rotámetro Tecfluid (modelo 2150) a un caudal de 2NL/h. No fue necesario incorporar antiespumante debido a que no se generó abundante espuma durante la fermentación.

### ***Reactores para fermentación en sólido***

Los reactores utilizados en los experimentos de fermentación en estado sólido fueron validados en pruebas anteriores de compostabilidad (Gea, 2001; Puyuelo, 2012; Puyuelo y col., 2010).

- ***Reactores de 500 mL de capacidad***

Los reactores a escala laboratorio son matraces Erlenmeyer de 500mL colocados en un baño termostatzado de agua a 30°C. Cada Erlenmeyer cuenta con un tubo de plástico que es insertado a través del material hasta el fondo del matraz y por el cual se suministra el aire al reactor. Así mismo cuenta con una rejilla en el fondo que sirve para mejorar la distribución del aire en todo el reactor. También disponen de una tapa de goma con dos orificios: uno para el aire de entrada y otro para los gases de salida.

En la Figura 3.3 se observa una imagen del montaje experimental dónde se sitúan los reactores de 500 mL. Se pueden ver en la figura los reactores sumergidos en baños termostatzados, los caudalímetros másicos y armarios de sensores en la pared (sistema que se requiere para medir y registrar la concentración de oxígeno y controlar el caudal de aire).



Figura 3.3 Reactores de 500 mL sumergidos en baños termostatizados y sistema de medición y de control del caudal de aire y concentración de O<sub>2</sub> y temperatura.

El aire entra en los reactores de forma continua y se toman datos en línea de la concentración de oxígeno en los gases de salida. El montaje está diseñado por líneas en cada una de las cuales se analizan 3 muestras independientes.

Para evitar que la muestra pierda humedad, se cuenta con unos humidificadores que son matraces Erlenmeyer que contienen agua, los cuales están colocados de manera que el aire ingresa en ellos antes de pasar al reactor. Tanto los humidificadores como los reactores se introducen dentro de los baños termostatizados que mantienen el agua a 30 °C. Los gases de salida pasan por una única trampa de agua en donde se recogen los vapores condensados.

Finalmente, la concentración de oxígeno de salida, en porcentaje, se registra en intervalos de un minuto. Estos datos se recogen en un ordenador. En la Figura 3.4 se muestra un esquema del montaje experimental. En esta investigación se utilizaron caudales de aire desde 15 mL/min para el residuo de soja y de 30-35 mL/min para la FORM. Almeida y col. (2015) no encuentran diferencias significativas en la actividad respirometría utilizando caudales de este orden.

En cada reactor de 500 mL se introducen 100 gramos de sustrato sólido. Es preciso conocer el porcentaje de humedad y materia orgánica con que inicia la muestra.

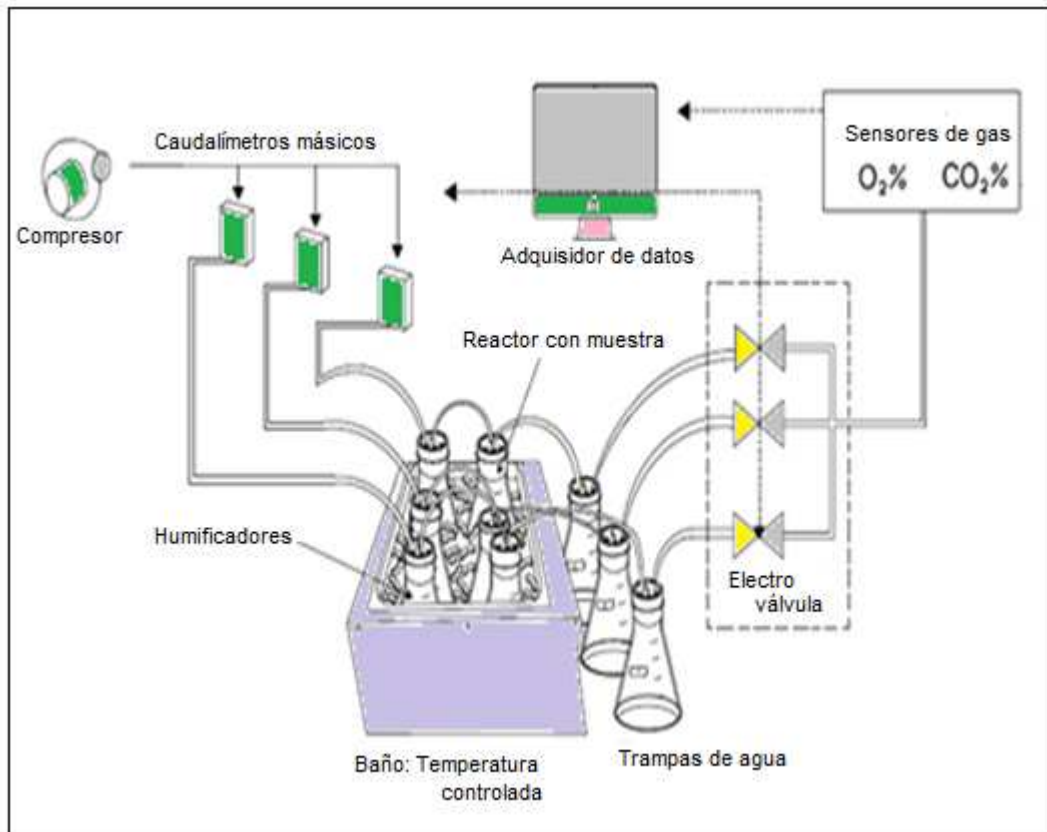


Figura 3.4 Esquema del montaje experimental de reactores de 500 mL (Almeira y col., 2015)

- **Reactores de 4.5, 10 y 50 L de capacidad**

Los reactores de 4.5 y 10 L de capacidad son vasos Dewar© que están acondicionados con una tapa aislada para evitar pérdidas de calor y poseen tensores de sujeción para un buen ajuste de la tapa. Las tapas de los reactores cuentan con tres orificios: dos a ambos lados y uno en el centro. La sonda de temperatura se ubica en el centro de la tapa. Los otros dos orificios son la entrada de aire al sistema y la salida de gases del sistema que se conduce al sistema de análisis correspondiente.

El tubo de entrada de aire se encuentra insertado a una rejilla que va colocada al fondo de cada reactor, ésta sirve como soporte del material y es la que separa los lixiviados (que quedan en el fondo del reactor) del material en estudio y sirve también como cámara de distribución de aire. En la Figura 3.5 (a y b) se presentan imágenes de los reactores de 10 y 4.5 L de capacidad.

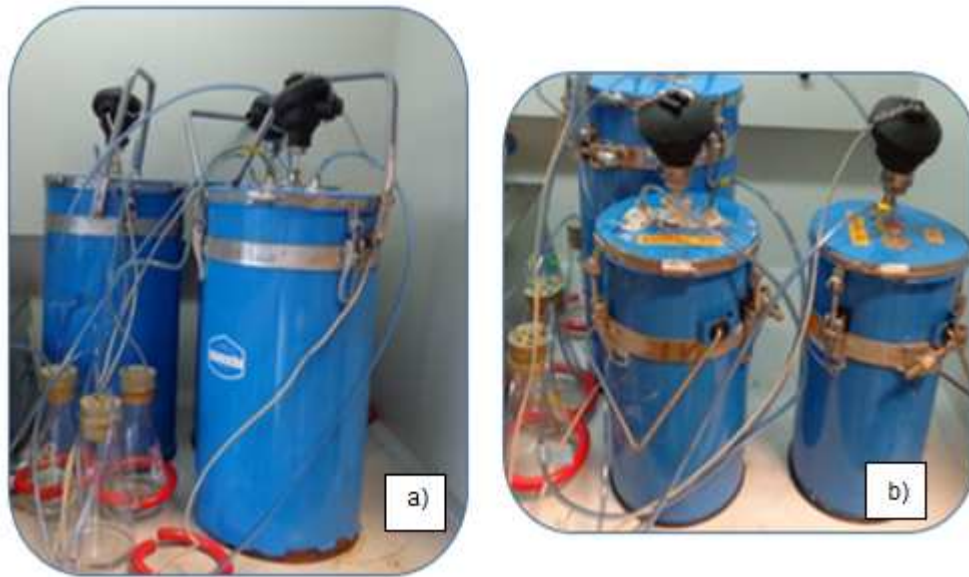


Figura 3.5 a) Reactores de 10; b) Reactores de 4.5 L

El aire que se suministra a los reactores procede de la red de aire comprimido de la Escuela. Un manoreductor reduce la presión de entrada y el caudal se regula para cada reactor mediante un caudalímetro másico de rango 50-1000 NmL/min (MASS-STREAM mod. D-6311, M+W Instruments GmbH).

Las sondas de temperatura recogen la evolución de la temperatura a lo largo del proceso. Los sensores y sondas de temperatura están conectados a un *hardware* desarrollado específicamente y este a su vez a un *software* de adquisición de datos instalado en el ordenador. El programa permite el control del proceso mediante diferentes estrategias de aireación. Estas estrategias serán explicadas con detalle más adelante.

Los gases de salida del reactor pasan por dos trampas de agua en las cuales la humedad de los gases se condensa; así se evita el rápido deterioro de los sensores de oxígeno. Después de pasar por los sensores de oxígeno, los gases son conducidos a la campana de gases o al exterior del laboratorio. Una vez que se realiza el montaje experimental de los reactores es necesario verificar que existe una buena circulación de gases en todo el circuito. Es necesario comprobar el caudal de entrada de aire y el de salida. Es preciso controlar el sistema de tuberías y eliminar las burbujas de agua que puedan aparecer por la condensación generada por las altas temperaturas a las que se llega en el reactor, para que este líquido producto de la condensación no llegue

a los sensores y pueda dañar el sistema. En la Figura 3.6 se presenta el esquema de montaje de los reactores de 10 y de 4.5 L de capacidad.

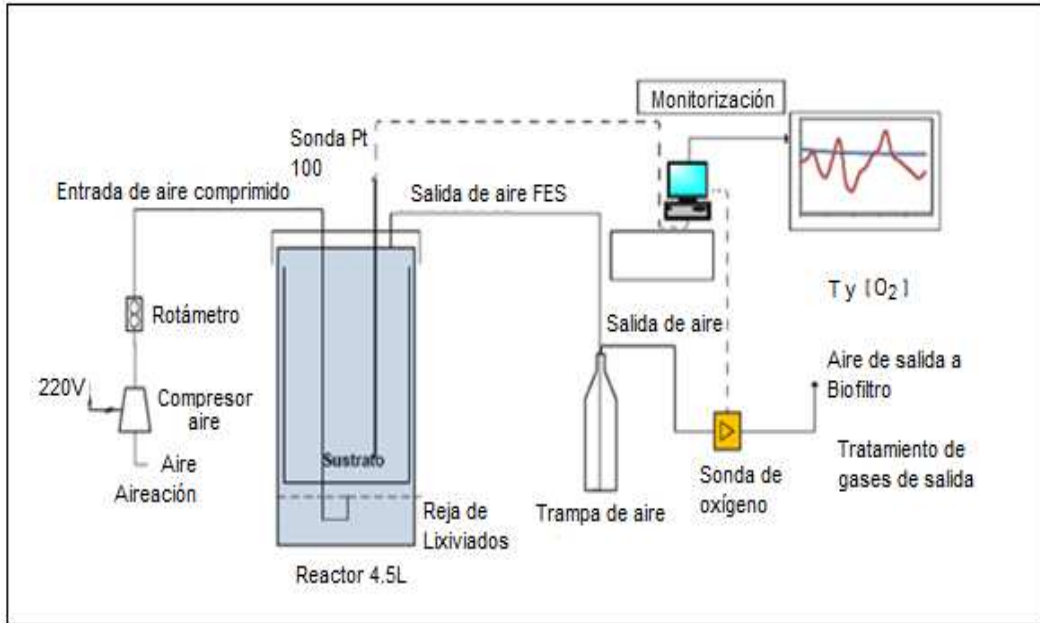


Figura 3.6 Esquema del sistema de montaje de reactores de 10 y 4.5 L

Los reactores de 50 L de capacidad son recipientes de acero inoxidable aislados térmicamente y acondicionados tal como los de 4.5 y 10 L (reja para separación de lixiviados, entrada y salida de aire, sondas de temperatura, sistema de adquisición de datos, etc). La Figura 3.7 muestra una imagen de estos reactores. En este caso se utilizó un medidor/controlador de caudal másico BRONKHORST HI-TEC (Modelo: F-201CV-RAD-33-V) con un rango de caudal de aire entre 0.2 y 10 NL/min de aire.



Figura 3.7 Reactores de 50 L de acero inoxidable

### 3.4.2 Sistemas de control de aireación

En un proceso de fermentación en estado sólido (siguiendo las premisas del proceso de compostaje) los sistemas de aireación son tradicionalmente dos: el de control feedback de oxígeno y temperatura y el control por ciclos. En el grupo de investigación GICOM, tomando en cuenta que para la fermentación aerobia es necesaria una óptima ventilación que suministre oxígeno necesario para el metabolismo de los microorganismos implicados en el proceso, se ha desarrollado un innovador sistema de control por OUR (tasa de consumo de oxígeno) que se describe en esta sección más adelante (Puyuelo y col., 2010). Todos estos sistemas se encuentran descritos con mayor detalle en la tesis de Belén Puyuelo (2012).

- **Control feedback de oxígeno/ temperatura**

En el control feedback, el caudal de aire cambia en función de la evolución de estas variables del proceso. La temperatura de la masa a tratar y/o la concentración de oxígeno de los gases de salida son las variables más empleadas ya que estos dos parámetros se asumen como los principales indicadores de actividad biológica de los microorganismos implicados en el proceso. En este caso, el control se basa en un lazo feedback que controla el porcentaje de oxígeno en los gases de salida modificando el caudal de aire que entra al sistema. El algoritmo de control suministra el caudal máximo definido cuando la concentración de oxígeno es menor del 11.5 %, mientras que aplica el caudal mínimo cuando el porcentaje de O<sub>2</sub> se sitúa por encima del 12.5 %. Si la concentración de oxígeno se encuentra entre 11.5 y 12.5 %, el controlador no actúa y el caudal se mantiene constante. En la Figura 3.8 se muestra el diagrama de flujo para este controlador.

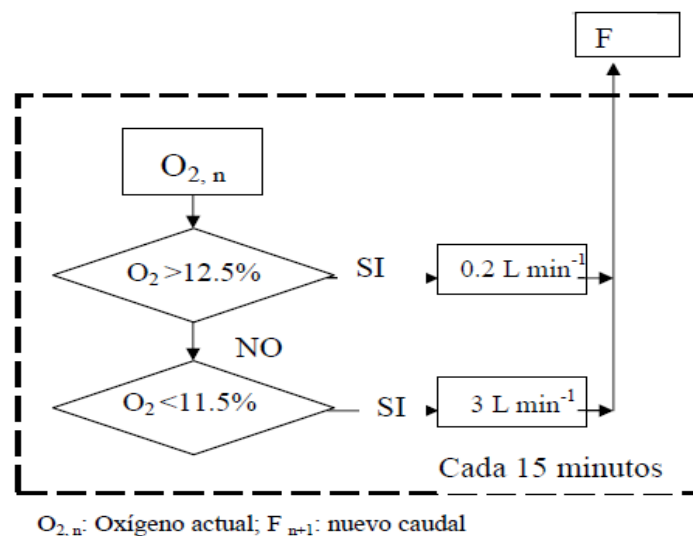


Figura 3.8 Esquema del sistema de control feedback de oxígeno (Puyuelo, 2012)



- **Control por tasa de consumo de oxígeno (OUR)**

La OUR (*Oxygen Uptake Rate*) es una forma de medir el grado de actividad biológica del sistema. La velocidad de consumo de oxígeno varía a lo largo de cada etapa del proceso y depende de la biodegradabilidad del residuo a tratar. En el control por OUR, la variable medida es la OUR determinada gracias a los sensores que miden el contenido de oxígeno en el aire que sale del reactor, la variable manipulada es el caudal y el objetivo de control es la maximización de la OUR (por lo tanto, de la actividad biológica presente en el reactor), es decir, la velocidad de degradación biológica del material.

La OUR se calcula según la ecuación 3.1 utilizando los datos de temperatura, oxígeno final y caudal de entrada obtenidos durante el proceso de fermentación en estado sólido. La OUR puede ser expresada en base a una unidad de materia de la muestra, sea materia seca o materia orgánica. Se le conoce como OUR específica (sOUR). De esta forma el valor obtenido en el experimento puede ser comparable con otros sistemas.

$$OUR = F(0.209 - O_2) (P * 32 * 60) / R * T \quad \text{(Ecuación 3.1)}$$

Donde:

OUR: Velocidad de consumo de oxígeno ( $\text{g O}_2 \text{ h}^{-1}$ )

F: Caudal volumétrico aplicado ( $\text{L min}^{-1}$ )

0.209: Fracción molar de oxígeno en el aire de entrada.

P: Presión a la que se mide el caudal (101325 Pa)

32: Peso molecular del oxígeno ( $\text{g O}_2 \text{ mol}^{-1}\text{O}_2$ )

60: Factor de conversión de minutos a horas.

R: Constante de los gases ideales ( $8310 \text{ Pa L K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$ )

T: Temperatura a la que se mide el caudal (273 K)

O<sub>2</sub>: Fracción molar de oxígeno a la salida o en el interior del reactor.

Puyuelo (2012) diseñó un controlador que maximiza la OUR independientemente de la estabilidad del material y que no necesita que sea aplicada una consigna de OUR (Puyuelo y col., 2010). El modelo de controlador actúa en ciclos de una hora. Al finalizar cada ciclo, el sistema calcula el promedio de la OUR obtenida durante los 10 últimos minutos del ciclo. Como ya se explicó, la medida de la actividad biológica se relaciona con el caudal de aireación aplicado al sistema. Por lo tanto, se comparan los valores obtenidos de caudal y OUR con los alcanzados en el ciclo anterior. El sistema de control cambia el caudal proporcionando un valor que optimice la OUR. Este cambio de caudal se efectúa siguiendo el algoritmo de control que se presenta en la Figura 3.9.

- En primer lugar, después de completar el (n) ciclo se revisa si el porcentaje de oxígeno es mayor que el 5%, de lo contrario el caudal se incrementa un 50%.
- Una vez comprobado que el oxígeno está por encima de ese valor límite, el lazo establece una comparación entre OUR y caudal, aplicando dos ciclos consecutivos. De esta forma se pueden dar tres situaciones: que ambos parámetros sean mayores, menores o iguales que los anteriores.
- Se definieron umbrales que determinan si los cambios en OUR y caudal son significativos o no.
- Luego analiza si esa variación de OUR se debe a un incremento, a una disminución o a un mantenimiento constante del flujo. A partir de ahí el controlador selecciona el caudal idóneo que se aplicará en el siguiente ciclo, con el propósito de optimizar la velocidad de consumo de oxígeno.
- Para empezar la estrategia de control es necesario fijar un caudal inicial que será duplicado en el primer ciclo. Al finalizar este ciclo (n), el algoritmo comparará los valores de caudal y OUR obtenidos con los del ciclo anterior (n-1). Con estos datos determinará el valor de caudal del nuevo ciclo (n+1).

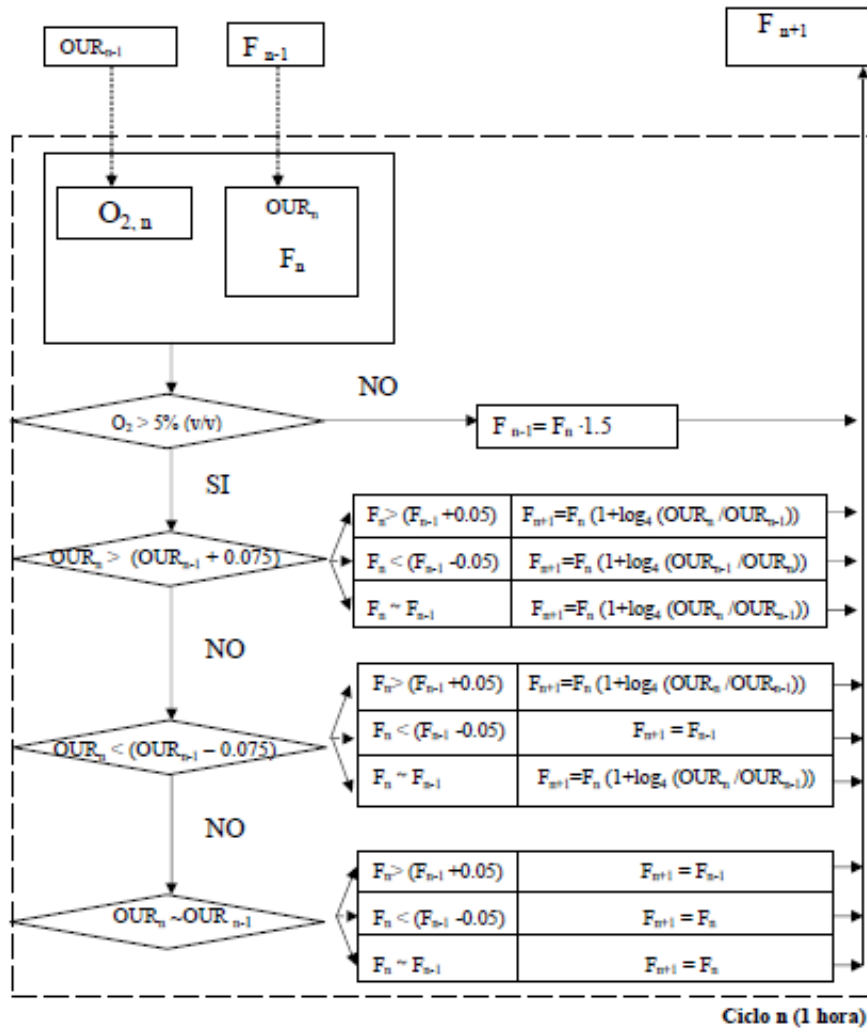


Figura 3.9 Esquema de las leyes de control establecidas para el controlador OUR en reactor de 50 L. F: Flujo de aire (L min<sup>-1</sup>), OUR: Oxigen uptake rate (gO<sub>2</sub>h<sup>-1</sup>) (Puyuelo, 2012)

### 3.5 Métodos analíticos

- **Humedad y Materia seca**

El contenido de humedad y materia seca de las muestras se han determinado según el método estandarizado de secado de la muestra a 105°C durante un período de 24 horas (US Department of Agriculture and US Composting Council, 2001). Todas las determinaciones se han realizado por triplicado.

El procedimiento se detalla a continuación:

- Pesar la muestra húmeda (P0) en un crisol previamente tarado (T) en una balanza de precisión ( $\pm 0.01$  g).

- Secar la muestra en la estufa a 105°C durante al menos 18 horas. Sacar la muestra de la estufa, dejar enfriar en el desecador y pesar (Pf).
- Determinar el porcentaje de humedad (%H) y el porcentaje de materia seca (%MS) según las ecuaciones 3.2 y 3.3 respectivamente:

$$\%H = \frac{(P_0 - P_f)}{(P_0 - T)} * 100 \quad (\text{Ecuación 3.2})$$

$$\%MS = 100 - \%H \quad (\text{Ecuación 3.3})$$

- **Materia Orgánica**

Este parámetro también se determinó según un procedimiento estándar (US Department of Agriculture and US Composting Council, 2001) realizándose por gravimetría indirecta, en la que se midió la pérdida de peso a causa de la combustión de la materia orgánica, a temperaturas entre 470 y 560 °C, siguiendo el procedimiento que se detalla a continuación:

- Pesar en una balanza analítica (con precisión  $\pm 0.0001$  g) los crisoles (T) y después aproximadamente 1.5 g de muestra seca y molida dentro del crisol previamente tarado (P0).
- Introducir la muestra en la mufla hasta que se alcancen los 550°C. Permitir la combustión de la muestra a 550°C durante 2h y entonces lentamente disminuir la temperatura a 200°C.
- Retirar los crisoles con las muestras de cenizas de la mufla, dejarlas enfriar e introducir las en el desecador. Una vez completamente frías, se pesan en una balanza analítica con precisión de  $\pm 0.0001$  g (Pf).
- Determinar la cantidad de materia orgánica (%MO) de la muestra según indica la ecuación 3.4:

$$\%MO = \frac{(P_0 - P_f)}{(P_0 - T)} * 100 \quad (\text{Ecuación 3.4})$$

- **pH**

El valor del pH de la muestra se determinó usando un extracto acuoso de muestra fresca. Para obtener el extracto acuoso, las proporciones en peso muestra/agua destilada más comúnmente utilizadas son 1/5 y 1/25 (US Department of Agriculture and US Composting Council, 2001). Durante este trabajo de tesis se utilizó una relación 1/5.

El procedimiento se detalla a continuación:

- Pesar 10 g de muestra en una balanza digital con precisión de  $\pm 0.01$  g, introducir en un Erlenmeyer de 250 mL junto con 50 mL de agua destilada.
- Agitar durante 30 min con un agitador magnético.
- Centrifugar a 3000 rpm por 15 min y filtrar.
- Medir el pH en el filtrado con el pH-metro (Crison micro pH 2000).

### 3.6 **Parametros respirométricos: IRD y $AT_4$**

El **Índice respirométrico dinámico (IRD)** es una medida directa del consumo de oxígeno de las comunidades microbiológicas, mide la diferencia de concentración de oxígeno ( $\text{mL L}^{-1}$ ) de un caudal de aire a la entrada y a la salida de un reactor, basado en la metodología propuesta por Adani y col. (2006). La medida se obtiene utilizando un respirómetro desarrollado por Ponsá y col. (2010) y Pognani y col. (2011). El IRD se calcula a partir de la ecuación 3.5:

$$IRD = \frac{Q \times \Delta O_2 \times 32 \times 60 \times 1000^a}{1000^b \times 22.4 \times MO} \quad (\text{Ecuación 3.5})$$

Donde:

IRD: Índice respirométrico dinámico expresado en  $\text{g O}_2 \text{ kg}^{-1} \text{ MS}$  (ó  $\text{MO}$ )  $\text{h}^{-1}$

Q: Caudal de aire ( $\text{L h}^{-1}$ ) medido en condiciones normales (1 atm, 273 K)

$\Delta O_2$ : Diferencia de concentración de oxígeno entre la entrada y la salida del reactor ( $\text{mL L}^{-1}$ )

32: Peso molecular del oxígeno (g mol<sup>-1</sup>)

60: Factor de conversión de tiempo

1000<sup>a</sup>: Factor de conversión de masa

1000<sup>b</sup>: Factor de conversión de volumen

El resultado se expresa como media de triplicados en g O<sub>2</sub> kg<sup>-1</sup> MS(ó MO) h<sup>-1</sup>. En base al intervalo de tiempo considerado se obtienen diferentes formas de expresar el índice:

- IRD<sub>máx</sub>: Índice respirométrico máximo obtenido.
- IRD<sub>1h</sub>: Media de los diferentes índices respirométricos dinámicos obtenidos durante 1 hora de máxima actividad.
- IRD<sub>24h</sub>: Media de los diferentes índices respirométricos dinámicos obtenidos durante las 24 horas de máxima actividad (valor utilizado más habitual, se le denomina simplemente IRD)

**Consumo acumulado de oxígeno (AT<sub>n</sub>)** a un tiempo fijo (O<sub>2</sub> consumido por unidad de masa). Este índice se utiliza para calcular el consumo de oxígeno de una muestra durante un período de tiempo determinado, normalmente 4 días. El índice determina la estabilidad biológica de compost u otros materiales orgánicos. El consumo acumulado de oxígeno en n días (AT<sub>n</sub>) se calcula según la ecuación 3.6:

$$AT_n = \int_{t_1}^{t_1+n} IRD_t dt \quad (\text{Ecuación 3.6})$$

Donde:

T<sub>1</sub>: es el tiempo cuando finaliza la fase de latencia. La fase de latencia termina cuando la tasa de consumo de oxígeno llega al 25% de la tasa máxima de consumo calculado como el promedio de tres horas.

AT<sub>4</sub>: consumo de oxígeno acumulado en cuatro días (después de la fase de latencia).

El AT<sub>4</sub> y el IRD<sub>24h</sub> son parámetros complementarios, mientras el primero ofrece información acerca del contenido total de materia orgánica biodegradable, el segundo

proporciona información de lo rápida o lentamente que ésta se degrada (Barrena y col., 2014).

### **3.7 Técnicas de seguimiento e identificación de toxina de Bt**

#### **3.7.1 Identificación morfológica del cristal (endotoxina) mediante microscopio electrónico de barrido**

Se ha utilizado la técnica de SEM (*Scanning electron microscopy*) para identificar morfológicamente la toxina cristal de Bt. En concreto, se utilizó el microscopio electrónico de rastreo Zeiss Merlin, del servicio de Microscopia de la UAB.

Para la observación de Bt con el microscopio electrónico, se procedió a realizar diferentes extracciones de las muestras sólidas de los reactores en estudio con agua ultra-pura miliQ, mediante diluciones. Se trabajó con muestras esporuladas y sin esporular, disruptadas y sin disruptar a fin de encontrar la mejor manera de observar los cristales tóxicos de Bt.

#### **3.7.2 Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida (SDS PAGE)**

La electroforesis se ha utilizado para analizar los perfiles proteicos de las muestras conteniendo la endotoxina producida por Bt. Es una técnica ampliamente utilizada para separar las proteínas de acuerdo con el peso molecular de la cadena de polipéptidos. El gel de poliacrilamida sirve como un tamiz durante la separación. Las proteínas se mueven a través de un gel debido a un campo eléctrico que las atrae, la estructura de poro del gel permite que las proteínas pequeñas viajen más rápidamente que las proteínas más grandes. Gracias al detergente dodecilsulfato sódico (SDS) y a un agente reductor (2- mercaptoetanol) las proteínas se desnaturalizan, perdiendo su conformación tridimensional. De este modo se obtiene un fraccionamiento que obedece a la diferencia de peso; la longitud de la cadena (tamaño); y la forma de la proteína.

#### ***Preparación de la muestra: LaemmLi (1970) con algunas modificaciones***

- Preparar un micro tubo tipo Eppendorf para cada una de las muestras a analizar.
- Introducir, en cada tubo, 10 µL de muestra, 4µL de tampón carga y 6µL de agua destilada.

- Calentar a 95°C por 5 min para solubilizar los cristales y desnaturalizar la proteína.
- Centrifugar los tubos a 10000 rpm durante 1 min para eliminar los fragmentos en suspensión y los agregados. El sobrenadante será la muestra a analizar por electroforesis.

### **Separación de las proteínas (BioRad®)**

- Preparar la poliacrilamida 12% (w/v) geles de separación (BioRad®) en el interior de la cámara vertical de electroforesis y entre los dos electrodos de platino.
- Agregar tampón de Tris / glicina / SDS 1X.
- Añadir 15 µL de la muestra a 5 µL de tampón de muestra 4X (Tris-HCl 125 mM pH 6,8, SDS 4% w/v, azul de bromofenol al 10% w/v y 2-β-mercaptoetanol 10% v/v)
- Conectar la fuente de alimentación (se puso a 150 V). Detener la electroforesis cuando el colorante de la muestra llega a la parte inferior del gel.
- Retirar las cubiertas de plástico del gel, lavar tres veces con agua miliQ.

### **3.7.3 Determinación de la actividad de proteasa**

La actividad de proteasa se determinó mediante el método descrito por Alef y Nannipieri (1995) modificado. Los fundamentos se basan en la determinación de derivados de tirosina solubles en ácido tricloroacético (TCA) mediante el reactivo de Folin. El aminoácido tirosina, presente en la mayoría de las proteínas, se libera junto con otros aminoácidos y fragmentos de péptidos de caseína, durante la incubación debido a la actividad de las proteasas presentes. El reactivo de Folin reacciona principalmente con el doble enlace de las moléculas para producir un cromóforo de color azul, que es cuantificable y medible como un valor de absorbancia en el espectrofotómetro. Los valores de absorbancia generados por la actividad de la proteasa se comparan con una curva patrón, que se genera por reacción de cantidades conocidas de tirosina con el mismo reactivo para correlacionar. Esta técnica se encuentra ampliamente descrita en Abraham (2014).

## **3.8 Técnicas microbiológicas para el seguimiento y evaluación de Bt**

### **3.8.1 Contaje de colonias en placa**

El seguimiento y evaluación de la población de Bt se realizó mediante técnicas tradicionales de microbiología (contaje de colonias en placa) siguiendo la técnica



aplicada por Zhuang y col. (2011) y Zhang y col. (2013) con algunas modificaciones. En ambas investigaciones se utilizaron extracto de carne y peptona para el crecimiento de Bt, en esta investigación se utilizó Nutrient Broth N<sup>o</sup> 2 (caldo nutritivo) 25 g L<sup>-1</sup> para crecimiento en líquido y agar nutriente 28 g L<sup>-1</sup> como medio sólido que se colocó en placas Petri de 90 mm.

En cada toma de muestra de un reactor de FES, sea de 500 mL o de 10 L de capacidad, se removió y mezcló bien el material de su interior y se obtuvieron 10 g de muestra. Las muestras tomadas siempre fueron por triplicado.

Para determinar la concentración de células viables a partir de las muestras mencionadas se realizaron diluciones seriadas con RINGER® al 2.5%. El RINGER® contiene NaCl 0,225%, 0,001% de KCl, CaCl<sub>2</sub> 0,012%, 0,005% de NaHCO<sub>3</sub> y es utilizado normalmente en las técnicas tradicionales de microbiología, previamente esterilizado. Se empleó un vaso estéril de 100 mL de capacidad donde se colocó 10 g de muestra y 90 mL de RINGER® al 2.5%. Se agitó por 10 min y se tomó 1 mL del vaso, para colocarlo en un tubo de 15 mL de capacidad con 9 mL de Ringer previamente preparado para las diluciones. Se prepararon baterías de tubos de 15 mL para las correspondientes diluciones de las muestras obtenidas en cada proceso. De cada una de las diluciones se procedió a sembrar 100 µL en placas de agar, homogenizando con un asa de Drigalsky estéril cada placa, para llevarla a la incubadora por 18 a 20 horas para su posterior lectura. Para obtener el número de UFC g<sup>-1</sup> ó UFC mL<sup>-1</sup> se multiplica las colonias contadas por el factor de dilución y por el volumen de inóculo. En cada placa se debe de contar en un rango de 30 a 300 UFC para obtener un valor válido (Tirado y col. 2001).

Para el conteo de esporas, se vertieron 20 mL de la muestra inicial que contenía cada vaso (muestra más RINGER®, primera dilución), en un tubo de 50 mL y se sometió a 80°C por 10 min a efectos de darle un shock térmico (Khedher y col. 2011) y que las esporas logren salir de su fase de latencia. Seguidamente, se realizó la siembra en placa realizando el mismo proceso de diluciones seriadas.

### **3.8.2 Análisis microbiológico en medios selectivos**

Las pruebas microbiológicas de la carga bacteriana inicial y final de las muestras de los reactores de FES se realizaron en el laboratorio de microbiología de la Facultad de Veterinaria de la UAB empleando 25 g de muestra sólida en cada ocasión. Las muestras se diluyeron en agar triptosa de soja (TSA agar) 250 mL para plaqurear

después en medios selectivos sólidos y líquidos para determinar las UFC g<sup>-1</sup>, así como la presencia y/o ausencia de otros microorganismos.

Los medios selectivos que se emplearon fueron:

- Agar MacConkey, para enterobacterias,
- Agar TSN para *Clostridium*,
- Agar BD Baird – Parker medio selectivo para *Staphylococcus aureus*,
- Agar MRS para determinar presencia de bacterias lácticas,
- Agar sangre para listeria,
- Sulfito reductores SPS, para recuento de *Clostridium*
- Glucosa Sabouraud para hongos.

En la Figura 3.10 se presentan dos placas de agar MacConkey específico para detectar enterobacterias. De izquierda a derecha se observa una placa con las UFC correspondiente a enterobacterias al inicio del proceso de FES y la segunda placa es resultado de la higienización del producto, es decir, muestra procedente de un reactor en el que se alcanzó el rango termófilo de temperatura y se mantuvo durante suficiente tiempo para eliminar las enterobacterias de la muestra.

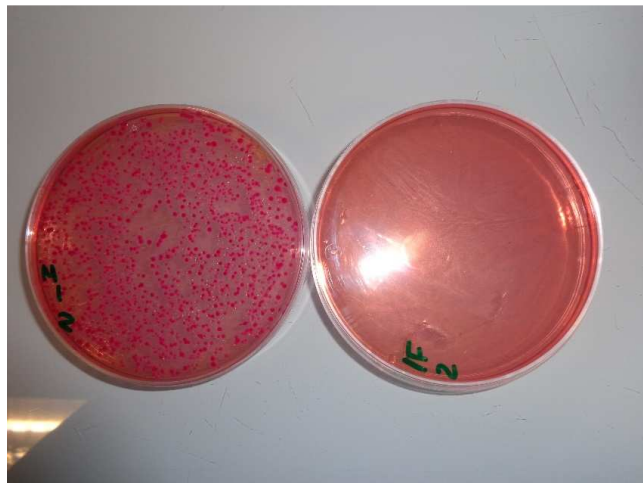


Figura 3.10 Resultado de la higienización de un residuo mediante un proceso de FES (lado izquierdo muestra inicial con enterobacterias, derecho muestra final una vez higienizada).

### 3.8.3 Identificación de Bt a partir de extracto de ADN

En el capítulo 7 donde se estudia el efecto de la adición de Bt a compostador doméstico se realizaron pruebas de identificación de poblaciones microbianas y porcentaje de Bt mediante técnicas específicas, pirosecuenciación e identificación mediante 16S rADN desde colonias en placa Petri

#### ***Extracción de ADN para Pirosecuenciación***

La extracción de ADN de muestras de material de ambos compostadores previa al análisis mediante pirosecuenciación se realizó utilizando el kit QIAGEN fast cycling PCR, que consta de 6 soluciones que se van incorporando de acuerdo al protocolo descrito a continuación:

- Pesar 0.25 g de muestra de compost en cubetas pequeñas.
- Lisar las células con cristales circulares y vortexear 1 min.
- Adicionar 60 µL de solución 1 (kit QIAGEN) y vortexear.
- Centrifugar a 10000 rpm por 30 s.
- Trasvasar 500 µL de sobrenadante a un Eppendorf limpio de 2mL de capacidad.
- Agregar 250 µL de la solución 2 (kit QIAGEN), llevar a incubar 4°C (5min), centrifugar a 10000 rpm por 1min.
- Transvasar 600 µL de sobrenadante a un Eppendorf limpio.
- Agregar la solución 200 µL de 3 (kit QIAGEN), llevar a incubar 4°C (5min), centrifugar a 10000 rpm por 1 min.
- Transferir a otro Eppendorf 750 µL de sobrenadante y añadir 1.2 mL de solución 4 (kit QIAGEN).
- Cargar aproximadamente 675 µL en Eppendorf con el filtro, centrifugar a 10000 rpm por un minuto a temperatura ambiente. Repetir 3 veces lo mismo.
- Añadir 500 µL de solución 5 (kit QIAGEN), centrifugar a 10000 rpm por 1min.
- Sacar el filtro con cuidado y descartar el líquido.
- Agregar 100 µL de la solución 6 (kit QIAGEN).
- Centrifugar por 30 segundos a 10000 rpm y eliminar el filtro.
- Evaluar la ratio de pureza del líquido en el Nanodrop.

Los extractos de ADN obtenidos se enviaron a la empresa Lifesequencing (Valencia, España) para su pirosecuenciación. Esta empresa utiliza una tecnología de

secuenciación masiva y ofrece un servicio posterior de asesoramiento para utilizar plataformas de alto rendimiento.

### **Identificación de Bt mediante 16S rDNA (desde colonias en placa Petri)**

Para la identificación de Bt a partir de colonias crecidas en placa Petri, se enviaron las muestras (placas) a la Universidad de León, Área de Análisis de Ácidos Nucleicos del Laboratorio de Técnicas Instrumentales, donde se aisló ADN de cada colonia y seguidamente se procedió a amplificar la región de interés (fragmento de unos 1100 pb del gen rDNA 16S). Posteriormente, se purificó el amplicón y finalmente se procedió a su secuenciación (en ambos sentidos).

Para la identificación de las bacterias se introdujeron las secuencias en bases de datos como la del GenBank NCBI (National Center for Biotechnology Information, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) con el programa BLAS.

(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>). El Gen Bank es una base de datos de secuencia genética, es parte de la colaboración de base de datos de secuencias de nucleótidos internacional que comprende el banco de datos de ADN de Japón, el Europeo de Biología Molecular y GenBank NCBI.

### **3.9 Análisis de toxicidad del material final para su utilización como enmienda orgánica en suelo: Test de Germinación**

El objetivo de este test es determinar si un material orgánico estabilizado es apto o no para ser usado como enmienda para el suelo considerando su toxicidad para plantas. Se basa en usar un extracto acuoso de los materiales orgánicos para evaluar la germinación y crecimiento de semillas de plantas de respuesta rápida como es el rábano (*Raphanus sativus*). Comparando los valores que se obtengan con los obtenidos para un control con agua destilada, se puede saber el porcentaje de germinación de las semillas y el porcentaje de elongación de las raíces, obteniendo por multiplicación el conocido como Índice de Germinación (IG). La metodología seguida fue la descrita por Ponsá y col. (2009) basada en la Tiquia y col. (1996) y en el TMECC (US Department of Agriculture and US Composting Council, 2001).

Se empleó una proporción de 10:1 es decir, 80 mL de agua y 8 g de muestra, los cuales se agitaron por 10 min y se sembraron 10 semillas de rábano por placa,

dejándolos crecer 7 días a temperatura ambiente. El análisis se realizó por triplicado. Para los correspondientes cálculos se emplearon las siguientes ecuaciones:

$$\% G = \frac{A}{B} \times 100 \quad (\text{Ecuación 3.7})$$

Donde:

G: Velocidad relativa de germinación.

A: Tiempo promedio de germinación de las semillas en el extracto del producto de la FES.

B: Tiempo promedio de germinación de las semillas tratadas en agua destilada.

$$\% E = \frac{C}{D} \times 100 \quad (\text{Ecuación 3.8})$$

Donde:

E: Longitud relativa de la raíz.

C: Longitud promedio de raíz en ensayos realizados con extracto del producto de la FES.

D: Longitud promedio de raíz en ensayos realizados con agua destilada.

$$\% IG = \frac{\%G \times \%E}{100} \quad (\text{Ecuación 3.9})$$

Donde:

IG: Índice de germinación

En la Figura 3.11 (a) se muestran semillas de rábano al inicio de germinación, mientras que la imagen (b) muestra las semillas germinadas que corresponden al control, con agua destilada. En la Figura 3.11 (c) se pueden observar las semillas

germinadas después de 7 días de proceso tanto para las muestras de producto final como para las muestras control. En la Figura 3.11 (d) se muestra la evaluación de la longitud de la raíz de cada semilla germinada.

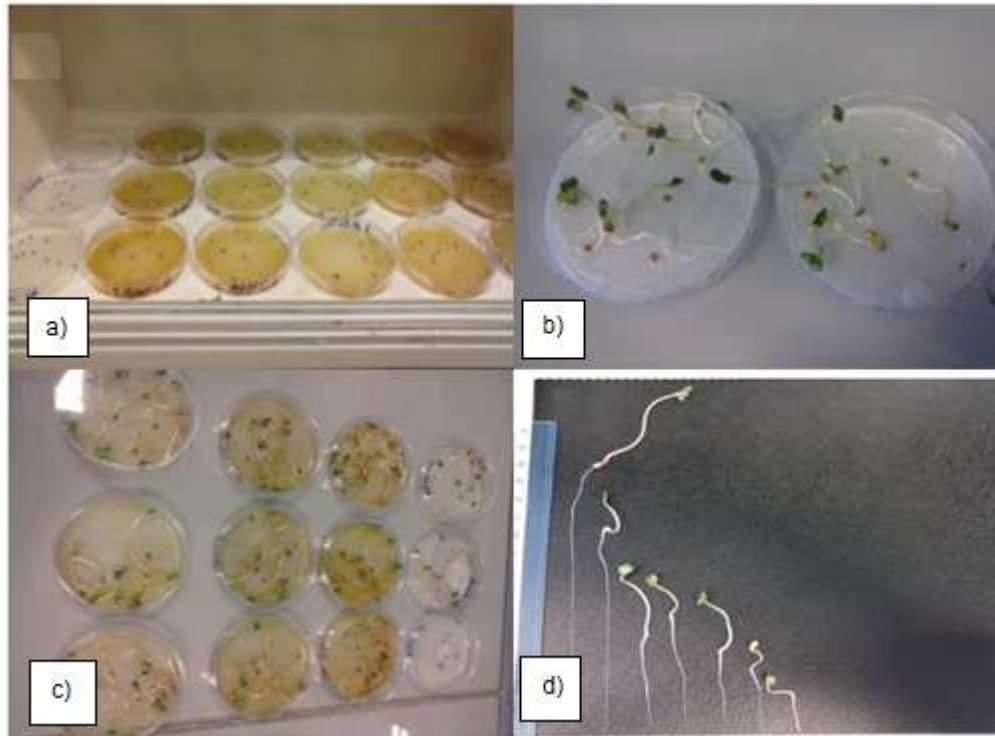


Figura 3.11 Test de germinación de semillas de rábano desde el inicio de germinación (a), germinación en agua como control de crecimiento (b) germinación en sustrato (c) y la medida de la longitud de raíz (d)



## CAPÍTULO 4

---

*Los resultados que se presentan en este capítulo están publicados en:*

*Cindy Ballardo, Juliana Abraham, Raquel Barrena, Adriana Artola, Teresa Gea, Antoni Sánchez., 2016. Valorization of soy waste through SSF for the production of compost enriched with *Bacillus thuringiensis* with biopesticide properties. Journal of Environmental Management 169, 126 -131. (Anexo)*





## **4 VALORIZACIÓN DEL RESIDUO DE SOJA A TRAVÉS DE FES PARA LA PRODUCCIÓN DE COMPOST ENRIQUECIDO CON *Bacillus thuringiensis***

### **4.1 Introducción**

Este capítulo toma como punto de partida la tesis doctoral de Juliana Abraham (2014) quien trabajó con residuos de soja y otros residuos de la industria alimentaria para obtener proteasas mediante un proceso de Fermentación en Estado Sólido (FES). En el último capítulo de dicha tesis se presentan los resultados de experimentos preliminares de FES a escala laboratorio, donde se inoculó Bt en residuo de la producción de derivados de soja para ver si este microorganismo incidía favorablemente en el aumento de las proteasas que se producían.

Con este punto de partida se estudian en este capítulo, no solo los valores de proteasa a una escala mayor, sino que también el comportamiento de Bt a la hora de crecer en un residuo estéril y no estéril, buscando la mejor manera de realizar el seguimiento del crecimiento de este *Bacillus*. En concreto, se pretende comprobar el crecimiento de Bt en residuo de soja sin esterilización en el proceso de FES, evaluando su comportamiento a medida que la temperatura se va incrementando como sucedería en un proceso de FES a escala real con cantidades importantes de residuos. Se contempla también la posibilidad de utilizar el residuo final como enmienda orgánica después de su estabilización.

El residuo de soja se produce comúnmente en muchos países de diferentes localizaciones y situaciones geográficas. El de soja es el aceite de semilla primaria más cultivado en los Estados Unidos (USDA-NASS, 2010) y también domina el mercado de aceite en la India, uno de los principales productores de semillas oleaginosas del mundo. Por cada kilogramo de semilla de soja que se procesa para obtener leche de soja o tofu, se genera cerca de 1.1 kg de residuo fresco (Khare y col., 1995). Debido a la alta generación de este residuo, diferentes investigadores han explorado las posibilidades de valorizarlo como materia prima en la producción, por ejemplo, de ácidos orgánicos, acetona, butanol, etanol o enzimas a partir de azúcares fermentables (Karki y col., 2011).

Este es el primer estudio realizado en condiciones no estériles y volumen de litros, como una prueba de viabilidad y valorización para una futura aplicación a escala industrial.

## **4.2 Materiales y Métodos**

### **Características del residuo de soja**

El residuo de soja fue elegido como materia prima para el crecimiento de Bt, por los elevados niveles de proteínas, grasa, almidón y azúcares que aún se encuentran presentes en él, ofreciendo un potencial notable para el crecimiento de Bt en fermentación. Además, es un material muy homogéneo y presenta pocas o nulas impurezas (por ejemplo, la ausencia de metales).

Este residuo se obtuvo de una industria local que lo genera de manera sostenida durante todo el año como resultado de la producción de leche de soja y derivados (Natursoy®, Castellterçol, Barcelona, España). Se ha determinado que tiene un contenido de un 83.8% de humedad, un 95.9% de materia orgánica en base a materia seca, y presenta una relación C/N de 12.2, un pH de 7.35 y una conductividad eléctrica de 7.37mS cm<sup>-1</sup>. El residuo de soja se mezcló con pallet triturado en los procesos de FES en proporción volumétrica 1:1 para proporcionar la estructura necesaria para una correcta aireación del material y compensar la elevada humedad del residuo.

### **Microorganismos**

La cepa empleada en esta investigación fue adquirida de “American Type Culture Collection” HD -73 ATCC 35866 y fue reconstituida y guardada a -80°C para su posterior utilización. Esta cepa también fue utilizada por Abraham (2014) en su tesis.

### **Inóculo obtenido para iniciar experimentos**

Se determinó la cinética de crecimiento de Bt medio comercial OXOID® para poder estimar el tiempo de crecimiento exponencial. Este dato será necesario para futuros experimentos en FES. La obtención del inóculo se describe en Materiales y métodos (Capítulo 3).

### **Reactores utilizados**

Las fermentaciones se realizaron en reactores de 500 mL y 10 L de capacidad con residuo de soja estéril y no estéril. En condiciones estériles solo se trabajó en reactores de 500 mL. El residuo de soja y los reactores de 500mL se esterilizaron en autoclave a 121°C por 30 min. El proceso de inoculación con Bt en el residuo de soja esterilizado y los muestreos se realizaron en cabina de flujo laminar en condiciones estériles. En condiciones no estériles también se trabajó en reactores de 500 mL siendo parte importante de esta investigación realizar el escalado a reactores de 10 L con residuo de soja sin esterilizar. También se realizaron pruebas para ver si efectivamente se podía seguir el crecimiento de Bt con el conteo de células y esporas, tomando en cuenta que, al ser el residuo no estéril, la carga bacteriana propia del residuo de soja podía dificultar la observación y el conteo de UFC.

### **Inoculación de los reactores de 10 L de capacidad**

La inoculación del material no se realizó a partir de Bt crecido en medio comercial líquido como se ha especificado en el Capítulo 3 como procedimiento general, sino que se realizó a partir del material final sólido obtenido en reactores de 500 mL en los que Bt creció en el residuo de soja en condiciones controladas temperatura (30°C) y aireación constante (15 mL/min) durante 7 días (a partir de inóculo líquido obtenido en medio comercial siguiendo el procedimiento general). A esta etapa se la ha denominado proceso de adaptación de Bt al residuo pues sirvió para que Bt colonizara la matriz sólida de cada Erlenmeyer que contenía 100 g de residuo de soja.

Se incorporaron 100 g de residuo de soja más Bt a cada reactor de 10 L conteniendo  $1.3E+08$  UFC g MS<sup>-1</sup>.

## **4.3 Resultados y Discusión**

### **4.3.1 Cinética de crecimiento de Bt en medio comercial**

Como etapa previa a la realización de la FES del residuo de soja con Bt, se determinó la cinética de crecimiento de Bt en medio comercial OXOID® y fermentación sumergida con la finalidad de trabajar bajo condiciones equivalentes en futuras réplicas, es decir, con la misma cantidad de biomasa en una fase de crecimiento similar.

En la Figura 4.1 se presenta la cinética de crecimiento de Bt en medio comercial iniciando con el 10% (v/v) de inóculo de Bt. La pendiente obtenida fue de 0.3159 con coeficiente de regresión ( $R^2$ ) de 0.9491. De los resultados se concluye que entre las 20-24 h Bt se encuentra en fase exponencial de crecimiento, momento apto para pasar como inóculo a FES.

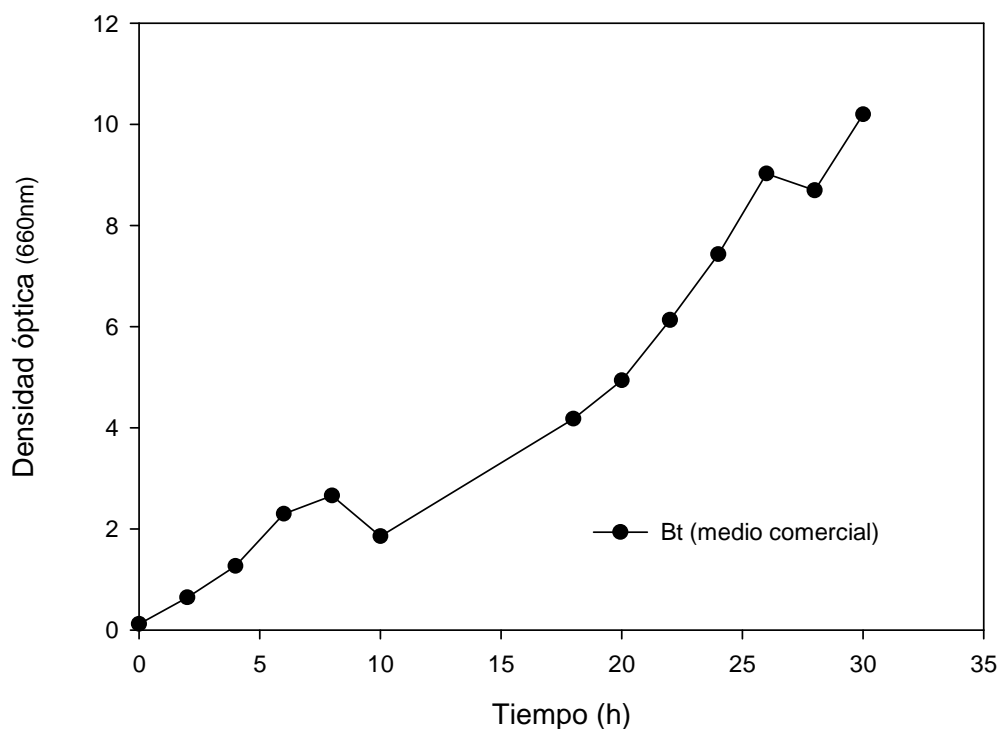


Figura 4.1 Cinética de crecimiento de Bt en medio comercial OXOID utilizando 10% (v/v) de inóculo inicial mediante densidad óptica en función del tiempo en Fermentación sumergida.

En la Figura 4.1 también se observa que aproximadamente a las 10 horas la población de Bt disminuye con respecto a las 8 h. Esta disminución probablemente se deba a problemas con la medida por la espuma que se forma en la fermentación. Pasadas las 8 h la espuma desaparece y el crecimiento se torna exponencial como se observa en la figura.

#### 4.3.2 Fermentación en estado sólido en reactores de 500 mL de capacidad en condiciones estériles

Para comprobar la viabilidad del crecimiento de Bt en el residuo de soja, en primer lugar, se realizaron una serie de FES en condiciones controladas de temperatura

(30°C) y aireación constante (15 mL/min de aire), y utilizando 100 g de residuo esterilizado con un 5% (v/p) de inóculo.

Como parámetro de seguimiento del proceso se utilizó la velocidad específica de consumo de oxígeno (sOUR) ya que representa una medida fiable de la actividad biológica del medio (Barrena y col., 2006). En la Figura 4.2 se presenta la evolución de la sOUR respecto al tiempo de la fermentación por triplicado en condiciones estériles.

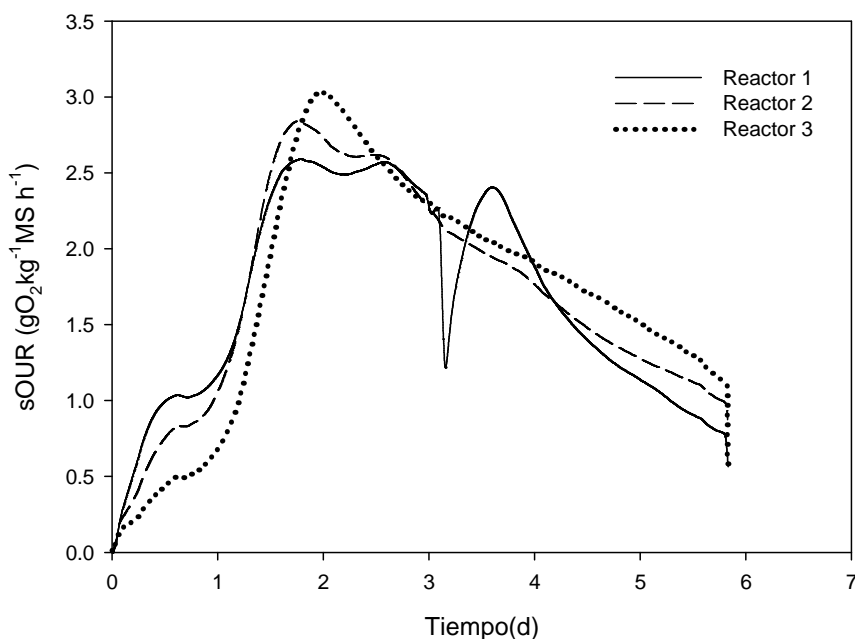


Figura 4.2 Perfil de consumo de oxígeno sOUR en reactores de 500 mL con residuo de soja esterilizado y Bt

Los perfiles del sOUR muestran un valor máximo de  $2.8 \text{ gO}_2 \text{ kg}^{-1} \text{ MSh}^{-1}$  que se alcanza en el segundo día del proceso después de una fase de latencia de 16 h. El consumo de oxígeno acumulado durante cuatro días ( $AT_4$ ) fue de  $236 \pm 2 \text{ g de O}_2 \text{ kg}^{-1} \text{ MS}$ .

En la Tabla 4.1 se muestran los valores de los distintos parámetros, respirométricos y microbiológicos, obtenidos durante el seguimiento del proceso. Las UFC  $\text{g}^{-1} \text{ MS}$  se incrementaron en dos unidades exponenciales desde el inicio del experimento ( $1.5\text{E}+09 \text{ UFC g}^{-1} \text{ MS}$ ) hasta el crecimiento máximo ( $6.2\text{E}+11 \text{ UFC g}^{-1} \text{ MS}$ ) corroborándose con el incremento del consumo de oxígeno (sOUR) para luego mantenerse en ese orden de magnitud, siendo la cantidad de esporas en la fase final (6 días) del orden de  $8.6\text{E}+10 \text{ (UFC g}^{-1} \text{ MS)}$ . Los valores obtenidos se encuentran dentro del rango de estudios previos en FES realizados por Devi y col. (2005) quién

reportó la producción de Bt a escala laboratorio y empleando salvado de trigo en condiciones estériles en  $6.6 \times 10^{10}$  células viables  $\text{g}^{-1}$  MS y  $1 \times 10^{11}$  esporas  $\text{g}^{-1}$  MS cuando se enriquecía el medio con una fuente de carbono y nitrógeno.

#### **4.3.3 Fermentación en estado sólido en reactores de 500 mL de capacidad en condiciones no estériles**

Con el objetivo de comprobar la viabilidad de la valorización del residuo de soja tal y como se obtiene de un proceso industrial, se realizó un segundo experimento en condiciones no estériles. Se decidió incrementar la cantidad de inóculo del 5 a 10% debido a la posibilidad de una gran competencia con microorganismos autóctonos de la soja. Se realizaron dos tandas de experimentos, cada uno de ellos por triplicado, utilizando el residuo de soja procedente de la misma industria alimentaria pero recogido en dos fechas diferentes. Para cada tanda se siguió también un reactor control, conteniendo sólo el residuo de soja no estéril, sin adición de Bt. Los resultados de las fermentaciones se resumen también en la Tabla 4.1 (Prueba 1 y Prueba 2).

En primer lugar, es importante señalar que los valores de sOUR máx y  $AT_4$  obtenidos en FES en presencia de Bt fueron inferiores a los valores obtenidos en los reactores sin adición de Bt (reactor control). Además, el índice  $AT_4$  muestra como el oxígeno consumido en los reactores inoculados es menor en un 13% y 10% que en los reactores de residuo de fibra de soja no inoculados. Este hecho puede ser debido a que el crecimiento de Bt propiciase una reducción de la biodiversidad en la matriz sólida, lo que implicaría menores tasas de consumo de oxígeno en comparación con la población microbiana nativa.

Tabla 4.1 Resultados obtenidos para distintos parámetros de proceso a los 6 días de fermentación en condiciones estériles y no estériles en los experimentos de FES con residuos de fibra de soja y con inóculo de Bt en reactores de 500 mL

	sOUR máx (g O <sub>2</sub> kg <sup>-1</sup> MS h <sup>-1</sup> )	AT <sub>4</sub> (g O <sub>2</sub> kg <sup>-1</sup> MS)	Fase de latencia (h)	Final esporas (UFC g <sup>-1</sup> MS)	Final células viables (UFC g <sup>-1</sup> MS)	Actividad proteasa (Ug <sup>-1</sup> MS)
<b>Condiciones estériles</b>						
Soja + Bt (1.5E+09)* UFC g <sup>-1</sup> MS	2.8 ± 0.2	236 ± 2	16 ± 8	8.60E +10	6.20E+11	1282 ± 32 (3d) 1357 ± 18 (6d)
<b>Condiciones no estériles</b>						
<i>Prueba 1</i>						
Soja control	6.5 ± 0.7	325 ± 1	6.5 ± 1.0	n.a.	n.a.	n.a.
Soja + Bt (4.3E+09)* UFCg <sup>-1</sup> MS	4.8 ± 0.7	292 ± 13	5.2 ± 0.6	1.3E+08 ± 3E+07	3.8E+09 ± 7.7E+07	616 ± 18 (3d) 497 ± 17 (6d)
<i>Prueba 2</i>						
Soja control	7.0 ± 0.9	319 ± 51	4.6 ± 1.5	n.a.	n.a.	n.a.
Soja + Bt (4.3E+09)* UFC g <sup>-1</sup> MS	5.9 ± 1.6	277 ± 20	1.4 ± 0.5	n.a.	n.a.	n.a.

sOUR: velocidad específica de consumo de oxígeno; AT<sub>4</sub>: consumo acumulado de oxígeno en 4 días; n.a. no analizado. Desviación estándar ± 3 repeticiones, (\*) Células viables.



Por otro lado, los valores de  $sOUR_{m\acute{a}x}$  en condiciones no estériles son más altos que los obtenidos con el residuo de soja esterilizado ( $2.8 \text{ g O}_2 \text{ kg}^{-1} \text{ MS h}^{-1}$ ), además de ser la fase de latencia más corta cuando se utiliza residuos no esterilizados. Esta comparación sugiere que la actividad de Bt avanza en paralelo a la actividad de los microorganismos originales presentes en el residuo de soja que contribuyen a la degradación y estabilización de la materia orgánica.

El seguimiento de  $UFC \text{ g}^{-1} \text{ MS}$  en residuo no estéril se realizó también mediante el conteo de células viables. Las células viables y los recuentos de esporas se llevaron a cabo sólo en una de las repeticiones. Los resultados mostraron una ligera disminución en el número de células viables durante el experimento (valor inicial de  $4.3E+09$  a un valor de  $3.8E+09 \text{ UFC g}^{-1} \text{ MS}$  en el día 6), probablemente debido al consumo de nutrientes y a la competencia con otros microorganismos. El recuento final de esporas fue de  $1.3E+08$  esporas  $\text{g}^{-1} \text{ MS}$ . Estos valores confirman que Bt es capaz de sobrevivir en residuo de fibra de soja en condiciones no estériles después de 6 días de un proceso de FES. Cabe resaltar que cuando el extracto se sometía a  $80^\circ\text{C}$  por 10 min para su esporulación, después de incubar durante 18 a 20 horas, las colonias se contaban mejor, ya que al pasar la muestra por un shock térmico ésta se higienizaba, permitiendo contar mejor las UFC en la placa de agar.

Brar y col. (2007) y Yezza y col. (2006) encontraron una correlación entre la toxicidad de Bt (formación de esporas), el recuento de células y la actividad de la proteasa producida en los experimentos de fermentación sumergida con Bt en medio convencional, aguas residuales y lodos de aguas residuales, siempre en condiciones estériles. En base a estos trabajos, se determinó también en esta investigación la actividad de proteasa, con la finalidad de evaluar si la incorporación de Bt en una matriz sólida de residuos de soja, incrementaba esta actividad (Tabla 4.1). Los valores de la actividad de proteasa obtenidos en los días 3 y 6 de proceso con residuo estéril fueron  $1282 \pm 32$  y  $1357 \pm 18 \text{ U g}^{-1} \text{ MS}$  respectivamente. El rendimiento de proteasa fue mucho más alto que el obtenido en SmF a la misma escala en condiciones estériles ( $336 \pm 8 \text{ U g}^{-1} \text{ MS}$ ) y en experimentos anteriores de FES utilizando el mismo residuo en condiciones no estériles sin la adición de Bt ( $310 \pm 9 \text{ U g}^{-1} \text{ MS}$ ) (Abraham y col., 2013).

Por otro lado, en condiciones no estériles los valores de actividad de proteasa obtenida después de 3 y 6 días de fermentación fueron  $616 \pm 18$  y  $497 \pm 17 \text{ U g}^{-1} \text{ MS}$  respectivamente, valores que son claramente inferiores a los obtenidos en residuos de

soja estéril y superiores a los reportados en Abraham y col. (2013) para el residuo de soja no estéril sin adición de Bt. Por lo tanto, se deduce que la presencia de Bt aumenta la producción de proteasas a partir de residuos de soja no estéril, aunque las mejores condiciones para la producción de estas enzimas parecen encontrarse en condiciones estériles.

Se intentó realizar la identificación de proteínas mediante geles de electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes, ya que de esta forma se pretendía estimar el peso molecular de la proteína tóxica de Bt por comparación con marcadores de peso molecular conocidos (Sambrook y col., 1989). Sin embargo, esta determinación no fue posible y únicamente se encontraron bandas de aproximadamente 37 kDa pero muy tenues. Probablemente el hecho de obtener bandas tenues, se deba a que no se pudo concentrar la muestra, siempre en presencia de otras partículas propias del residuo. Smitha y col. (2013) reportan pesos moleculares de 66 kDa, 45 kDa y 30 kDa, en Bt crecido en medio convencional LB. Obtienen los mismos valores al enriquecer el medio convencional con harina de patata (10% w: v) en FES. Caballero y col. (2001) muestran los perfiles proteicos de distintos productos comerciales biopesticidas a base de Bt. En el preparado Dipel® encuentran bandas correspondientes a un peso molecular de 200 y 66 kDa, mientras que Xentari® y el aislado LEAP01 (otro producto comercial) muestra bandas de 200 kDa.

#### **4.3.4 Escalado de la FES de residuo de soja inoculada con Bt a reactores de 10 L en condiciones no estériles**

Como se ha comentado, uno de los propósitos novedosos de este capítulo era simular la producción de Bt a partir de residuos de soja en condiciones de planta industrial, parecidas a las del proceso de compostaje. Con este objetivo, se realizaron diferentes fermentaciones en reactores de 10 L de capacidad, vasos Dewar® adaptados y validados para su uso en compostaje y en FES (ver Capítulo 3). A diferencia de los experimentos del apartado anterior, en los reactores de 10 L no se trabajó a temperatura constante, ya que los reactores están aislados térmicamente y el calor metabólico generado durante la degradación se acumula generando un perfil dinámico de temperatura, y trabajando por lo tanto en condiciones pseudo-adiabáticas. De esta forma se evaluó el efecto de la temperatura sobre el crecimiento de Bt a la vez que se valoraba la viabilidad de higienizar el residuo durante la fermentación.

Se pusieron en marcha y se siguió la evolución de tres reactores: uno sin inóculo de Bt que sirvió como control y dos con inóculo de Bt (duplicado). Se siguió una estrategia de control de aireación basada en la medida de OUR con el objetivo de maximizar la actividad biológica durante el proceso, utilizando un caudal inicial de 400 mL/min (ver Capítulo 3). En la Tabla 4.2 se resumen los valores iniciales y finales de diferentes parámetros del proceso (pH, humedad e IRD), así como el recuento total de células viables y esporas iniciales y finales.

En primer lugar, se observa un aumento de humedad en el material en fermentación debido al uso de reactores completamente cerrados ya que una parte significativa del agua producida durante la FES se retiene en el interior del reactor como condensado en la tapa, afectando el contenido de humedad en la matriz sólida.

En los 3 reactores evaluados la temperatura alcanzó rangos termófilos ( $>45^{\circ}\text{C}$ ) durante el primer día del proceso. La evolución de la temperatura, la sOUR y el número de células viables y esporas (en el caso de los reactores con Bt), respecto al tiempo de proceso se presenta en la Figura 4.3, correspondiendo la gráfica (a) al reactor control (R1) y las gráficas (b) y (c) a los reactores inoculados con Bt (R2 y R3 respectivamente). Las temperaturas máximas alcanzadas fueron: para el reactor control (R1)  $60.1^{\circ}\text{C}$ , alcanzada al tercer día de proceso; para reactores con inóculo, R2 y R3,  $63.3^{\circ}\text{C}$  y  $65^{\circ}\text{C}$  respectivamente, alcanzados al segundo día de proceso. Estas diferencias de temperatura entre reactores inoculados y sin inóculo pueden ser debidas a la presencia del mismo inóculo de Bt que, antes de ser incorporado a reactor, estuvo previamente aclimatado (adaptado) al residuo de soja, también en medio sólido (ver Materiales y métodos de este capítulo) y está activo ya a temperaturas iniciales del proceso degradando el residuo. Además, en esta línea, se puede observar que en los reactores inoculados con Bt, la fase de latencia es casi inexistente en comparación con el reactor control donde es de aproximadamente 12 h. Las temperaturas superiores a  $45^{\circ}\text{C}$  se mantuvieron durante 6.3 días en R1, 3.6 y 4.7 días en R2 y R3, respectivamente. En R2 y R3 se alcanzaron valores más elevados de temperatura y sOUR durante los primeros días de proceso, hecho que podría provocar una fase termófila más corta que en R1. Los perfiles de temperatura muestran un pico después de los muestreos (días 5 y 8), debido a la mejora de la disponibilidad de materia orgánica que se deriva de la homogeneización del contenido del reactor que se realiza durante estos muestreos (Abraham y col. 2013).

Tabla 4.2 Valores iniciales y finales de pH, humedad, IRD, oxígeno total consumido, conteo de esporas y células viables obtenidos en la FES de residuo de soja + Bt en reactores de 10 L.

Parámetros	R1		R2		R3	
	(Control, sin Bt)		(Bt)		(Bt)	
	Inicial	Final	Inicial	Final	Inicial	Final
Humedad (% bh)	48.9	57.3	50.1	56.4	45.7	54.7
pH	6.69	9.10	7.33	9.01	7.25	8.94
IRD (g O <sub>2</sub> kg <sup>-1</sup> MS h <sup>-1</sup> )	2.1 ± 0.5	0.19 ± 0.02	0.27 ± 0.01		0.33 ± 0.03	
O <sub>2</sub> total consumido (g)	418.2		317.4		516.2	
Índice de germinación (%)	134 ± 21		115 ± 20		146 ± 22	
Células viables (UFC g <sup>-1</sup> MS)	0	0	9.3E+07 ± 0.3E+07	1.8E+07 ± 0.7E+07	9.6E+07 ± 1.6E+07	1.7E+07 ± 0.1E+07
Esporas (UFC g <sup>-1</sup> MS)	0	0	1.4E+08 ± 0.1E+08	1.7E+07 ± 0.1E+07	9.6E+07 ± 0.8E+07	1.0E+07 ± 0.1E+07
Enterobacterias (UFC g <sup>-1</sup> )	7E+02	nd	4E+02	nd	2E+02	nd

bh: base húmeda; nd: no detectado

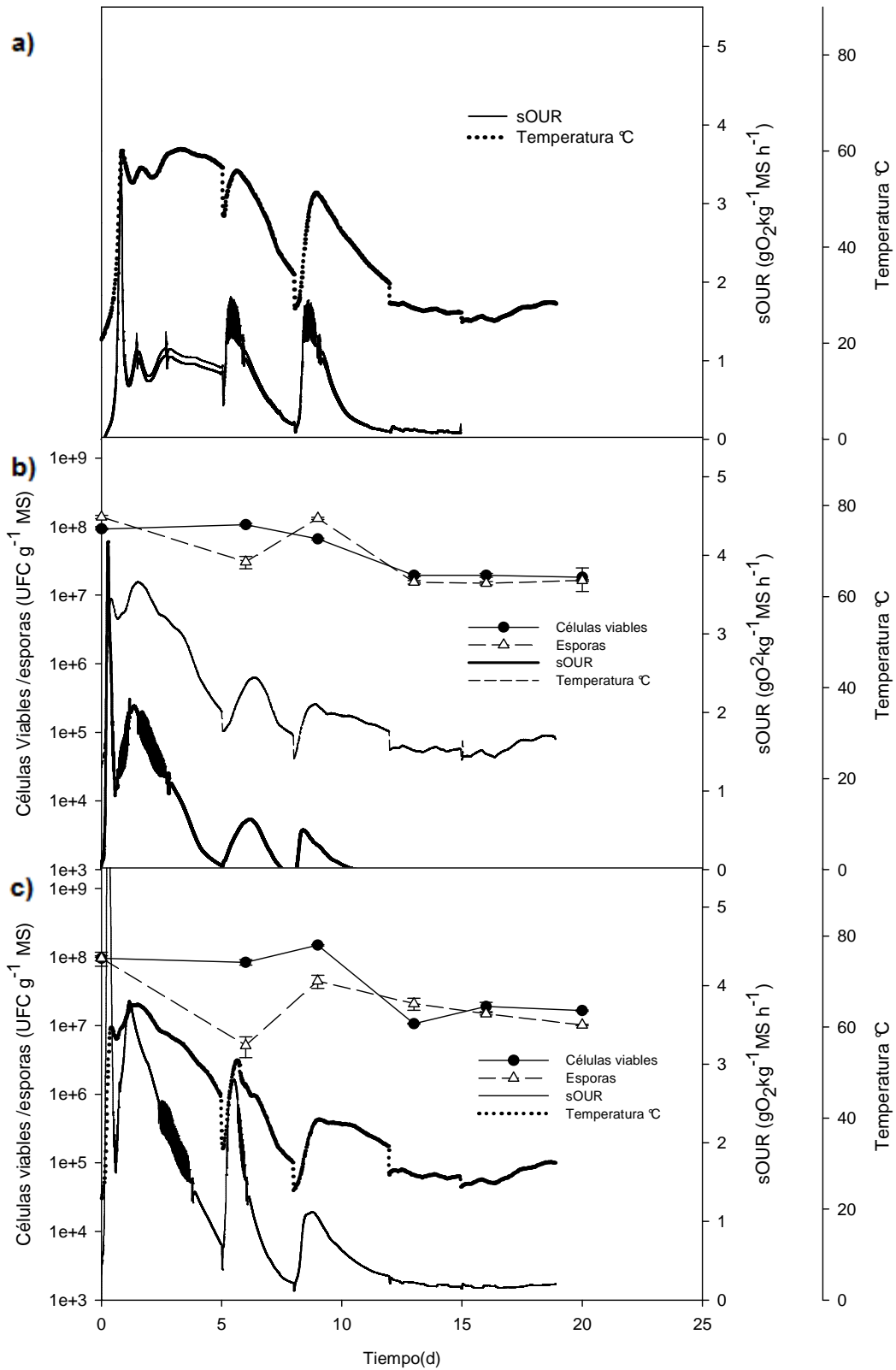


Figura 4.3 Reactores: a) R1 (control, sin Bt); b) R2 (Bt inoculado) y c) R3 (Bt inoculado). Perfil de OUR y Temperatura R1, R2 y R3. Perfil de población de UFC g<sup>-1</sup> R2 y R3

El total de oxígeno consumido (Tabla 4.2) no muestra diferencia entre los reactores inoculados con Bt y el control. Los valores de sOUR en los reactores indican actividad microbiana significativa hasta el día 10 del proceso, aproximadamente, en los tres reactores.

A pesar de alcanzar temperaturas por encima de los 60°C y manteniéndose por encima de 45°C durante 3.5 y 5 días (R2 y R3) respectivamente, las células de Bt viables se mantuvieron casi constantes en R2, creciendo ligeramente en R3. A partir del día 8 de proceso se observa una disminución en los dos reactores tanto de células viables, como de esporas. Efectivamente, a partir del día 10 se observó que en los reactores inoculados el residuo de soja había reducido significativamente su volumen, dejando a la vista gran parte del estructurante utilizado. El agotamiento de la materia orgánica fácilmente biodegradable aportada por el residuo de soja podría ser la causa de la disminución de la población de Bt.

Por otra parte, los valores de actividad de proteasa obtenidos en R2 y R3 fueron 392 y 290 U g<sup>-1</sup> MS, respectivamente, y corresponden al período de la actividad biológica máxima y la temperatura máxima alcanzada en el proceso de FES. Estos valores fueron inferiores a los obtenidos en la escala de 500 mL en las mismas condiciones, pero a 30°C. El aumento de temperatura al escalar el proceso a reactores de 10 L podría afectar la producción de estas enzimas, y sería necesario un estudio más detallado para evaluar la viabilidad de utilizar este proceso con el objetivo exclusivo de producir proteasas.

En cualquier caso, estos resultados indicarían que Bt puede resistir temperaturas termófilas que se lograrían en una planta de tratamiento de residuos a gran escala durante el procesamiento de residuos, siendo capaz de competir con los microorganismos ya presentes en los residuos de soja y sin adición de nutrientes suplementarios o la aplicación de algún tratamiento previo. Este hecho aumenta las posibilidades de utilización a escala industrial de los residuos de fibra de soja para la producción en una enmienda del suelo enriquecida con Bt, no encontrando referencias de trabajos anteriores en reactores a esta escala (ni inferior) utilizando procesos de FES a temperaturas no controladas y tan altas como las encontradas en la presente investigación y en condiciones de no esterilidad del residuo.

Según la revisión bibliográfica realizada, la gran mayoría de trabajos que incorporan Bt en procesos de FES trabajan con residuos esterilizados. Por ejemplo, Zhuang y col.

(2011) en 56 h de FES en condiciones controladas, consigue valores por encima de  $10E+10$  UFC  $g^{-1}$  para las células de Bt viables, trabajando con lodos esterilizados de depuradora en reactores de 8 L que operan a temperatura constante, mejorando el crecimiento de Bt con la adición de salvado de trigo y polvo de paja. Zhang y col. (2013), atribuyeron la dificultad de mantener los valores deseados de concentración de células viables a la temperatura alcanzada en el proceso (no pudiéndola mantener constante al aumentar la cantidad de residuo tratado), observando una disminución en las esporas desde  $10E+10$  trabajando con 4 kg a  $10E+05$  con 50 kg de residuos de cocina esterilizados.

#### 4.3.5 Calidad del producto final de la FES

Para completar la caracterización del material final y determinar las posibilidades de su aplicación como enmienda en suelos agrícolas, se determinó la estabilidad mediante el IRD, el grado de higienización y el índice de germinación. Los valores finales de IRD indican que se obtiene un producto estable tanto en los reactores inoculados con Bt como en el reactor control, (Tabla 4.2) ya que se alcanzan valores de respiración bajos, por debajo de  $1 g O_2 kg^{-1} MO h^{-1}$  (Adani y col., 2004).

Como indicador del grado de higienización se determinó la presencia de enterobacterias: mientras que éstas estaban presentes en el residuo fresco inicial, estaban ausentes en el material final de R1, R2 y R3 (Tabla 4.2). El índice de germinación obtenido para el producto final en los tres reactores fue de  $134 \pm 21$  % (R1);  $115 \pm 20$  % (R2) y  $146 \pm 22$  % (R3), como se detalla en la Tabla 4.3, obteniéndose pues un porcentaje mayor al 100% en todas las muestras. Estos valores indican efectos no fitotóxicos del material analizado (Ponsá y col., 2009). En la Tabla 4.3 se recogen los valores tanto del índice de germinación (IG) como de germinación (G) y elongación (E) usados para su cálculo.

Tabla 4.3 Porcentaje de germinación, porcentaje de elongación de raíz de rábano e índice de germinación del test utilizando semillas de rábano.

	Germinación (%)	Elongación (%)	I.G (%)
<b>Control (R1)</b>	$104 \pm 13$	$130 \pm 22$	$134 \pm 21$
<b>Bt (R2)</b>	$84 \pm 14$	$136.8 \pm 15.8$	$115 \pm 20$
<b>Bt (R3)</b>	$100 \pm 14$	$145.5 \pm 18.2$	$146 \pm 22$

Por lo tanto, el producto final obtenido en los tres reactores se puede considerar como un material maduro y estable, libre de patógenos, adecuado para la aplicación en el suelo.

Finalmente, para comprobar la presencia de la toxina producida por Bt en el material de FES y comprobar el potencial biopesticida del producto obtenido se utilizó el microscopio electrónico de barrido (SEM). La Figura 4.4 muestra las imágenes de los cristales paraesporales y las esporas de Bt. La Figura 4.4 (a) muestra el cristal con forma romboidal característico de la toxina de Bt (Swiecicka y col., 2008) en una muestra de los reactores de 500 mL; la figura (b), muestra los cristales incrustados en el residuo de soja en una muestra obtenida a las de 60 h de proceso en los reactores R2 y R3 y la Figura 4.4 (c) y (d) muestran esporas de Bt también en estas muestras. Todas estas imágenes confirman la presencia de Bt en la matriz sólida.

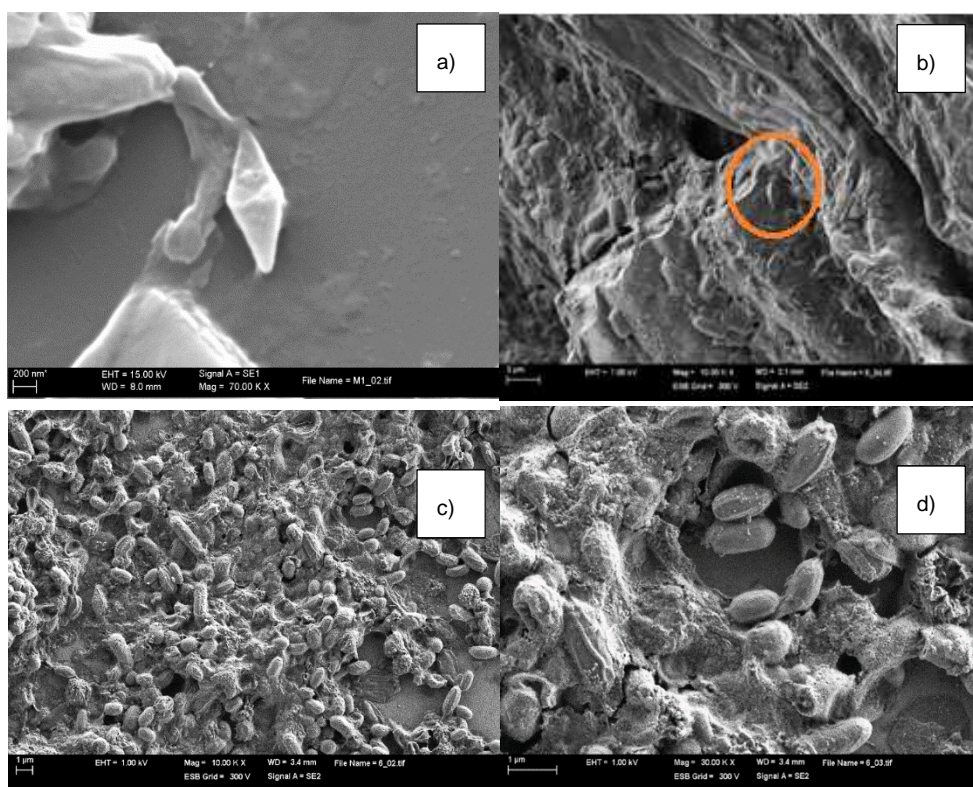


Figura 4.4 Imágenes de SEM de los cristales paraesporales y las esporas de Bt: a) muestra obtenida a escala de laboratorio en Erlenmeyer (10kX); b, c y d) muestras tomadas después de 60 h de proceso en reactores de 10 L (70 KX)





## CAPÍTULO 5

---

*Los resultados que se presentan en este capítulo están en fase de preparación para envío a revista científica en los próximos tres meses, junto con los del Capítulo 6. El título tentativo para éste artículo es: Operational strategies for Bacillus thuringiensis growth in SSF using OFMSW as substrate under non sterile conditions.*



## 5 VIABILIDAD DE UTILIZAR LA FRACCIÓN ORGÁNICA DE RESIDUOS MUNICIPALES COMO MEDIO DE CRECIMIENTO DE *Bacillus thuringiensis*

### 5.1 Introducción

Además de las vías de valorización de la Fracción Orgánica de Residuos Municipales (FORM) de uso más generalizado como el compostaje y digestión anaerobia, en este trabajo se propone investigar mecanismos que aumenten la rentabilidad de esta valorización y la utilización de la FORM como sustrato en procesos de fermentación, buscando productos de valor añadido. Por lo tanto, en esta línea, el desarrollo de este capítulo aporta una alternativa al uso de la FORM en fermentación sumergida incorporando a *Bacillus thuringiensis* por sus propiedades biopesticidas en una primera etapa de estudio antes de pasar a la evaluación en fermentación en estado sólido.

Como ya se ha comentado en la introducción de esta tesis, existen trabajos donde se ha estudiado la viabilidad de utilizar distintos residuos como sustrato que sustente el crecimiento de Bt. Aunque no es el residuo más común, ya que existen más trabajos utilizando lodos de depuración y otros residuos agroindustriales, se han realizado algunos trabajos utilizando como sustrato de crecimiento FORM o similares como residuos de comida (Zou y col., 2016) o de cocina (Zhang y col., 2013), aunque siempre en condiciones estériles.

Los resultados que se presentan en este capítulo por una parte detallan la viabilidad del crecimiento de Bt en la FORM procedente de recogida selectiva, y por otro lado describen el seguimiento del crecimiento de Bt, empleando un medio de cultivo comercial, con la finalidad de comparar el crecimiento de Bt en cultivo puro y en FORM mediante sus características típicas (forma, color, estructura). Se presentan pues las cinéticas de crecimiento de Bt en FORM estéril (autoclavada) y FORM no estéril, así como también en medio de cultivo comercial (OXOID®). Estas cinéticas se determinaron en fermentaciones sumergidas (líquidas) a escala de laboratorio, para estimar la velocidad de crecimiento de Bt y la concentración de unidades formadoras de colonias que se puede alcanzar a partir de los distintos sustratos.

En concreto, se ha considerado importante, como un primer paso en el trabajo con este nuevo sustrato, conocer el comportamiento de Bt en una fermentación sumergida, planteándose los siguientes objetivos específicos:

- Evaluar el crecimiento de Bt en FORM estéril en medio líquido.
- Comparar la velocidad de crecimiento de Bt en FORM estéril con el medio estándar comercial.
- Identificar y diferenciar las UFC de Bt con otros microorganismos, en placa procedentes de extractos de FORM no estéril.
- Evaluar el crecimiento de Bt en FORM no estéril en medio líquido, comparándola con el medio estándar comercial y la FORM estéril.
- Determinar si la carga bacteriana propia de la FORM no estéril afecta la sobrevivencia de Bt.

Estos objetivos marcan el desarrollo de este capítulo. De todo ello dependerá, además, la posibilidad de emplear la FORM como sustrato en un medio sólido, sin desmerecer la oportunidad de emplearla como medio de cultivo alternativo al medio comercial en fermentación sumergida, abaratando costos de producción a la hora de preparar el inóculo para el escalado a volúmenes superiores, o bien para producir el microorganismo.

## **5.2 Materiales y Métodos**

### **Substrato**

La FORM utilizada en el desarrollo de esta investigación se obtuvo de la planta de Compostaje de Manresa (Barcelona) que trata FORM de recogida selectiva. La FORM se obtiene en planta ya mezclada con agente estructurante (restos de poda y palets) en relación volumétrica 1:1. La caracterización de la FORM ya estructurada se presenta en la Tabla 5.1. Esta FORM fue separada en lotes de 5 kg y almacenada en congelador a -20°C para futuros experimentos.

### **Microorganismos**

En este capítulo se emplearon dos cepas obtenidas de la Colección Española de cultivos tipo, cepa de *Bt kurstaki* (CECT 4497) y cepa de *Bt israelensis* (CECT 5904) ambas cultivadas en las mismas condiciones detalladas en materiales y métodos del Capítulo 3 de esta tesis.

### **Condiciones para el desarrollo de las cinéticas de crecimiento**

La evaluación del crecimiento de Bt en la matriz de FORM se realizó en condiciones estériles y no estériles. Para trabajar en condiciones estériles la FORM se autoclavó a 121°C por 30 minutos y posteriormente se inoculó Bt en una cabina de flujo laminar en condiciones estériles.

Para el estudio de las cinéticas de crecimiento en condiciones estériles y no estériles en fermentación sumergida se utilizó un 10% (v/v) de Bt como inóculo inicial crecido en medio comercial estandarizado. La proporción de FORM utilizada se calculó en base a materia seca de la FORM (40%) y la materia seca del medio comercial. Los reactores utilizados se acondicionaron para trabajar en estéril y posteriormente en no estéril. Se emplearon 3 reactores de 1800 mL de capacidad, donde se llevó a cabo el crecimiento de Bt en FORM. Se añadieron 112.5 g de FORM a cada reactor. Asimismo, fue necesario triturar la FORM adicionándole agua destilada para crear una pasta que pudiera ser agitada sin problemas. Bt requiere de oxígeno para su crecimiento y multiplicación. Para asegurar un suministro adecuado de aire, se adaptó un sistema de mangueras de entrada de aire controlado por un rotámetro Tecfluid (modelo 2150) a un caudal de 2 NL/h. El seguimiento del crecimiento de Bt se realizó mediante contaje de UFC en placa.

### **5.3 Resultados y Discusión**

Tradicionalmente valorizada mediante compostaje y también digestión anaerobia, la composición de la FORM la hace, de antemano, un sustrato adecuado para el crecimiento de Bt. En la Tabla 5.1 se describen las características de la FORM ya estructurada utilizada en este estudio, los valores que se presentan son resultado del promedio de tres muestreos realizados en tiempos diferentes a lo largo del desarrollo de los experimentos.

Si se observa la Tabla 5.1, el contenido en materia orgánica y el contenido en nitrógeno de la FORM de recogida selectiva presentan valores típicos (Puyuelo y col, 2011) considerando que estas dos características son de especial interés en la valorización de la FORM y que determinan el valor que tendrá el producto final como enmienda para el suelo, si se valoriza como compost o bien su potencial para ser aprovechada como sustrato para el crecimiento de microorganismos específicos que permitan obtener productos concretos con valor añadido.

Tabla 5.1 Características de la FORM utilizada en este estudio (media y desviación estándar de al menos tres valores obtenidos a lo largo de la investigación).

Parámetros	FORM
Humedad (% b.h.)	59.3 ± 2.1
M.O (% b.s.)	67.4 ± 1.9
pH.	5.6 ± 0.1
Carbono (% b.s.)	42.3 ± 1.0
Hidrógeno (% b.s.)	5.7 ± 1.4
Nitrógeno	2.5 ± 2.2
Azufre	< 0.1
Conductividad mS cm <sup>-1</sup>	5.4 (26.4°C)

% b.s.: Porcentaje sobre base seca; % b.h.: Porcentaje sobre base húmeda

A modo de ejemplo, en la Tabla 5.2 se presenta la composición de residuos de cocina y lodos hidrolizados empleados como medios para el crecimiento de Bt en otros estudios. Si se comparan los valores obtenidos para los parámetros característicos en el caso de la FORM (Tabla 5.1) con los de la Tabla 5.2, se observan valores distintos en cuanto a porcentaje de humedad. Esto es debido a que la FORM que se obtiene de Manresa ya viene mezclada con residuos de jardinería y con pallets triturados para mejorar su estructura equilibrando el exceso de humedad. Por lo que a los valores de pH se refiere, estos no difieren entre la FORM y los residuos de cocina, presentando los lodos un pH superior en una unidad. El contenido de nitrógeno es también similar exceptuando el caso de los residuos de cocina estudiados por Zhang y col. (2013) donde el contenido de nitrógeno es el doble.

Tabla 5.2 Parámetros de otros medios utilizados para el crecimiento de Bt según distintos autores.

Parámetros	Residuos de cocina	Lodo deshidratado	Residuos de cocina
	Zhang y col., 2013	Zhuang y col., 2011	Zou y col., 2016
Humedad (% b.h.)	72.48 ± 0.30	79.5	75.25
pH	5.63 ± 0.30	6.86	5.67
Nitrógeno total (% b.s.)	5.21 ± 0.08	2.76	2.58

% b.s.: Porcentaje sobre base seca; % b.h.: Porcentaje sobre base húmeda

### 5.3.1 Crecimiento de Bt en FORM estéril en medio líquido. Comparación con el crecimiento en medio comercial

Como primer paso al utilizar un nuevo sustrato, se ha considerado conocer el comportamiento de Bt en una fermentación sumergida utilizando la FORM esterilizada resuspendida en agua. El hecho de esterilizar la FORM, además de permitir observar el comportamiento de Bt sin competencia de la carga bacteriana nativa, constituye un pretratamiento del residuo facilitando su biodegradabilidad, ya que se obtiene un residuo más poroso y homogéneo. Estas diferencias se observan visualmente en la Figura 5.1 (a) al comparar la FORM sin esterilizar tal cual se obtiene de la planta de tratamiento de Manresa y la FORM esterilizada (b).

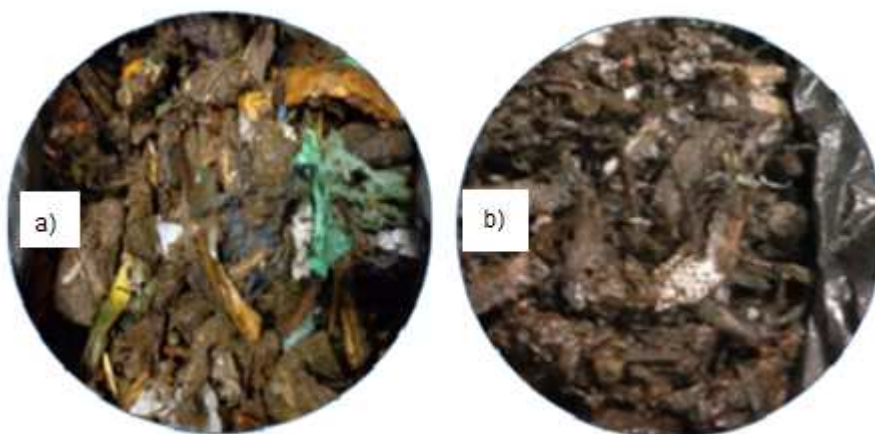


Figura 5.1 Comparación entre (a) FORM fresca y (b) FORM esterilizada

El interés de poder comparar la FORM esterilizada con un medio comercial amerita realizar el estudio de cinéticas de crecimiento en ambos. Inicialmente, la cinética en medio comercial se evaluó en el Capítulo 4 de esta tesis con el residuo de fibra de soja. En dicho capítulo no fue necesario estudiar la soja en medio líquido debido a que ya existían trabajos previos de Abraham (2014) en medio sólido. Además, al iniciar el estudio con un sustrato nuevo y tan complejo como la FORM se creyó necesario explorar diferentes posibilidades en la búsqueda de como proveer a Bt de las condiciones óptimas para su crecimiento.

En esta etapa de la investigación se evaluaron dos cepas en medio comercial en fermentación sumergida, Bt *kurstaki* y Bt *israelensis* para observar si ambas cepas tenían el mismo comportamiento y respondían a las expectativas para trabajos a futuro. Los resultados obtenidos al determinar la cinética de crecimiento de Bt *kurstaki*



en medio comercial estándar se presentan en la Figura 5.2 donde se puede ver la evolución de crecimiento de las colonias viables, la densidad óptica y el peso seco respecto el tiempo de fermentación. El proceso se inició con un 10% (v/v) de inóculo de Bt cuya población inicial fue de  $5.0E+06$  UFC  $mL^{-1}$  y finalizó con  $3.6E+09$  UFC  $mL^{-1}$ .

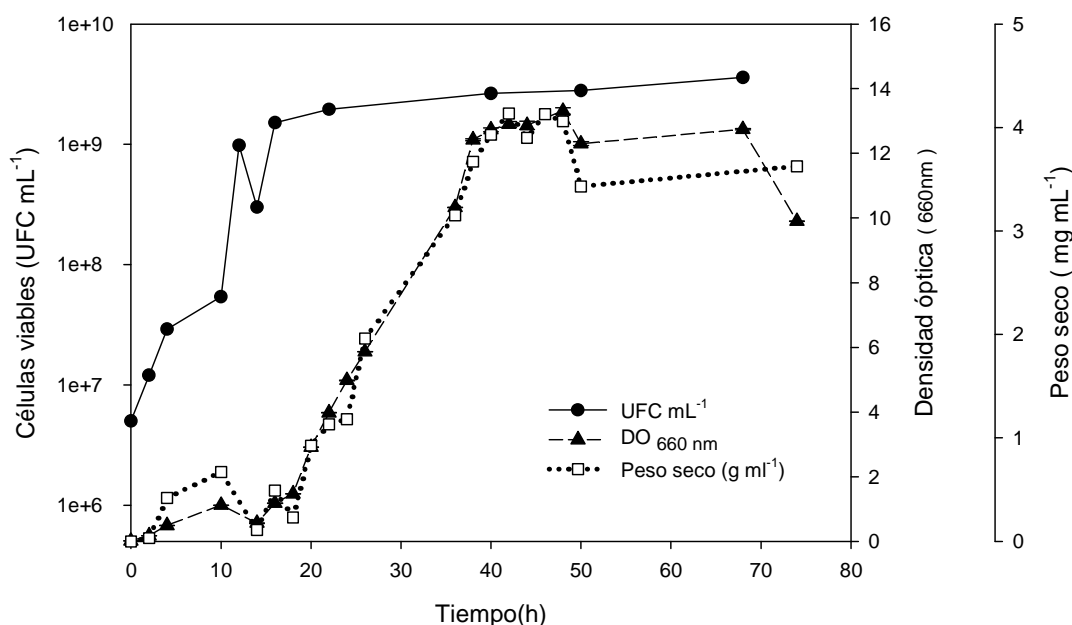


Figura 5.2 Representación de la cinética de crecimiento de Bt cepa CECT 4497 variedad *kurstaki* en condiciones estériles y en el medio comercial OXOID® seguida mediante conteo de células viables (UFC  $mL^{-1}$ ); densidad óptica  $_{660nm}$  y peso seco ( $mg mL^{-1}$ )

El mismo procedimiento desarrollado para Bt variedad *kurstaki* se aplicó a la variedad *israelensis*. Se decidió trabajar con esta cepa, por su disponibilidad e interés creciente como alternativa de control biológico contra mosquitos y otros dípteros (Zhuang et al., 2011). La importancia de conocer el comportamiento de esta cepa, se relaciona con la puesta en marcha de los compostadores domésticos, que se presenta en el Capítulo 7, donde se evalúa su comportamiento a escala real utilizando residuos de hortalizas y frutas asimilables a restos de cocina.

En la Figura 5.3 se presenta la cinética de crecimiento de Bt *israelensis*, en forma de la evolución de las unidades formadoras de colonias, la  $DO_{660nm}$  y el peso seco en función del tiempo. En este caso la población de Bt *israelensis* empezó a decrecer a partir de las 20 horas y se concluyó el experimento a las 50 horas. Aunque no se conoce con exactitud porque se presentó este descenso de la población, lo más

probable es que se deba al agotamiento de nutrientes. En la Figura 5.3 se puede observar que *Bt israelensis* inicia su crecimiento con  $6.4E+06$  UFC mL<sup>-1</sup> alcanzando el máximo crecimiento aproximadamente a las 18 horas. El incremento que presenta la variedad *israelensis* en UFC mL<sup>-1</sup> se alcanza más rápido comparándola con la *Bt kurstaki*, no obstante, ambas variedades consiguen los mismos valores máximos de UFC mL<sup>-1</sup> entre las 18 a 20 horas.

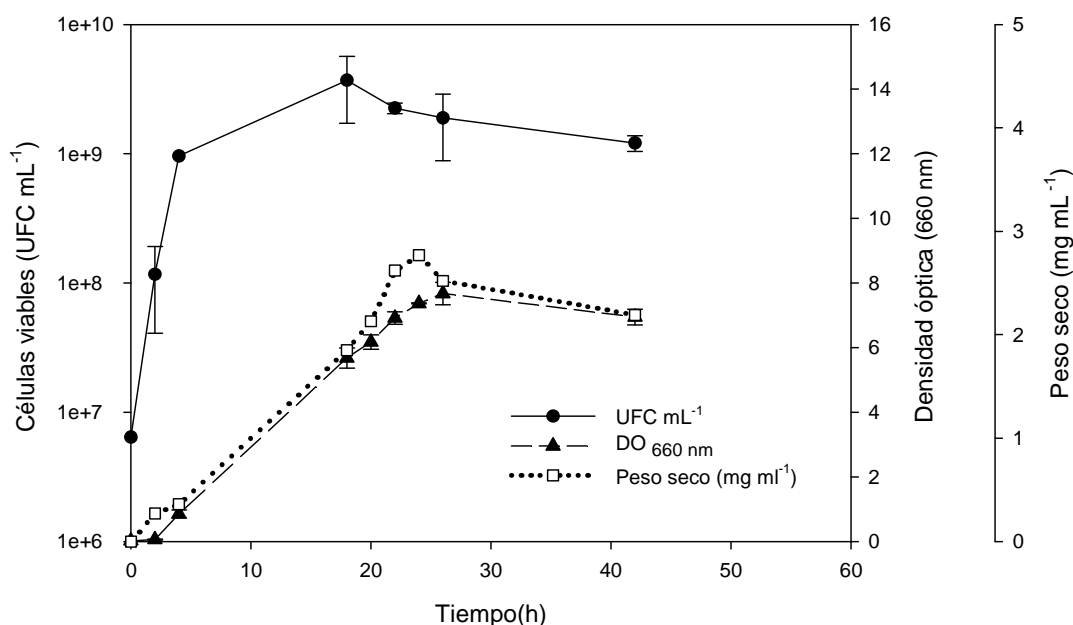


Figura 5.3 Representación de la cinética de crecimiento de *Bt* cepa CECT 5904 variedad *israelensis* en UFC mL<sup>-1</sup>; DO<sub>660nm</sub> y peso seco en mg mL<sup>-1</sup> en condiciones estériles y en medio comercial

Estudios realizados por Ernandes y col. (2013) con variedad *israelensis* (serotype H-14) y empleando como sustrato el licor de maíz fermentado y la adición de triptosa y triptosa más glucosa como medios para el crecimiento de *Bt* en fermentación sumergida, alcanzaron valores de DO<sub>620nm</sub> inferiores a 3, a las 25h aproximadamente. Esta investigación buscaba optimizar el crecimiento de *Bt* para la implementación de un programa de control de vectores viables a través de los bioplaguicidas. Si se comparan estos datos con los obtenidos en la presente investigación, a las 24 horas con la variedad *kurstaki* se alcanza una densidad óptica de 4.98 y con variedad *israelensis* en la misma hora se reporta un 7.37, estos datos son más elevados a los que obtiene Ernandes y col. (2013). Estas diferencias pueden ser debidas al medio

nutritivo comercial utilizado, siendo un medio preparado comercialmente para optimizar el crecimiento de Bt.

Zhuang y col. (2011) en su investigación con lodos de depuradora para producir un biolarvívica, realizan un análisis de la cinética de crecimiento de Bt *kurstaki* en medio LB convencional. Obsevan el crecimiento de Bt para células viables desde exponente 7 en la hora cero, a la hora 6 crece una unidad exponencial, y a las 12 horas sigue creciendo hasta valores cercanos a exponente 9 para mantenerse constante hasta las 18h. Estos datos son muy parecidos a los obtenidos en este trabajo empleando el agar nutriente broth para el crecimiento de Bt.

En el presente estudio se obtiene la máxima población de Bt en promedio a las 22 horas con  $1.9E+09$  y  $2.3E+09$  para variedad *kurstaki* e *israelensis* respectivamente empleando el medio comercial. Recogiendo las evaluaciones de las cinéticas de crecimiento de Bt en medio comercial, se han relacionado linealmente y por separado el peso seco y la  $DO_{660nm}$  en función del tiempo. Las relaciones obtenidas (incluyendo la correspondiente a las UFC  $mL^{-1}$ ) se resumen en la Tabla 5.3

Tabla 5.3 Relación entre UFC  $mL^{-1}$  y tiempo en la fase exponencial de crecimiento de Bt *kurstaki*, con respecto a  $DO_{660nm}$  y peso seco.

Parámetros	Pendiente	Ordenada origen	R2
UFC $mL^{-1}$ vs t(horas)	1E +08	9E+08	0.8263
Densidad óptica vs t(horas)	0.4574	6.1099	0.9874
Peso seco (mg $mL^{-1}$ ) vs t(horas)	0.1241	1.3935	0.9570
UFC $mL^{-1}$ vs densidad óptica	3.00E-09	0.2631	0.9097
UFC $mL^{-1}$ vs peso seco (mg $mL^{-1}$ )	7.00E-10	0.4452	0.9213

Como se puede comprobar en la Tabla 5.3 existe una buena correlación tanto entre peso seco, tiempo y UFC como entre  $DO_{660nm}$  y los mismos parámetros. La relación entre  $DO_{660nm}$  y tiempo (pendiente) es similar al valor presentado en el Capítulo 4 cuando, con un inóculo inicial de Bt del 10% también en medio comercial se obtuvo un valor de 0.32.

La relación de población de *Bt israelensis* en UFC  $mL^{-1}$  obtenida en la cinética de crecimiento, así como el tiempo en la fase exponencial de crecimiento con respecto a  $DO_{660nm}$  y peso seco se presentan en la Tabla 5.4 Como se puede comprobar en dicha tabla, existe una buena correlación tanto entre peso seco y tiempo, así como también

entre las UFC mL<sup>-1</sup> y la densidad óptica tal como ocurría en el caso de la variedad *kurtaski*.

Tabla 5.4 Relación entre UFC mL<sup>-1</sup> y tiempo en la fase exponencial de crecimiento de *Bt israelensis*, con respecto a DO<sub>660nm</sub> y peso seco

Parámetros	Pendiente	Ordenada origen	R2
UFC mL <sup>-1</sup> vs t(horas)	2.00E+08	1.00E+07	0.9857
Peso seco (mg mL <sup>-1</sup> ) vs t(horas)	0.1077	0.004	0.9712
Absorbancia vs t(horas)	0.327	0.4583	0.9957
UFC mL <sup>-1</sup> vs absorbancia	2.00E-09	0.4582	0.9861
UFC mL <sup>-1</sup> vs peso seco (mg mL <sup>-1</sup> )	6.00E-10	0.0094	0.9514

Para las dos cepas, la determinación de cualquiera de estos valores en las mismas condiciones del experimento presentado debería permitir la estimación de los demás.

Con los resultados de las cinéticas de crecimiento en medio comercial a punto, se procedió a determinar las mismas con la FORM esterilizada en fermentación sumergida.

Los resultados obtenidos de las cinéticas de crecimiento de *Bt* en la FORM esterilizada (medio líquido) se presentan en la Figura 5.4 al mismo tiempo que se comparan con los resultados obtenidos de la cinética de *Bt kurtaski* crecido en medio comercial. Es importante recordar en este punto, como ya se ha comentado en el Capítulo 3, que en el caso de la FORM no se pudo seguir el crecimiento mediante DO<sub>660nm</sub> y peso seco por quedar en suspensión partículas de FORM no disueltas que alterarían el resultado.

Utilizando el medio comercial, la variedad *kurtaski* inicia el crecimiento en un exponente 6 (5.00E+06) UFC mL<sup>-1</sup>, mientras que el inóculo para la FORM esterilizada inicialmente tiene una mayor concentración de UFC mL<sup>-1</sup> (1.20E+08) ya que este inóculo se concentró más por permanecer en incubación (4 horas más a diferencia del primero).

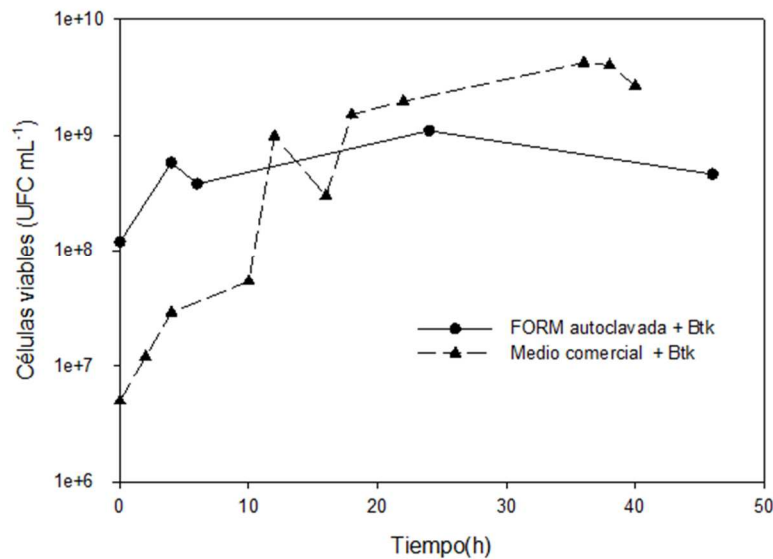


Figura 5.4 Perfil de cinéticas de crecimiento de *Bt kurstaki* crecidas en FORM esterilizada y de *Bt kurstaki* crecidas en medio comercial

Analizando los resultados se observó que para *Bt kurstaki* a las 12 horas de crecimiento con medio comercial y en condiciones estériles alcanza exponente 9 en UFC mL<sup>-1</sup> en comparación a *Bt* crecido en FORM esterilizada que consigue el mismo resultado a las 24 horas, partiendo de una concentración inicial más elevada. Es decir, se requieren 6 horas más en conseguir la misma concentración de UFC si *Bt* crece sobre FORM esterilizada. Hay que considerar que el valor de partida es distinto en los dos casos. Estos resultados indican que es posible utilizar la FORM esterilizada, en medio líquido como sustrato para el crecimiento de *Bt*. En un análisis de ventajas e inconvenientes preliminar, el tiempo adicional que se requiere para una misma concentración se podría compensar con la disminución del coste del sustrato.

Realizando una amplia búsqueda de trabajos en los que distintos residuos se han usado como sustrato para el crecimiento de *Bt* en la bibliografía, la mayor parte de las investigaciones realizadas con lodos, que es el residuo utilizado mayoritariamente, siempre han pasado por un tratamiento previo, por ejemplo: Zhuang y col. (2011) reportan haber trabajado con lodos deshidratados y autoclavados a 121°C por 30 min, dentro del mismo reactor. A este sustrato, después de enfriar se incorporó el inóculo de *Bt kurstaki* y otros cosustratos dando lugar a 3 medios de crecimiento (además de un medio comercial LB): lodo solo; lodo + salvado de trigo; lodo + residuo de paja. En todos los sustratos a las 30h de fermentación, el número de *Bt* alcanzó exponente 9 y

a las 72h de fermentación un exponente 10. Vidyarthi y col. (2002) reportan trabajar con lodos pasteurizados a 95°C por 2 horas con inóculos de *Bt kurstaki* y en fermentación en reactores de 500 mL y con tres diferentes sustratos. Los resultados reportados con lodos son menores a los obtenidos en este trabajo: para células viables se alcanzan  $6.3E+08$  UFC mL<sup>-1</sup> en 36 horas, mientras que la máxima concentración de esporas fue de  $5.2E+08$  UFC mL<sup>-1</sup> a las 48 h. Estas investigaciones presentan buenos resultados a la hora de analizar el crecimiento de *Bt* porque en ambas investigaciones el lodo fue pretratado, es decir, pasó por una etapa de esterilizado, donde se eliminó la carga bacteriana nativa de cada lodo resultando conveniente para que *Bt* colonice el lodo y prolifere.

Del mismo modo, con la FORM esterilizada los resultados obtenidos son viables a la hora de emplear la FORM como inóculo con pocos kilos o en pequeñas cantidades. Sin embargo, valorando un escalado del proceso, esterilizar el residuo implicaría elevar los costes de producción. Además, pensando en la naturaleza del residuo, se prevé dificultad en esterilizar toneladas de éste. Por este motivo se evaluó también el crecimiento de *Bt* en FORM no esterilizada para analizar las posibilidades de su utilización en trabajos futuros. De todos modos, no se descarta la posibilidad de emplear la FORM esterilizada como material que contiene elementos nutricionales necesarios para sostener el crecimiento de *Bt* de coste “cero”.

### **5.3.2 Crecimiento de *Bt* en FORM no estéril en fermentación sumergida**

Trabajar experimentalmente con un microorganismo como *Bt* y el residuo de FORM sin esterilizar (conteniendo otros microorganismos competidores) conlleva tener en cuenta muchos factores que pueden influir en el crecimiento y multiplicación de *Bt*.

A diferencia de las pruebas anteriores sobre medio estéril, donde se incorporaba en reactor un 10% (v/v) de inóculo, en una primera evaluación se decidió incluir directamente todo el contenido de una placa de cultivo de *Bt* (variedad *kurstaki*) correspondiente a 300 UFC g<sup>-1</sup>. En el primer muestreo, al inicio de la fermentación, se obtuvo una población de *Bt kurstaki* de  $2.8E+06$  UFC mL<sup>-1</sup>, similar a pruebas anteriores.

### **Seguimiento de *Bt* en placas de agar procedente de extracto de FORM sin esterilizar**

Se comprobó que efectivamente era factible realizar el seguimiento mediante el mismo procedimiento de conteo de células y esporas que se utilizó en medio comercial con

FORM esterilizada, que también se había usado con residuo sólido de soja no estéril. La duda con la FORM se presentaba al asumir una población microbiana propia más diversa que en el caso del residuo de soja a causa de la misma naturaleza del residuo. El seguimiento de las UFC en las pruebas con FORM sin esterilizar se realizó también mediante el conteo de células viables y esporas en base a la morfología de Bt crecido en placa. En la Figura 5.5 se puede observar el resultado del cultivo en placa con medio agar nutritivo de un extracto de FORM sin esterilizar y sin inocular con Bt. En las Figuras 5.6 y 5.7 se muestra el resultado del cultivo en placa de una muestra del extracto de FORM sin esterilizar inoculada con Bt (células viables y esporas).



Figura 5.5 Placa con extracto de FORM sin esterilizar y sin cepas de Bt

Como se puede observar en las Figuras 5.6 y 5.7, en placa, al ser incubadas durante 18 a 20 horas, las colonias de Bt procedentes del extracto de muestras de FORM sin esterilizar se identificaban muy bien por sus características morfológicas. Al realizar el proceso de esporulación, el hecho de someter a la muestra a 80°C por 10 min eliminaba algunas de las colonias de otros microorganismos que se observaban en placa al mirar células viables.

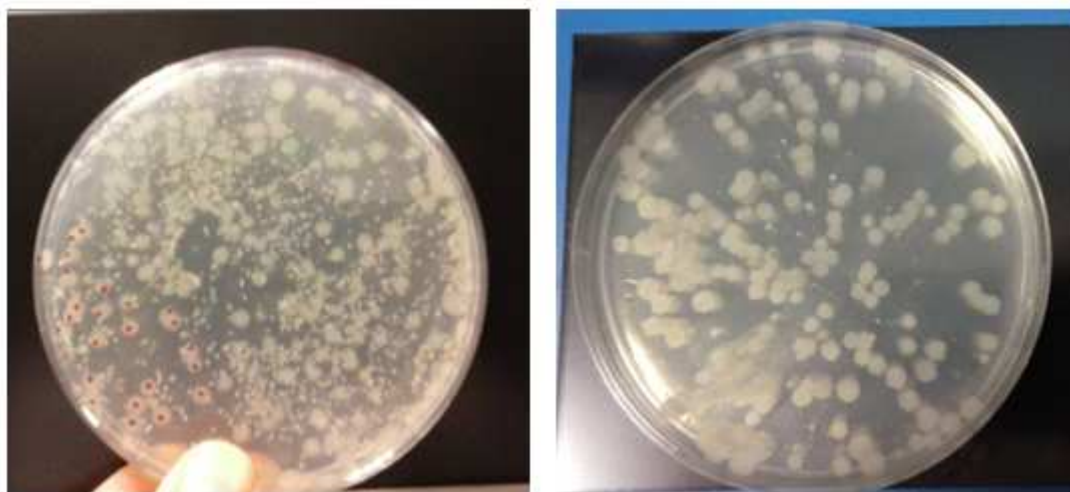


Figura 5.6 Placas de extracto de FORM sin esterilizar a las 24 horas de incubación : células viables (izquierda) esporulado (derecha)

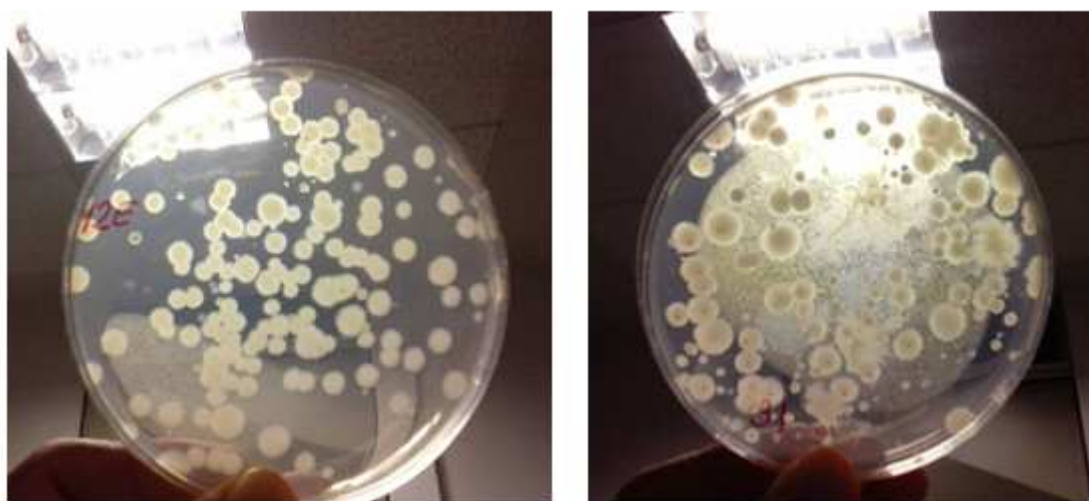


Figura 5.7 Placas de extracto de FORM esporulado cultivado por 18 a 20 horas (izquierda). Placas de extracto de FORM sin esporular incubadas más de 24 horas con presencia de hongos, otras colonias diferentes y Bt (derecho)

En el agar nutritivo las colonias de Bt tienen forma circular con borde irregular, de perfil plano y de color marfil claro como se detalla en la bibliografía (Caballero y col., 2001). En las placas del extracto de FORM sin esterilizar, las colonias de Bt presentan la misma forma, color, borde, y estructura, pero además se observan otras estructuras



completamente diferentes, principalmente pequeñas cristalinas, brillantes de textura lisa que a tras luz se pueden diferenciar sin problemas.

### Cinética de crecimiento de Bt en FORM no estéril (líquido)

La Figura 5.8 muestra la cinética de crecimiento de Bt en FORM sin esterilizar. Se puede observar que Bt logra crecer en un exponente en las primeras 48 h para luego mantenerse en fase estacionaria a partir de las 60 h y descender al final del proceso. Este experimento se mantuvo por 120 h y se trabajó con la variedad *kurstaki*.

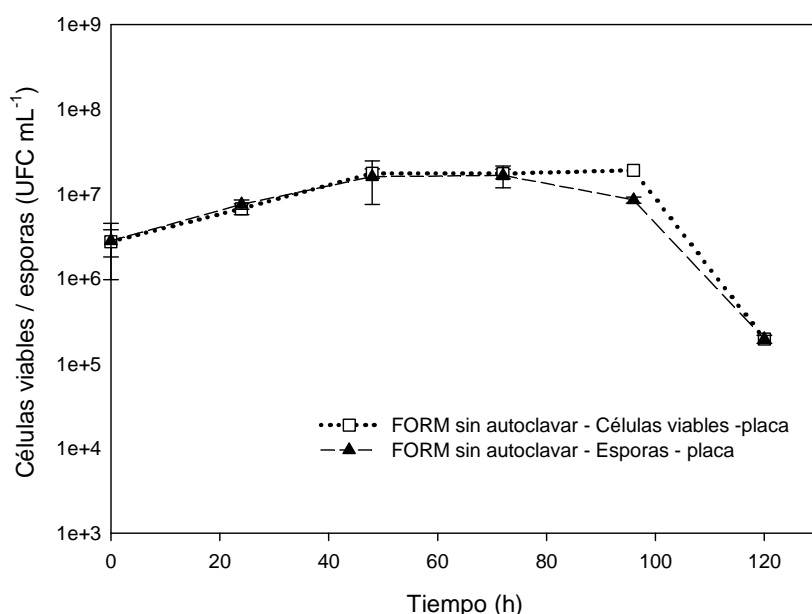


Figura 5.8 Comportamiento de Bt *kurtaski* con inóculo proveniente de una placa petri en FORM no esterilizada

Para comparar los resultados obtenidos con FORM esterilizada y sin esterilizar, en la Figura 5.9 se recoge la evolución del crecimiento de Bt en FORM bajo estas dos condiciones. A las 24 horas en FORM esterilizada se observa un incremento de 9 veces la población de Bt con respecto al valor inicial. En cambio, con la FORM no esterilizada el incremento es de 2 veces su valor inicial para células viables y 3 para esporas. En conclusión, Bt puede crecer en FORM no esterilizada pero su crecimiento es más limitado en comparación a la FORM esterilizada. En una FORM no esterilizada se identificó el máximo crecimiento de Bt a las 40h.

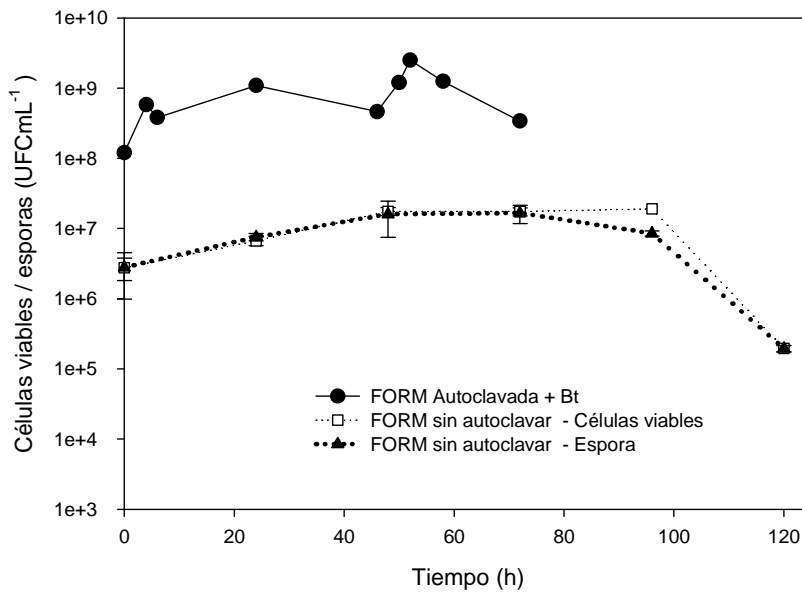


Figura 5.9 Comparación del crecimiento de *Bt kurstaki* en FORM esterilizada y sin esterilizar

La velocidad de crecimiento varía con el tipo de célula y también en función de las condiciones medioambientales físicas y químicas. El crecimiento microbiano depende de la capacidad de la célula para utilizar los nutrientes de su medio y sintetizar los compuestos macromoleculares de las estructuras celulares y también los principales compuestos de peso molecular bajo necesarios para la actividad celular (Owen, 1989).

El volumen inicial de medio de cultivo, el tiempo y las condiciones de agitación y temperatura son otros factores de importancia a la hora de comparar cinéticas de crecimiento. Con los datos obtenidos de la FORM esterilizada, sin esterilizar y los datos del medio comercial se realizó el cálculo para poder estimar la velocidad de crecimiento de *Bt*, en los diferentes medios utilizados. En la Tabla 5.5 se presentan los valores de la constante de velocidad de crecimiento, *k*. Estos valores se obtuvieron a partir de los valores de concentración de UFC en la fase exponencial de crecimiento.

Tabla 5.5 Velocidad de crecimiento de Bt en FmS de FORM esterilizada, sin esterilizar y medio comercial de Bt *kurstaki* e *israelensis*.

<b><i>Bt kurstaki</i></b>	<b>Puntos</b>	<b>Horas</b>	<b>Pendiente</b>	<b>R2</b>	<b>k (h<sup>-1</sup>)</b>
FmS FORM esterilizada	3	De las 0 a las 16	0.0366	0.9087	0.084
FmS FORM sin esterilizar	3	A las 0, 24, 48	0.0168	0.9993	0.039
FmS Medio comercial	6	De las 2 a las 16	0.1408	0.8392	0.324
<b><i>Bt israelensis</i></b>					
FmS Medio comercial	3	A las 0, 2 y 4	0.544	0.9913	1.253

Como se puede observar en la Tabla 5.5, la velocidad de crecimiento de Bt *kurtaski* en medio comercial es 10 veces superior a la velocidad de crecimiento en FORM, tanto esterilizada, como sin esterilizar. Las diferencias entre la FORM estéril y no estéril parecen radicar, no tanto en la velocidad de crecimiento de Bt, sino en el número máximo de UFC mL<sup>-1</sup> que se logra alcanzar (Figura 5.9). La razón entre las constantes de velocidad en estos dos casos es aproximadamente de 2, siendo mayor en la FORM esterilizada dónde Bt puede crecer sin competencia alguna. Por lo que a Bt *israelensis* se refiere, la velocidad de crecimiento en medio comercial es mucho mayor que la del *kurtaski* (4 veces aproximadamente) aunque la concentración de UFC máxima alcanzada sea la misma para las dos variedades.

### 5.3.3 Otras determinaciones realizadas para la comparación entre el crecimiento de Bt en medio comercial y en FORM (medio líquido)

En esta investigación también se analizaron muestras mediante electroforesis en gel de agarosa (SDS PAGE) con la finalidad de determinar el peso molecular de la proteína tóxica de Bt crecido en medio comercial OXOID® y poner a punto la técnica para poder evaluar muestras similares en futuros experimentos. Cabe recordar que al realizar estos análisis para el cultivo de Bt en residuo de soja no se obtuvo éxito. En la Figura 5.10 se observan las bandas correspondientes a muestras obtenidas a las 24 y 48 horas de crecimiento (muestra por duplicado) en medio comercial de Bt a temperatura constante de 30°C, esporuladas y disruptadas. El primer carril corresponde al marcador comercial de Biorad® empleado para la comparación del peso molecular con las muestras en estudio.

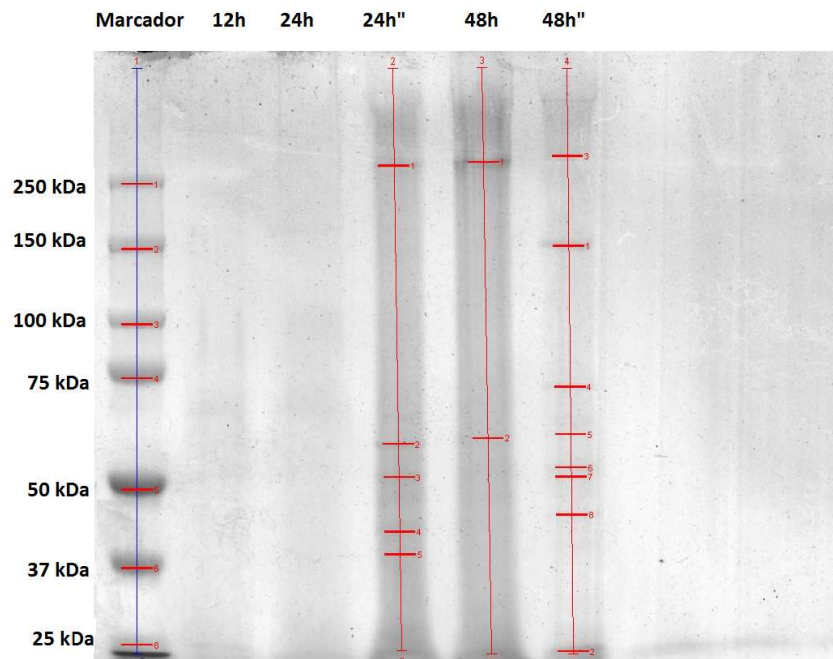


Figura 5.10 Gel de electroforesis de Bt crecido en medio comercial OXOID® a las 12, 24 y 48 horas de fermentación.

Smitha y col. (2013) han reportado valores aproximados de 66, 45 y 30 kDa obtenidos por fermentación sumergida a las 48h de fermentación con LB (muestra control) y con resultados similares utilizando muestras de FES con harina de patata cruda como suplemento del medio. Jisha y col. (2014) mostraron pesos moleculares de 45, 35 y 60 kDa en electroforesis trabajando con Bt y fermentación con fibra de soja, en dos estrategias de fermentación, primero en FES y luego FmS. Zhang y col. (2013) reportan pesos moleculares de 130 y 60 kDa trabajando con extractos de residuos de cocina esterilizados y Bt en reactores de 30, 40 y 45 L correspondientes a 48 horas de fermentación en FES. Chang y col. (2007) presenta resultados con una banda clara en 135 kDa para la endotoxina de Bt trabajando con lodos sin tratar y lodos tratados con ultrasonidos y medio alcalino.

En comparación a todo lo mencionado se concluye que Bt crecido en medio comercial OXOID® en este trabajo a las 24 y 48 horas presenta bandas cercanas a los 60 kDa, que podrían ser bandas de interés correspondientes a la proteína tóxica que determinaría el efecto biopesticida.

La evaluación por electroforesis de la presencia de proteínas de distinto peso molecular en las muestras con FORM esterilizadas y sin esterilizar también se realizó sin tener éxito a la hora de observar las bandas esperadas correspondientes a la endotoxina característica de Bt. En ambas muestras, se empleó el mismo procedimiento que se usó con el medio comercial, pero a la hora de realizar la electroforesis no se consiguieron bandas donde se esperaba. Se debe destacar que con la finalidad de obtener bandas de la proteína tóxica de Bt en FORM esterilizada y sin esterilizar se realizaron numerosas pruebas, sin embargo, por la naturaleza del residuo, al obtener la muestra para analizar siempre quedaban partículas en suspensión (tanto en FORM esterilizada como sin esterilizar). Una razón probable de la inexistencia de las bandas en las pruebas de electroforesis en gel, es que los cristales de proteína tóxica hayan quedado pegados a estas partículas en suspensión. Para limpiar la FORM antes de la electroforesis, se aplicó la técnica descrita por Rahbani y col. (2015) donde se realizan lavados previos y se disuelve la proteína del cristal para su análisis, logrando obtener bandas de 25 kDa solo en FORM esterilizada sin éxito en FORM sin esterilizar. Sin embargo, podría ser discutible el hecho de determinar proteínas en una FORM no esterilizada ya que podría contener otro material que interfiriera con el análisis de Bt. Por consiguiente, se suspendió el intento de seguir buscando proteínas tóxicas de Bt en FORM sin esterilizar.

Con la misma técnica se decidió evaluar un producto comercial llamado COMPO® preparado a base de Bt variedad *kurstaki* que se comercializa como efectivo contra estadíos tempranos de lepidópteros. Este producto se usa por aspersión y su presentación es en polvo liofilizado. Esta evaluación se realizó con la finalidad de identificar a Bt *kurstaki* y analizar la presencia de la proteína tóxica en el producto comercial liofilizado.

Los resultados de la electroforesis del producto comercial Compo® se presentan en la Figura 5.11. El extracto analizado fue de 1 g de polvo comercial con Bt diluido en 9 mL de agua estéril. Se prepararon muestras de 1 mL, primero se esporularon a 80°C mediante un shock térmico, luego se disruptaron y finalmente se prepararon grupos de duplicados disruptados, esporulados y sin esporular. Se encontraron bandas en Dd1 y Dd2 (duplicados de muestras disruptadas diluidas) y disruptado diluido esporulado (Dde-1). Como se puede observar en la Figura 5.11, no se encontró ninguna banda en los extractos de muestras disruptadas sin esporular.

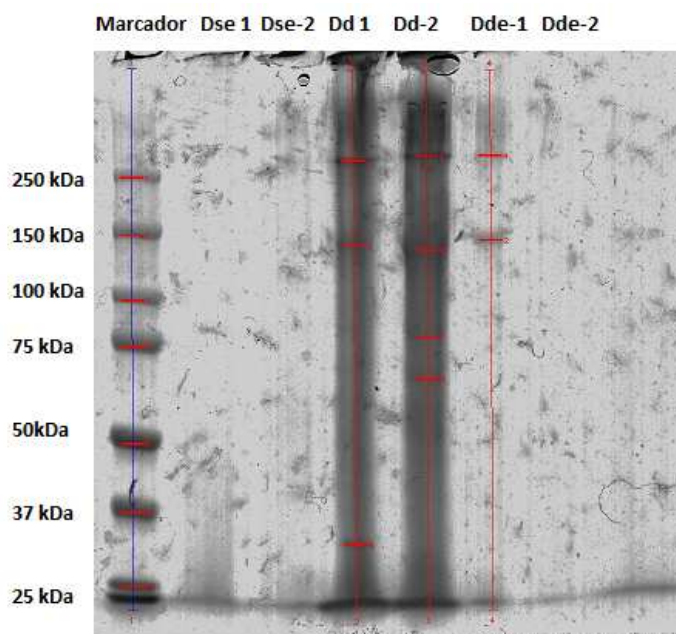


Figura 5.11 Gel de electroforesis del producto comercial Compo® de extractos de muestras Dse (disruptado sin esporular), Dd (disruptado esporulado) Dde (disruptado diluido esporulado)

Como ya se ha comentado, Caballero y col. (2001) reportan perfiles proteicos de los componentes del cristal paraesporal de las cepas de Bt presentes en los productos comerciales como Dipel® y Xentari®. Para ambos productos se observa una banda en aproximadamente 130 kDa mientras que en Dipel® se observa también una banda a 66 kDa. Los resultados obtenidos con el producto Compo® indicarían que probablemente contiene otras proteínas que se estarían reportando a la hora de realizar la densimetría del gel. La proteína que se busca se encontraría en las dos muestras entre los valores de 100 y 150 kDa. Se obtiene una banda clara alrededor de los 66 kDa para la muestra Dd-2, que según los resultados obtenidos por Caballero y col. (2001) podría corresponder a la toxina.



## CAPÍTULO 6

---

*Los resultados que se presentan en este capítulo están en fase de preparación para envío a revista científica en los próximos tres meses, junto con los del capítulo 5. El título tentativo para éste artículo es: Operational strategies for Bacillus thuringiensis growth in SSF using OFMSW as substrate under non sterile conditions.*





## 6 ESTRATEGIAS PARA EL CRECIMIENTO DE *Bacillus thuringiensis* EN FORM MEDIANTE FERMENTACION EN ESTADO SÓLIDO

### 6.1 *Introducción*

Considerando los resultados obtenidos en el capítulo anterior, donde se ha observado el crecimiento de Bt utilizando FORM como substrato, en el presente capítulo se estudia la viabilidad de utilizar el residuo en la forma en la cual se obtiene, en forma sólida y sin esterilizar. Se han investigado diferentes estrategias con el objetivo de encontrar la manera más viable de hacer crecer a Bt en FORM por FES.

La primera FES se desarrolló en reactores de 500 mL de capacidad, empleando diferentes porcentajes de inóculo de Bt y FORM esterilizada y sin esterilizar. Las siguientes fermentaciones se realizaron en reactores de 10 L incorporando, en algunos casos, inóculo crecido en medio comercial y en otros, inóculo crecido en la misma FORM mediante fermentación sumergida, como se describió en el capítulo anterior.

En estas fermentaciones se aplicaron diferentes estrategias con el objetivo de una aplicación industrial, a condiciones reales, en la búsqueda del crecimiento de Bt. Cada estrategia es resultado de la experiencia anterior, ya que según los resultados obtenidos se fue modificando la metodología operacional hasta obtener la más idónea para la producción de Bt.

### 6.2 *Materiales y Métodos*

Se ha utilizado la misma FORM de recogida selectiva procedente de la planta de compostaje de Manresa (Barcelona) que se utilizó en el capítulo anterior. Esta FORM se ha recogido ya estructurada, mezclada con pallet triturado y fracción vegetal, en la misma instalación. La FORM se ha pasado por una criba de 8 a 10 cm de diámetro aproximadamente, para facilitar la incorporación del residuo en los reactores de 10 L. En el caso de los reactores de 500 mL, este residuo se ha pasado por una criba más pequeña, de aproximadamente 2 cm de diámetro.

Se evaluó el crecimiento de Bt en reactores de 500 mL, 4.5 L y 10 L de capacidad, en condiciones estériles y no estériles, probando diferentes estrategias de aireación, porcentaje de inóculo, tiempo de inoculación y efecto de la agitación de la matriz sólida. Se realizó el seguimiento del perfil de temperatura, concentración de oxígeno, velocidad específica de consumo de oxígeno (sOUR). Se siguió la evolución del porcentaje de humedad, materia orgánica y pH durante los muestreos siguiendo procedimientos estándar (US Department of Agriculture and US Composting Council, 2001). El seguimiento de Bt se realizó mediante el conteo de células viables y esporas (Zhuang y col., 2011) y la identificación de Bt y el cristal paraesporal mediante tinción de Gram (células) y tinción de Schaeffer y Fulton, mediante verde malaquita (esporas) e imágenes SEM.

### Preparación de inóculo de Bt en FORM esterilizada

La preparación del inóculo de Bt en FORM se realizó siguiendo el mismo procedimiento descrito en el capítulo anterior. En resumen, la FORM fue triturada y se utilizó 112.5 g en 1800 mL de agua MiliQ, utilizando la misma proporción de sólidos que contiene el medio comercial. La fermentación se realizó en condiciones estériles con el 10% (v/v) de inóculo de Bt previamente obtenido en medio comercial (incubación de crioperla a 30°C con agitación de 130 rpm en un promedio de 20h). En la Figura 6.1 (a) se observa el inóculo de Bt en FORM después de centrifugar a 3500 rpm por 10 min y eliminar el sobrenadante, donde se aprecia que Bt queda suspendido en la parte superior del vaso. En la Figura 6.1 (b) se observa la mezcla y homogenización de todo el material centrifugado.

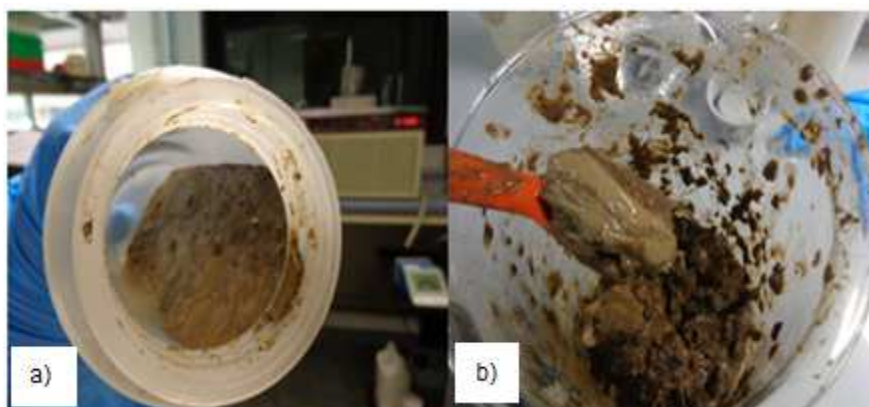


Figura 6.1 (a) inóculo de Bt en FORM después de centrifugar a 3500 rpm por 10 min y eliminar sobrenadante (b) mezcla y homogenización de inóculo de Bt

## **Prueba estadística**

La prueba estadística que se utilizó para la comprobación de los distintos sustratos inoculados o no con Bt, fue ANOVA (un factor). Para poder hacer una comparación entre los grupos de resultados se utilizó el test de comparación múltiple de Tukey. El nivel de confianza fue del 95%. Las pruebas estadísticas se llevaron a cabo con Minitab vs 17.

## **6.3 Resultados y Discusión**

### **6.3.1 Viabilidad de crecimiento de Bt en FORM mediante FES en reactores de 500 mL a temperatura y caudal de aire constante**

Conocer el material de entrada para la FES es de mucha importancia, ya que de este material depende obtener un sustrato que pueda sostener el proceso y brindar posibilidades de crecimiento a Bt. Por otro lado, los microorganismos propios que pueda contener la FORM hacen posible la velocidad de descomposición para una transformación biológica eficiente. La FORM es un residuo bastante heterogéneo y variable por los diferentes materiales orgánicos que la componen en distintas épocas del año.

En primer lugar, y teniendo en cuenta que se ha trabajado con FORM muestreada en diferentes épocas del año, en la Tabla 6.1 se presentan los resultados de tres FES de FORM sin inocular. Dada la variabilidad intrínseca de la FORM, se ha creído necesario conocer el comportamiento de la FORM sin esterilizar y sin inóculo en un proceso normal de FES, en reactores de 500 mL con temperatura y aireación constante, que servirá como control cuando se realice la evaluación en reactor con FORM sin esterilizar y con inóculo. En la Tabla 6.1 se detallan los parámetros característicos de los tres procesos de FES como el porcentaje de humedad, MO, pH, medida de la actividad biológica específica (sOUR) y consumo de oxígeno acumulado en 4 días (AT<sub>4</sub>).

Tabla 6.1 Valores iniciales y finales de H, MO, pH y valores finales de sOUR, AT<sub>4</sub> y fase de latencia en reactores de 500 mL con FORM sin inocular

Parámetros	Control 1	Control 2	Control 3
Días totales de proceso	7	8	6
Humedad inicial (% b.h.)	59.3	57.3	59.1
Humedad final (% b.h.)	-	52.5	-
M.O. inicial (% b.s.)	67.4	67.85	67.1
M.O. final (% b.s.)	-	53.24	-
pH inicial	5.58	5.16	5.48
pH final	7.14	7.89	7.44
sOUR máx (g O <sub>2</sub> kg <sup>-1</sup> MS h <sup>-1</sup> )	3.25 ± 0.13	3.0 ± 0.6	4.2 ± 0.3
AT <sub>4</sub> (g O <sub>2</sub> kg <sup>-1</sup> MS)	240 ± 22	203 ± 39	299 ± 23
Fase de latencia (h)	15 ± 3	12.7 ± 0.7	19.9 ± 1.1

b.h.: base húmeda; b.s.: base seca

Los valores iniciales de los parámetros característicos de la FORM presentan desviaciones inferiores al 5%, pudiendo considerar uniformidad de características del residuo. En concreto, en el caso de la humedad inicial la desviación de los tres valores era del 1.4%, para la materia orgánica, un 0.4% y para el pH, del 3.1%. En el caso del pH final la desviación fue de 3.56%. Las mayores diferencias entre los resultados de la FES recogidos en la Tabla 6.1 para los tres controles se registraron para sOUR, AT<sub>4</sub> y fase de latencia siendo la desviación entre ellos de 13.7%, 13.9% y 16.6% respectivamente. Sin embargo, esta variabilidad es común en la FORM (Ponsá, 2010).

### Fermentación en estado sólido con FORM estéril

Se realizó una fermentación utilizando el residuo de FORM esterilizado y se incorporó un 10% (v/p) de inóculo crecido en medio comercial OXOID®. En la Tabla 6.2 se presentan los valores de la evaluación inicial y final de los parámetros determinados. También se presentan los valores iniciales y finales del seguimiento de Bt en células viables, esporas y el total de UFC g<sup>-1</sup> expresados en base a materia seca, de los 10 días de proceso que duró la FES.

Tabla 6.2 Valores iniciales y finales obtenidos en el proceso de FES con FORM esterilizada inoculada con Bt en reactores de 500 mL de capacidad.

FORM esterilizada		
Parámetros	Inicial	Final
Inóculo (% v/p)	10	-
Humedad (% b.h.)	55.24	53.85
Materia Orgánica (% b.s.)	64.59	52.03
pH	5.84	8.19
Células viables (UFC g <sup>-1</sup> MS)	1.5E+08 ± 4E+07	1.9E+08±2E+07
Esporas (UFC g <sup>-1</sup> MS)	1.1E+08 ± 3E+07	2.5E+08±1E+07
Total (UFC g <sup>-1</sup> MS)	2.6E+08 ± 7E+07	4.5E+08±4E+07
sOUR máx (g O <sub>2</sub> kg <sup>-1</sup> MS h <sup>-1</sup> )	-	2.07 ± 03
AT <sub>4</sub> (g O <sub>2</sub> kg <sup>-1</sup> MS)	-	138.1±16.1
Fase de latencia (h)	-	6.26± 0.63

b.h.: Base húmeda; b.s.: Base seca

Durante este proceso se evaluó la cinética de crecimiento de Bt, a través de conteo de células viables y esporas obteniendo el perfil de crecimiento que se presenta en la Figura 6.2. Asimismo, para facilitar la interpretación de los resultados, se muestra el perfil de velocidad de consumo de oxígeno (sOUR g O<sub>2</sub> kg<sup>-1</sup> MS h<sup>-1</sup>) como medida de actividad biológica de las 8 replicas realizadas.

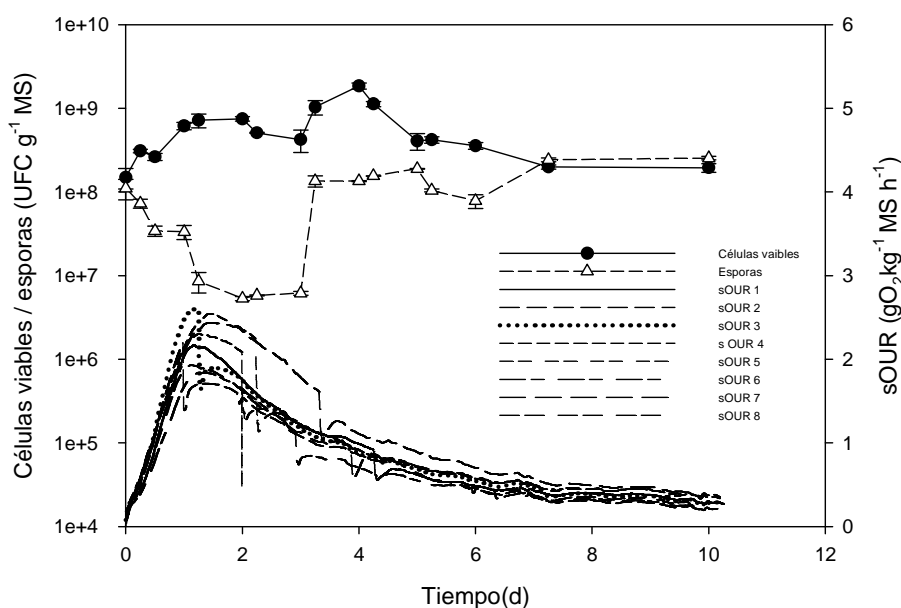


Figura 6.2 Perfil de seguimiento de Bt (UFC g<sup>-1</sup> MS) en FORM esterilizada e inoculada con el 10% (v/p) Bt y perfil de 8 repeticiones de sOUR (g O<sub>2</sub> kg<sup>-1</sup> MS h<sup>-1</sup>) en FES.

Como se observa en la Figura 6.2, hay un aumento en el número de células viables de Bt durante los primeros 4 días de proceso. Inicialmente el inóculo fue de  $1.5 \text{ E}+08 \text{ UFC g}^{-1} \text{ MS}$  y el día 4 de proceso, el valor máximo fue de  $1.9\text{E}+09 \text{ UFC g}^{-1} \text{ MS}$ , lo que supone un incremento 12 veces el valor inicial, mientras que las esporas sufren una reducción los primeros 3 días y el día 4 se incrementan en un 21.5% respecto al valor inicial. Esto puede ser debido a que al inicio del proceso la materia orgánica fácilmente biodegradable que presenta la FORM esterilizada (que, como se ha comentado, es más homogénea y porosa que la FORM sin esterilizar), hace que Bt esté en condiciones idóneas para crecer y, más adelante, al disminuir esta materia orgánica se produce la esporulación en mayor proporción.

El consumo acumulado de oxígeno a los 4 días fue  $138 \text{ g O}_2 \text{ kg}^{-1} \text{ MS}$ . Comparando este valor con el obtenido con FORM control (sin esterilizar y sin inóculo) descrito anteriormente ( $247 \text{ g O}_2 \text{ kg}^{-1} \text{ MS}$ ) se ve que el consumo de oxígeno acumulado en 4 días de proceso fue menor en un 44% para las muestras esterilizadas y con inóculo de Bt, con respecto a las muestras sin esterilizar y sin inóculo de Bt. Probablemente, como ya se ha visto con el residuo de soja también, el mayor consumo de oxígeno se deba a la diversidad de población microbiana que presenta el residuo de FORM nativa sin esterilizar.

La fase de latencia obtenida en condiciones estériles de proceso fue 6.26 h, mientras que en reactor sin inóculo y sin esterilizar la fase de latencia en promedio fue de 15.9 h. Este efecto puede ser debido a la mayor disponibilidad de materia orgánica fácilmente biodegradable después de esterilizar la FORM. En estas condiciones, y solo inoculado con Bt, los resultados muestran que Bt no necesita mucho tiempo para adaptarse a la matriz sólida, teniendo en cuenta además que ya el inóculo se encuentra en fase exponencial de crecimiento.

En la Figura 6.3 se ha representado, junto a la evolución de las células viables de Bt en FES, la obtenida durante la fermentación sumergida del capítulo anterior, donde se utiliza igualmente FORM estéril como sustrato de crecimiento. Para facilitar la comparación, las UFC de ambas fermentaciones se han expresado en las mismas unidades, respecto a gramos de materia seca de sustrato.

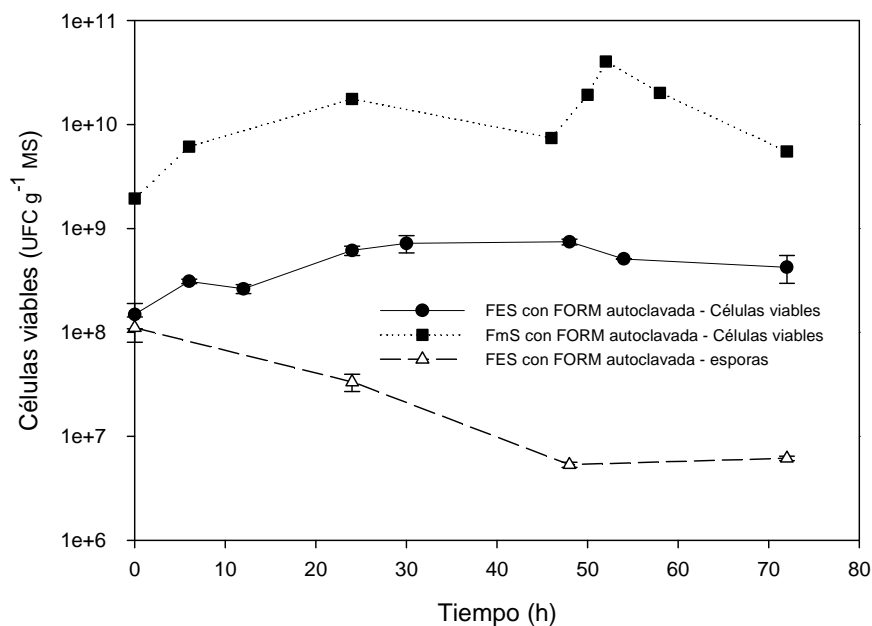


Figura 6.3 Comparación de crecimiento de células viables y esporas de Bt en FORM esterilizada en FmS y FES expresados en UFC/g de materia seca.

El coeficiente de correlación obtenido para FES y fermentación sumergida fue de 0.8796 con pendiente  $2E+07$  y 0.9996 con pendiente  $6E+08$ , respectivamente. Estos resultados demuestran que en 24h de fermentación, que corresponde a la etapa de crecimiento exponencial, la mejor tendencia lineal se encuentra cuando Bt crece en fermentación sumergida. El valor de la constante de velocidad de crecimiento calculada en función de las UFC g<sup>-1</sup> MS es de 0.050 h<sup>-1</sup> en el caso de la FES y de 0.084 h<sup>-1</sup> para la fermentación sumergida (fase exponencial de crecimiento, R<sup>2</sup> de 0.9134 y 0.9087 respectivamente). El orden de magnitud de este valor es el mismo, aunque en el caso de la FES se reduce al 60% respecto de la fermentación sumergida mostrando menor velocidad de crecimiento en sólido. No se han encontrado valores de esta constante para este residuo en las mismas condiciones en la bibliografía.

Zhang y col. (2013) reportan recuentos de esporas de  $5.01E+10$  UFC g<sup>-1</sup> en FES en 48 h utilizando un sustrato con un contenido de 55.21% de residuos de cocina, 22.08% cáscara de trigo, 11.04% torta de soja en polvo y 11.04% de cáscara de grano. Como se puede observar en la Figura 6.3, en la FES con FORM esterilizada, en 48 h de fermentación las esporas se redujeron en un 95.2% respecto al inóculo inicial y representan un valor 4 órdenes de magnitud inferior al presentado por Zhang y col. (2013), mientras que las células viables se incrementaron en un 400% respecto al inóculo inicial.



La reducción que se presenta en comparación a los resultados de Zhang y col. (2013) probablemente se deba a una limitación de la disponibilidad de nutrientes durante la FES. En principio, un cultivo de Bt esporula cuando existen condiciones adversas en su medio, mientras eso no suceda son células viables en constante adaptación. Además, en 48h de fermentación con la misma FORM en fermentación sumergida con residuo esterilizado no existen problemas de restricción de nutrientes, como sugieren los resultados obtenidos en el capítulo anterior.

Por otra parte, en 6 días de FES con residuo de fibra de soja (capítulo 4 de esta tesis) se obtuvo  $8.6E+10$  UFC  $g^{-1}$  de esporas y  $6.20E+11$  UFC  $g^{-1}$  de células viables. En esta investigación en 6 días de FES se obtuvo para esporas  $7E+07$  UFC  $g^{-1}$  y para células viables  $3.6E+08$  UFC  $g^{-1}$ . Esta diferencia favorable al aumento de las colonias de Bt en residuo de soja se corrobora también si se tienen en cuenta los valores de consumo máximo de oxígeno que se obtuvieron para residuo de soja ( $2.8 \pm 0.2$   $gO_2$   $kg^{-1}$  MS  $h^{-1}$ ) y los obtenidos para FORM ( $2.1 \pm 0.3$   $gO_2$   $kg^{-1}$  MS  $h^{-1}$ ), demostrando una velocidad de consumo de oxígeno de Bt más elevada en el primer caso.

El residuo de soja contiene más cantidad de materia orgánica biodegradable que la FORM. Esta conclusión se ve reflejada en el consumo de oxígeno acumulado a los 4 días de fermentación que para el residuo de soja fue de  $236 \pm 2$   $g O_2$   $kg^{-1}$  MS y para la FORM de  $138 \pm 16$   $g O_2$   $kg^{-1}$  MS.

### **Fermentación en estado sólido con FORM no estéril**

La viabilidad del crecimiento de Bt en condiciones no estériles a escala 500 mL se estudió con 3 dosis en torno al 10% de inóculo, las dosis fueron 7%, 9% y 12% (v/p) obtenidas a partir del cultivo de Bt en medio comercial OXOID® mediante fermentación sumergida. En la Tabla 6.3 se muestran los resultados obtenidos de los parámetros de seguimiento del proceso. Los valores de humedad inicial en todas las muestras evaluadas presentaron valores muy similares, ya que la única diferencia entre ellos fue el porcentaje de inóculo incorporado a inicio de proceso, con un 2% de desviación y finalizaron con un 8% de desviación. Estos porcentajes de humedad garantizan el correcto desarrollo de la actividad microbiana.

Tabla 6.3 Valores iniciales y finales de parámetros en estudio con FORM sin esterilizar y con diferente porcentaje de inóculo de Bt en reactores de 500mL

Parámetros	FORM Sin esterilizar		
	7	9	12
Inóculo probado % (v/p)	7	9	12
Humedad inicial % (b. h.)	60.98	64.34	62.34
Humedad final % (b. h.)	48.75	59.93	58.79
M.O. inicial %	73.51	82.06	80.89
M.O. final %	42.93	57.72	64.88
pH inicial	5.26	5.97	5.26
pH final	8.82	7.88	8.62
Inicial células viables (UFC g <sup>-1</sup> MS)	1.1E+07 ± 2E+06	2.E+07 ± 1E+06	1.3E+07±7E+06
Final células viables (UFC g <sup>-1</sup> MS)	9.9E+05 ± 8E+04	1.1E+07 ± 2E+06	2.5E+07 ± 5E+06
Inicial esporas (UFC g <sup>-1</sup> MS)	1.6E+07 ± 9E+06	1.1E+07 ± 9E+06	3E+07 ± 2E+07
Final esporas (UFC g <sup>-1</sup> MS)	8.8E+05 ± 1E+04	3.67E+06 ± 9E+04	2E+07 ± 1E07
Total inicial (UFC g <sup>-1</sup> MS)	1E+07 ± 1E+07	4E+07 ± 2E+07	5E+07 ± 3E+07
Total final (UFC g <sup>-1</sup> MS)	1.9E+06 ± 2E+05	1.5E+07 ± 2E+06	5E+07 ± 2E+07
sOUR máx (g O <sub>2</sub> kg <sup>-1</sup> MS h <sup>-1</sup> )	2.0 ± 01	4.3 ± 02	3 ± 03
AT <sub>4</sub> (g O <sub>2</sub> kg <sup>-1</sup> MS)	157 ± 9	226 ± 2	200 ± 2
Fase de latencia (h)	26.9 ± 2	14.0 ± 01	20.5 ± 2

bh: Base húmeda;( v/p) relación volumen peso

El resultado de las fermentaciones con 7 y 12% (v/p) de inóculo presentan valores de OUR y AT<sub>4</sub> inferiores a los valores obtenidos en reactores sin adición de inóculo. El AT<sub>4</sub> muestra como el oxígeno consumido en ambos reactores inoculados es menor en 37 y 19%. Para comprender mejor estos valores, se ha comparado estadísticamente el valor de sOUR y el AT<sub>4</sub> para el residuo de FORM y de soja en las diferentes opciones estudiadas (Tabla 6.4)

Tabla 6.4 Comparación de sOUR y AT<sub>4</sub> para residuo de FORM y de soja

Residuo	sOUR máx (g O <sub>2</sub> kg <sup>-1</sup> MS h <sup>-1</sup> )	AT <sub>4</sub> (g O <sub>2</sub> kg <sup>-1</sup> MS)
FORM	3.5 ± 0.6 <sup>A</sup>	246 ± 47 <sup>A</sup>
FORM estéril + Bt	1.9 ± 1.0 <sup>B</sup>	138 ± 16 <sup>C</sup>
FORM no estéril + Bt	2.9 ± 0.6 <sup>A</sup>	186 ± 32 <sup>B</sup>
Soja	7.1 ± 0.8 <sup>A</sup>	326 ± 41 <sup>A</sup>
Soja estéril + Bt	5.4 ± 1.2 <sup>C</sup>	285 ± 28 <sup>AB</sup>
Soja no estéril + Bt	2.8 ± 0.3 <sup>B</sup>	221 ± 16 <sup>B</sup>

Para cada residuo, letras distintas indican que hay diferencias significativas (test de comparación múltiple de Tukey p < 0.05)

En la Figura 6.4 se ha representado en forma de diagrama de caja, los valores de sOUR máxima de los diferentes replicados de las fermentaciones realizadas con FORM, FORM esterilizada y sin esterilizar inoculada con Bt, en este último caso considerando conjuntamente los diferentes porcentajes de Bt inoculado.

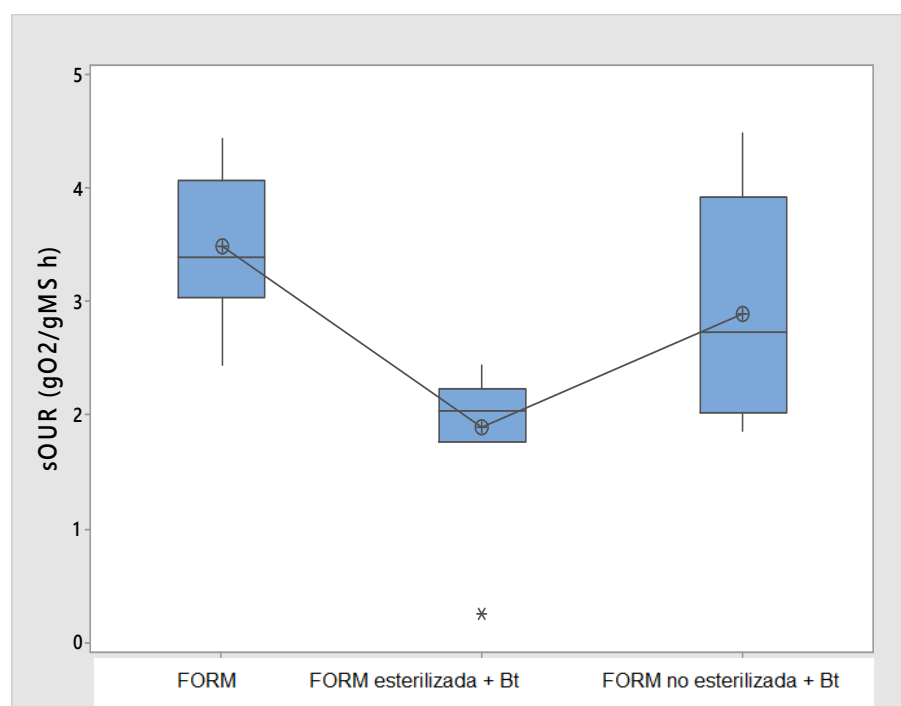


Figura 6.4 Diagrama de caja de comparación de los valores de sOUR máx. en función de la FES utilizando FORM sin Bt, FORM esterilizada y sin esterilizar con Bt.

Como se puede observar, hay diferencias significativas entre la sOUR de la FORM y la FORM no estéril + Bt con la FORM estéril + Bt. La distribución de los valores es diferente en función la fermentación. Así, la FORM sola presenta los valores más elevados de sOUR si se compara con la FORM estéril inoculada con Bt. La gran diversidad de microorganismos autóctonos, con diferentes sinergias entre ellos, explicarían la elevada tasa de consumo de oxígeno, que implicaría a su vez una más rápida degradación de la materia orgánica. En el caso de la FORM inoculada, pero sin esterilizar, los valores se encuentran distribuidos en un rango más amplio. Aunque el valor promedio no es estadísticamente diferente a la FORM (Tabla 6.4), el hecho de encontrar una distribución más elevada de valores inferiores indica que Bt tiene algún tipo de influencia en el comportamiento del resto de los microorganismos. Si esta misma comparación se realiza con los valores obtenidos con el residuo de soja (Figura 6.5) se observa la misma tendencia. En este caso además, hay diferencias estadísticas entre los tres valores (Tabla 6.4).

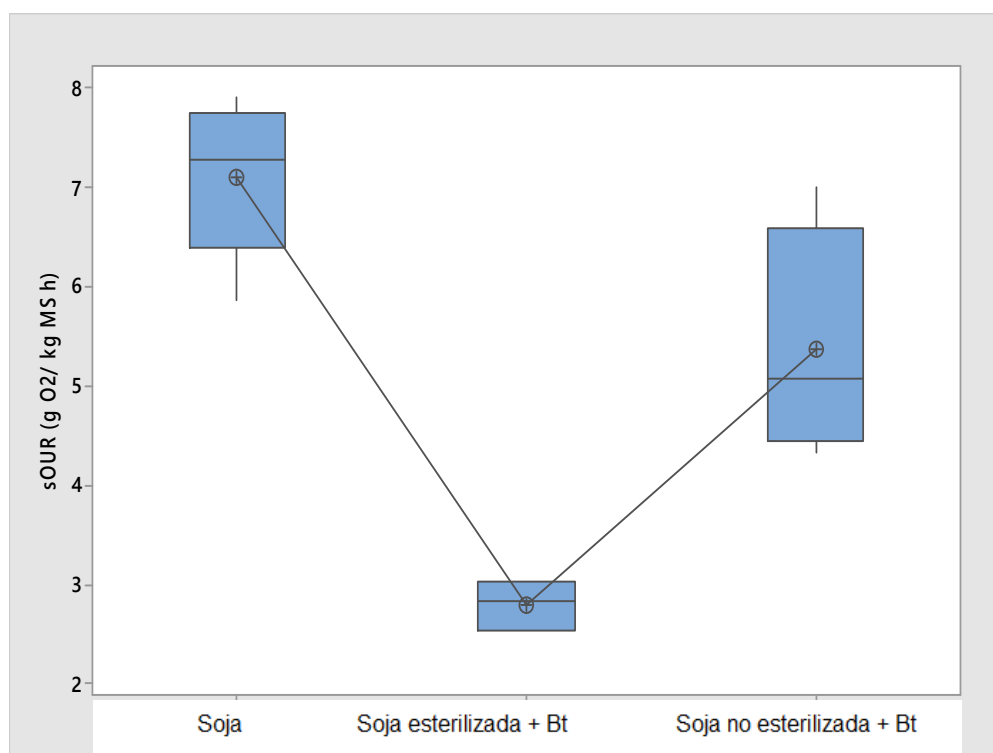


Figura 6.5 Diagrama de caja de comparación de los valores de sOUR máx. en función de la FES, utilizando el residuo de soja sin Bt, residuo de soja esterilizado y sin esterilizar con Bt.

Se observan los mismos resultados si se comparan los valores de consumo acumulado a 4 días, donde es más evidente el mayor consumo de la población autóctona de ambos residuos (Figura 6.6, a y b). Ante estos valores, se puede asumir que la presencia de *Bt* en la matriz sin esterilizar influye en alguna medida en la actividad de los microorganismos nativos del residuo, disminuyéndola.

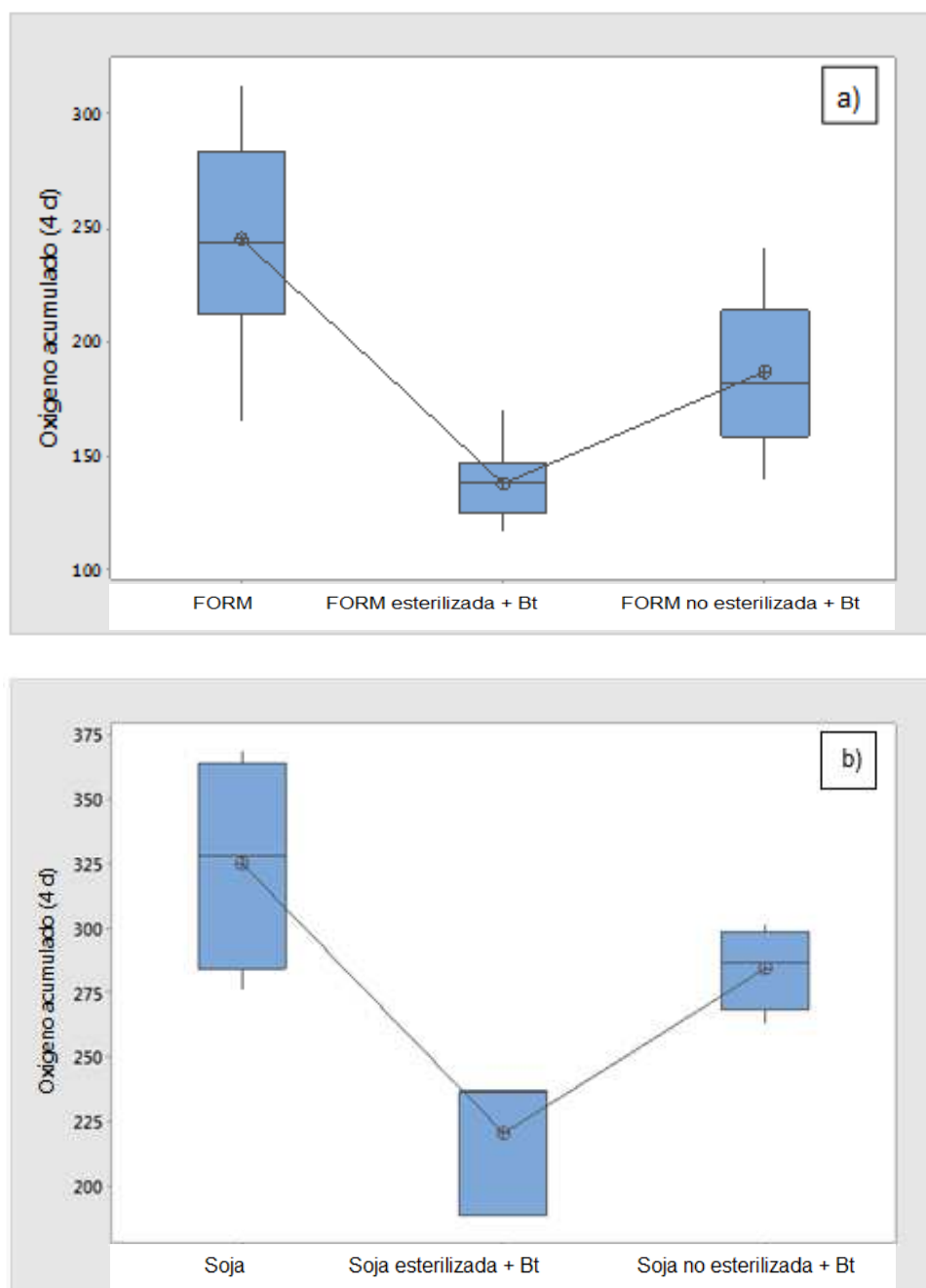


Figura 6.6 Diagrama de caja de comparación de los valores de consumo acumulado a cuatro días en función de la FES, utilizando el residuo de soja imagen a) y FORM imagen b).

Los resultados del crecimiento de células viables de Bt empleando diferente porcentaje de inóculo en la FES, se presentan en la Figura 6.7 donde se compara el comportamiento de Bt utilizando FORM esterilizada con el 10% (v/p) de inóculo y FORM sin esterilizar con porcentajes de 7, 9 y 12 % (v/p) de inóculo. Se observa que con un porcentaje del 7% (v/p) de inóculo, Bt no crece respecto al inóculo inicial ( $1.1E+07$  UFC  $g^{-1}$  MS), disminuyendo en un 24% durante las primeras 24 horas para posteriormente seguir decreciendo. Entre el porcentaje de inóculo 9 y 12% (v/p) estudiados, se encuentran pequeñas diferencias, ambos crecen en el primer día de proceso y se mantienen posteriormente hasta el día 4 para decrecer en adelante hasta el día 10. Con el 9% (v/p) de inóculo, Bt logra crecer 3 veces respecto a su valor inicial a las 24 horas y con el 12% crece 4 veces su valor inicial en las mismas 24 horas. Comparando la evolución del crecimiento para los distintos porcentajes de inóculo de Bt en FORM sin esterilizar con el 10% (v/p) en FORM esterilizada, se observa un mejor crecimiento de Bt en FORM esterilizada, seguramente por el mismo hecho de estar libre de carga bacteriana y por tanto, de posible competencia. A partir del día 4, la disminución de la concentración de células viables es común para todos los casos y podría estar relacionado con la disminución de los nutrientes disponibles en el medio.

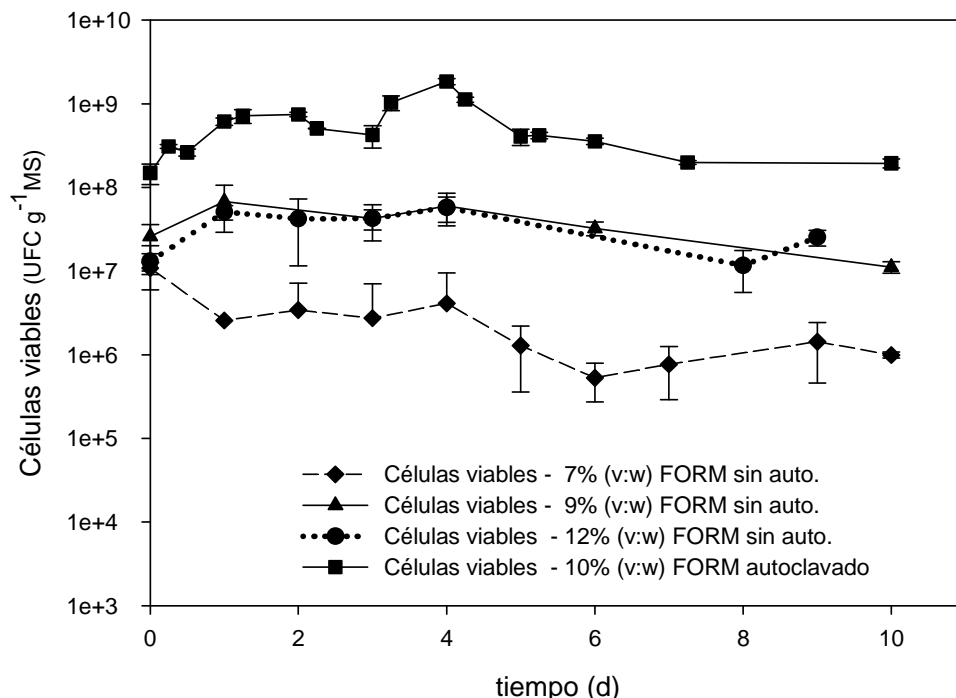


Figura 6.7 Variación del recuento de células viables, usando diferentes porcentajes de inóculo en FORM sin esterilizar y comparada con la FORM esterilizada.

Al igual que en células viables, las esporas también decrecen cuando se emplea un inóculo del 7% (v/p) como se observa en la Figura 6.8, obteniendo valores de población más altos cuando se utiliza un inóculo de 9 y 12% (v/p). Con la FORM esterilizada, el comportamiento de Bt es distinto: como ya se ha comentado, en las primeras horas decrece para luego a los tres días alcanzar un exponente 8 y mantenerse constante. La estabilización del número de esporas es común en los 4 perfiles presentados en la Figura 6.8. El mayor número de esporas en condiciones no estériles lo presenta el experimento realizado con el 12% de inóculo inicial, quedando ligeramente sobre el  $1E+7$  UFC  $g^{-1}$  MS.

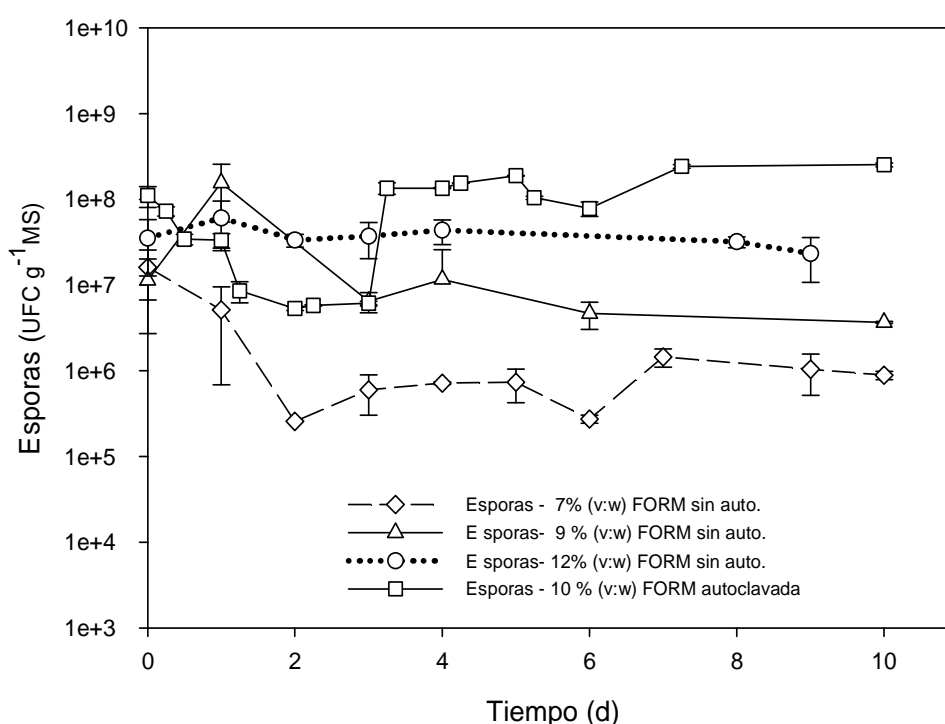
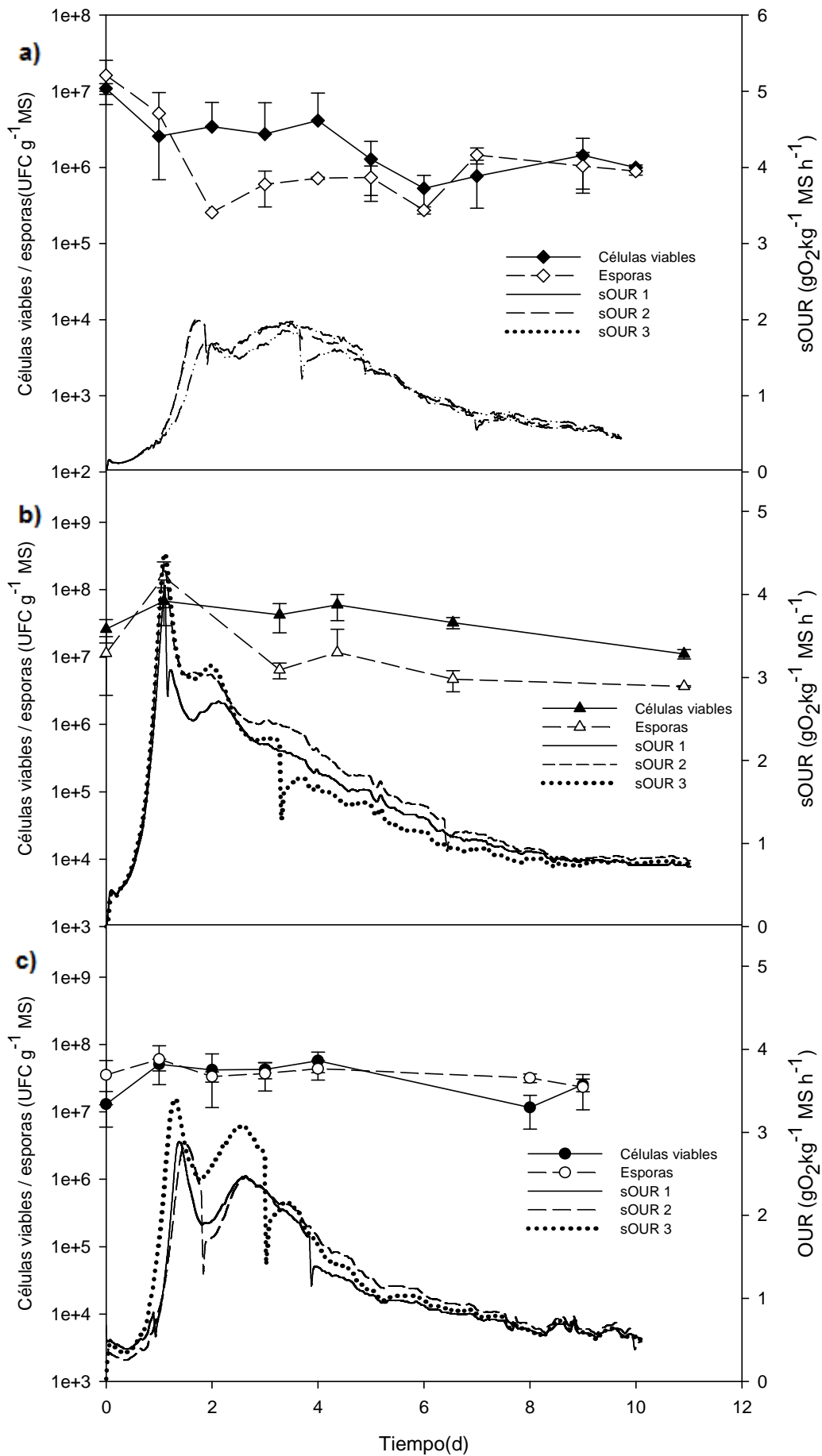


Figura 6.8 Variación del recuento de esporas, usando diferentes porcentajes de inóculo en FORM sin esterilizar y comparada con la FORM esterilizada.

En la Figura 6.9 se presentan los perfiles de seguimiento de sOUR y el seguimiento de Bt mediante células viables y esporas con diferentes porcentajes de inóculo inicial. En la Figura 6.9 (d) se observan triplicados de sOUR en FORM sin esterilizar y sin inóculo como control, datos que se recogen del primer apartado con la finalidad de comparar los resultados obtenidos al inocular con diferente porcentaje de inóculo. Las Figura 6.9 (a, b y c), corresponden a los diferentes porcentajes de inóculo (7, 9 y 12% v/p) respectivamente.





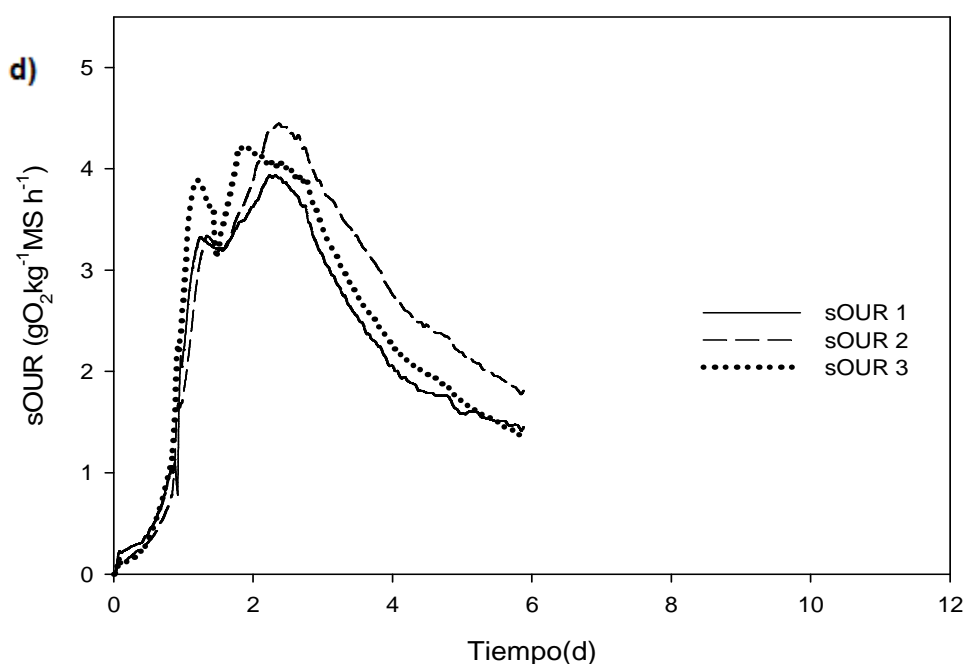


Figura 6.9 Perfiles de seguimiento de sOUR en FORM con 7, 9 y 12% de inóculo de Bt (a, b y c) y control (d) respectivamente.

Como se observa en la (Figura 6.9 b), con un inóculo de 9%, la cantidad de células viables se incrementa 3 veces su valor inicial ( $6.8E+07$  UFC g<sup>-1</sup>MS) a las 24 h, justo cuando la velocidad de consumo de oxígeno llega al máximo ( $4.3 \pm 0.2$  gO<sub>2</sub> kg<sup>-1</sup>MS h<sup>-1</sup>), para descender al tercer día corroborándose con el descenso de la velocidad de consumo de oxígeno. Con inóculo de 12% (Figura 6.9 c), a los 4 días, Bt sigue creciendo y llega a incrementarse 5 veces su valor respecto el valor inicial). Es interesante observar en la Figura 6.9 (b) como se produce un pico agudo de actividad en la FORM inoculada con Bt si se compara con la FORM original (Figura 6.9 d) coincidiendo con el aumento del número de colonias viables. Con el 7% de inóculo este pico es muy pequeño y podría estar relacionado de alguna forma con el descenso de células de Bt observado. En este caso, en la Figura 6.9 (a) se puede observar que el perfil de sOUR presenta valores más bajos, lo que podría demostrar la presencia de menor cantidad de materia orgánica fácilmente biodegradable para Bt en competencia con el resto de población microbiana.

Ante los resultados presentados en la Figura 6.9 se puede concluir que es necesaria una cantidad mínima de inóculo para conseguir el crecimiento de Bt en FORM no estéril.

### Evaluación de la actividad de la proteasa con FORM esterilizada y sin esterilizar

Como se ha comentado anteriormente, se ha apuntado que la actividad de proteasa se podría utilizar como medida del crecimiento de Bt. En esta investigación se evaluó la actividad de proteasa con la finalidad de compararla con los datos presentados por Abraham y col. (2014) y con los datos obtenidos al trabajar con residuo de soja, descritos en el Capítulo 4. Así pues, la actividad de proteasa fue evaluada con FORM esterilizada y con FORM sin esterilizar, ambas con la misma cantidad de inóculo 10% (v/p). El método empleado se encuentra detallado en materiales y métodos del Capítulo 3.

En la Tabla 6.5 se presentan los resultados obtenidos con FORM y con residuo de soja en medios esterilizados y no esterilizados.

Tabla 6.5 Actividad de proteasa en FORM y en residuo de soja con inóculo de Bt en reactor de 500 mL

Muestreo (d)	Residuos			
	FORM		Residuo de Soja	
	Estéril	No estéril	Estéril	No estéril
	Act. Proteasa (UI g <sup>-1</sup> MS)	Act. Proteasa (UI g <sup>-1</sup> MS)	Act. Proteasa (U g <sup>-1</sup> MS)	Act. Proteasa (U g <sup>-1</sup> MS)
3	7661 ± 299	8978 ± 187	1282 ± 32	616 ± 18
6	-	6633 ± 172	1357 ± 18	497 ± 17
9	-	10749 ± 242	-	-
10	24220 ± 1508	-	-	-

Se observa que al tercer día de FES con FORM no estéril la actividad es mayor (8978 U g<sup>-1</sup> MS) en comparación a la FES con FORM estéril (7661 U g<sup>-1</sup> MS) y también la actividad es más elevada cuando se compara con el residuo de soja (estéril y no estéril). Esta mayor actividad de proteasa en el residuo no estéril será seguramente debida a la contribución de los microorganismos nativos de la FORM. Awasthi y col. (2015) encontraron valores de actividad proteasa máximos de aproximadamente 7000 U g<sup>-1</sup>MS (día 10 de proceso) durante el compostaje de FORM. Los resultados en residuos esterilizados indican que hay una mayor actividad de proteasa cuando se usa FORM comparada con el residuo de soja. Este resultado es más directamente comparable y atribuible al sustrato debido a que en el reactor con residuo estéril, la

actividad de proteasa que se genera debería ser debida exclusivamente a Bt, ya que en medio esterilizado no hay otros microorganismos.

Los resultados que se presentan en la Figura 6.10 reflejan los valores de actividad de proteasa en comparación con el seguimiento de población de Bt (células viables y esporas). Los resultados no permiten relacionar directamente la población de Bt con la actividad de este grupo de enzimas ya que, en el caso de la FORM estéril, el valor de actividad proteasa aumenta notablemente a los 10 días de proceso con una población de Bt que ha disminuido respecto al máximo alcanzado. También es el caso de la FORM sin esterilizar, donde el aumento de población inicial no conlleva un aumento de actividad proteasa, ésta aumenta al final. Por lo tanto, la actividad proteasa debe relacionarse, no con la cantidad de Bt presente sino con el estadio de crecimiento, o, en el caso de la FORM estéril, con el aumento del número de esporas (relacionado también con el aumento de la producción de la endotoxina por Brar y col. (2007)). Los resultados si sugieren que Bt incrementa la actividad de proteasa cuando crece en FORM esterilizada con mejores resultados que cuando se emplea con una FORM sin esterilizar, como ya ocurría con el residuo de soja.

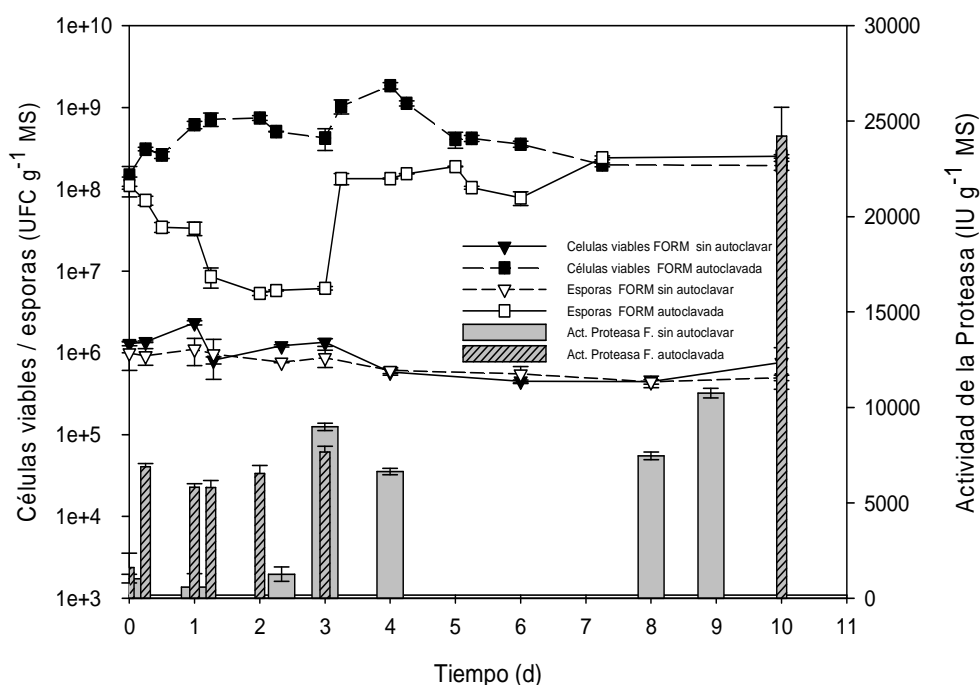


Figura 6.10 Actividad de proteasa en relación a concentración de células viables y esporas (UFC g<sup>-1</sup>MS) en residuo de FORM esterilizada y no esterilizada con inóculo de Bt al 10% (v/p) en reactores de 500 mL en FES.

### 6.3.2 Viabilidad del crecimiento de Bt durante FES en FORM en reactores de 4.5 y 10 L

A partir de los resultados del apartado anterior, donde se observa el crecimiento de Bt en FORM sin esterilizar mediante FES, el siguiente paso fue trabajar a un mayor volumen de sustrato, en reactores de 4.5 y 10 L de capacidad. Este cambio de escala implica un cambio en las condiciones de operación, ya que no será posible trabajar en condiciones controladas de temperatura, y será necesario controlar la aireación para mantener un porcentaje adecuado de oxígeno. Además, la aireación influirá directamente en el perfil de temperatura. Uno de los puntos clave de este apartado es comprobar si la temperatura puede afectar el crecimiento y la esporulación de Bt. Se utilizaron diferentes estrategias de operación con el objetivo de asegurar el crecimiento de Bt durante la FES.

#### Estrategia 1

En primer lugar, se utilizó una estrategia de control del caudal de aire (lazo feedback) que implica la medida del porcentaje de oxígeno en los gases de salida del reactor modificando, si se requiere, el caudal de aire que entra al sistema. El caudal de aire cambia en función de la evolución de las variables del proceso, tomando valores de 100 mL min<sup>-1</sup> o 400 mL min<sup>-1</sup>. Este lazo está descrito en el Capítulo 3.

Como se ha comentado, la temperatura ya no será constante como lo fue en los reactores de 500 mL, ya que ésta evoluciona debido al calor generado por la actividad metabólica de los microorganismos aerobios. Será preciso, por lo tanto, evaluar el comportamiento de Bt en rangos de temperatura termófilos en la matriz de FORM. Cuando se estudió el comportamiento de Bt en una matriz de residuo de soja (Capítulo 4), la temperatura alcanzada en reactores de 10 L fue de 65°C y en esa matriz, Bt logró mantenerse con resultados prometedores, es así que, en este apartado, el interés de primera mano es conocer cómo se comporta Bt en rangos de temperatura termófila y con un controlador basado en la concentración de oxígeno a la salida.

Para facilitar el seguimiento, en la Figura 6.11 se muestra un esquema de los pasos seguidos durante esta primera estrategia. Se siguieron tres reactores de 10 L: dos conteniendo FORM inoculada con Bt (duplicado) y uno más con FORM sin inocular que se usó como control.

El inóculo inicial empleado en esta estrategia contenía  $2.09E+07$  (UFC  $g^{-1}$  MS) crecido en suspensión de FORM esterilizada en fermentación sumergida iniciando con un 10% de inóculo (v/v). La proporción que se usó de FORM se calculó en base a la referencia del medio comercial OXOID® (25g/L). De esta suspensión de FORM se obtuvieron 722 g de FORM con Bt que se distribuyeron en partes iguales entre los reactores 1 y 2 (duplicados) correspondiendo a un 7.6% de FORM más Bt (en peso, base húmeda) a cada reactor, respecto al peso total de la FORM contenida en cada reactor (4727 g).

El porcentaje de Bt que se encuentra en la suspensión de FORM no se pudo estimar al estar mezclado con la FORM esterilizada. Por este motivo, se tomó como concentración inicial de UFC  $g^{-1}$  MS la mezcla del inóculo con la FORM destinada para cada reactor, disminuyendo la población de Bt en una unidad exponencial ( $3.3E+06$  UFC  $g^{-1}$  MS) Células viables y ( $4E+06$  UFC  $g^{-1}$  MS) esporas, desde este punto se estimó el crecimiento de Bt.

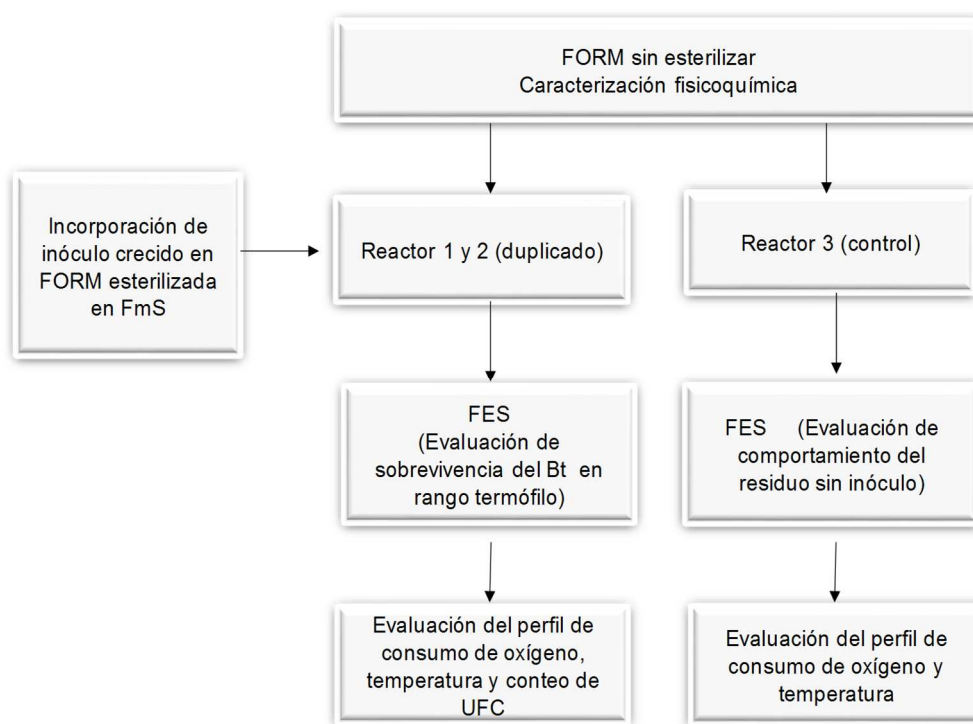


Figura 6.11 Proceso de FES en reactores de 10 L, con inóculo cultivado en FORM esterilizada en medio líquido (Estrategia 1)

En la Tabla 6.6 se presentan los parámetros de seguimiento obtenidos en este experimento y el valor máximo de células viables y esporas a los dos días de proceso reportando un incremento de 2 veces el valor inicial para células viables ( $6E+06$  UFC  $g^{-1}$  MS) y para esporas se reduce a la mitad ( $2E+06$  UFC  $g^{-1}$  MS).

Si se compara con resultados de experimentos anteriores, en los reactores de 500 mL empleando la FORM sin esterilizar, a los dos días de fermentación con 7% y 9% de inóculo (v/p) el incremento de población no llega a duplicar su valor inicial, en cambio con el inóculo de 12% (v/p) se obtenía un incremento de 3 veces su valor inicial en el mismo tiempo. Sin embargo, los mejores resultados a los dos días de fermentación se alcanzan con la FORM esterilizada, donde se supera en 5 veces el valor inicial de Bt. Es importante remarcar que en los reactores de 500 mL se trabaja a temperatura constante de 30°C mientras que en los de 10 L, a los dos días se alcanzó una temperatura cercana a 49°C. Estos resultados demostrarían que este aumento de temperatura registrado a los 2 días no influye negativamente en el crecimiento de Bt.

Tabla 6.6 Valores iniciales y finales de pH, humedad, MO, sOUR, conteo de células viables y esporas en reactor de 10 L de capacidad empleando un control oxígeno en el proceso de FES.

Reactores	R1 y R2 (Media de valores)	R3
Parámetros	inóculo desde inicio	control sin inóculo
Inóculo inicial -CV (UFC $g^{-1}$ MS) producido en suspensión de FORM esterilizada	2.09E+07	-
Humedad inicial (% b.h.)	56.2 ± 1.8	57.6
Humedad final (% b.h.)	51.1 ± 0.5	50.2
Materia Orgánica Inicial (% b.s.)	81.0 ± 1.3	65.6
Materia Orgánica final (% b.s.)	64.2 ± 0.4	56.2
pH inicial	5.1 ± 0.2	5.2
pH final	8.2 ± 0.1	8.0
T de inicio °C	20 ± 1.5	20
T máx °C	69.3 ± 1.7	65.6
Inicial células viables (UFC $g^{-1}$ MS)	3.3E+06 ± 4E+05	-
Máx valor células viables (UFC $g^{-1}$ MS)	6E+06 ± 1E+06	-
Inicial esporas (UFC $g^{-1}$ MS)	4E+06 ± 1E+06	-
Máx valor esporas (UFC $g^{-1}$ MS)	2E+06 ± 1E+06	-
Total inicial (UFC $g^{-1}$ MS)	7E+06 ± 2E+06	-
Total final (UFC $g^{-1}$ MS)	8E+06 ± 3E+06	-
sOURmáx (g O <sub>2</sub> kg <sup>-1</sup> MS h <sup>-1</sup> )	3.8 ± 0.6	2.2
Fase de latencia (h)	34 ± 6	34

b.h.: Base húmeda; b.s.: Base seca

En la Figura 6.12 (a) se presenta la evolución de la temperatura y la velocidad específica de consumo de oxígeno, así como la evolución de las UFC para los reactores 1 y 2 (FORM + Bt). En la Figura 6.12 (b) se presenta el perfil de temperatura y sOUR del reactor control (reactor 3) sin inóculo de Bt. El promedio de la sOUR de los R1 y R2 a los dos días de proceso fue de  $3.0 \text{ g O}_2 \text{ kg}^{-1} \text{ MS h}^{-1}$ , con una fase de latencia de 34 h y la temperatura alcanzó los  $50.26^\circ\text{C}$ . Para el reactor control, sin Bt, la sOUR fue de  $1.78 \text{ gO}_2 \text{ kg}^{-1} \text{ MS h}^{-1}$  a los dos días, inferior a los reactores inoculados. En este intervalo, la temperatura dentro del reactor alcanzó los  $49^\circ\text{C}$ , como se observa en la Figura 6.12 (b).

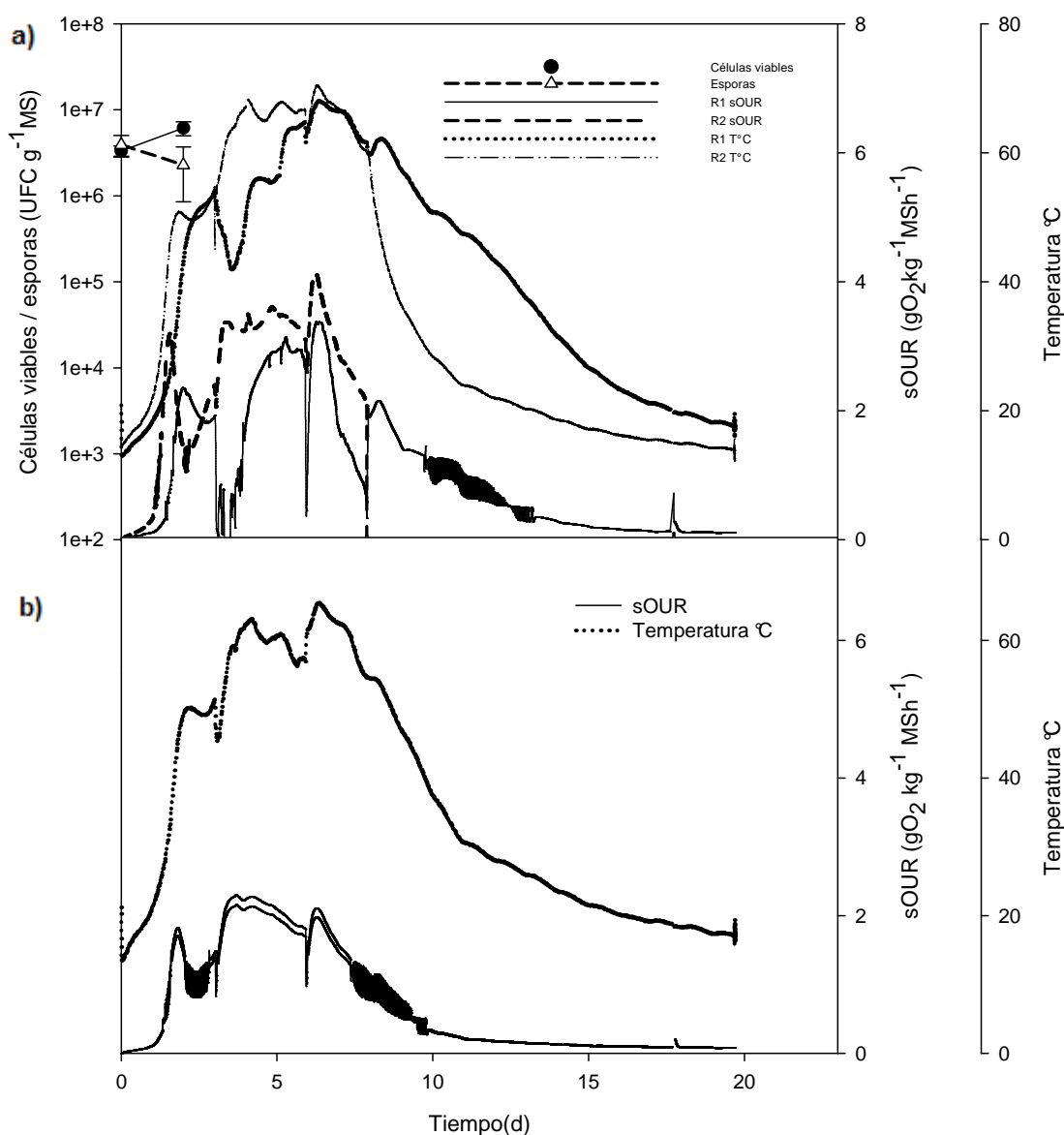


Figura 6.12 a) Perfiles de seguimiento de sOUR, temperatura y conteo de células viables y esporas de Bt de reactor 1 y 2). b) Perfiles de seguimiento de sOUR y temperatura de reactor 3 control sin inóculo de Bt. usando control de oxígeno en todos los reactores.

El segundo muestreo se realizó a los 5 días de proceso. En esta evaluación, donde se realizó el conteo de células viables y esporas por triplicado no se evidenciaron colonias de Bt en los reactores inoculados (R1 y R2). Cuando se abrieron, los reactores presentaban signos de haber sufrido un proceso de anaerobiosis. El bajo valor de concentración de oxígeno (7%) observado a partir de día 2 del proceso con fluctuaciones entre 3 y 5% pudo ser la causa de la desaparición de Bt. Sin embargo, en el reactor control, donde se utilizó la misma estrategia de control de aireación, no se observaron valores tan bajos de oxígeno, por debajo de la consigna utilizada. El proceso se mantuvo hasta los 21 días, en el que se siguió evaluando el consumo de oxígeno de los tres reactores R1, R2 y R3 y la temperatura alcanzó un promedio máximo de 69°C.

Para asegurar un porcentaje de oxígeno adecuado para el desarrollo de la FES se optó por repetir el experimento utilizando un control más preciso, el control por OUR, (ver Capítulo 3). Este control permite trabajar a un caudal de aire más elevado, ajustando los requerimientos del proceso en cada momento. Por lo tanto, con su utilización se pretendía no trabajar en condiciones limitantes de oxígeno a la vez que controlar el exceso de elevada aireación, que podría traer problemas de enfriamiento y secado de la masa en fermentación.

### **Réplica de Estrategia 1: utilizando inóculo crecido en medio comercial y el control por OUR en el sistema de aireación.**

En la réplica de la Estrategia 1, se empleó el control OUR y el inóculo fue producido en medio comercial OXOID® por 20 h con el objetivo de controlar mejor la concentración inicial de Bt en reactor. La concentración de Bt inicial fue de  $8.47E+06$  UFC mL<sup>-1</sup>, aproximadamente un 5% (v/p). No fue posible producir mayor cantidad de inóculo en las condiciones de trabajo. Como se ha comentado, el cambio a control OUR se implementó con la finalidad de mejorar la aireación y evitar condiciones anaerobias dentro de los reactores. Aunque en fase sólida la distribución del oxígeno en la matriz no es equiparable a la de la fermentación líquida, el control por OUR tiene como objetivo garantizar niveles de oxígeno satisfactorios debido a que el sistema va modificando el caudal de aire de acuerdo a los requerimientos del reactor (Puyuelo y col., 2010). Se fijó un caudal inicial de 400 mL min<sup>-1</sup> al inicio del proceso. Este caudal fue duplicado en el primer ciclo, y a partir de ahí el controlador seleccionó el caudal idóneo para los siguientes ciclos de la FES.



En la Tabla 6.7 se presentan valores iniciales y finales obtenidos de los parámetros en estudio (R1 y R2, reactores inoculados con Bt, R3, reactor control, sin Bt).

Tabla 6.7 Valores iniciales y finales de pH, humedad, MO, sOUR, conteo de células viables y esporas en reactor de 10 L de capacidad empleando un control OUR en el proceso de FES

Reactores	R1 y R2 (Media de valores)	R3
Parámetros	Inoculado desde inicio	Control sin inóculo
Inóculo inicial -CV (UFC mL <sup>-1</sup> ) producido en Medio comercial (5% v/p)	8.47E+06	-
Humedad inicial (% b.h.)	63.24 ± 4.41	59.28
Humedad final (% b.h.)	59.84 ± 3.95	50.96
Materia Orgánica inicial (% b.s.)	68.28 ± 1.03	67.4
Materia Orgánica final (% b.s.)	61.87 ± 3.03	44.17
pH inicial	5.44 ± 0.22	5.23
pH final	8.24 ± 0.33	8.01
T° de inicio °C	8.66 ± 1.90	10
T° máx °C	67.56 ± 2.76	69.51
Inicial células viables (UFC g <sup>-1</sup> MS)	4.1E+06 ± 7E+05	-
Final células viables (UFC g <sup>-1</sup> MS)	3.3E+04 ± 41E+03	-
Inicial esporas (UFC g <sup>-1</sup> MS)	1.3E+07 ± 7E+06	-
Final esporas (UFC g <sup>-1</sup> MS)	1.1E+05 ± 4E+04	-
Total inicial (UFC g <sup>-1</sup> MS)	1.7E+07 ± 8E+06	-
Total final (UFC g <sup>-1</sup> MS)	1.4E+05 ± 5E+04	-
sOURmáx (g O <sub>2</sub> kg <sup>-1</sup> MS h <sup>-1</sup> )	Nd	2.96
Fase de latencia (h)	Nd	35.76

b.h.: Base húmeda; b.s.: Base seca.

En la Figura 6.13 a) se presentan los perfiles de seguimiento de población de Bt (media de valores de reactores R1 y R2) y perfil de temperatura de cada reactor. De la misma manera se presentan los datos de seguimiento de temperatura y sOUR en el reactor control (Figura 6.13 b)). Sólo se disponen de datos de los 12 primeros días del proceso, ya que se tuvo un problema con el sistema de adquisición, al mojarse los sensores de oxígeno con condensados procedentes de los reactores inoculados con Bt. A pesar de esto, el seguimiento de células viables y esporas se realizó con muestreos puntuales más allá de los 12 días (0, 5, 8, 11, 13 y 21) como se observa en la Figura 6.13.

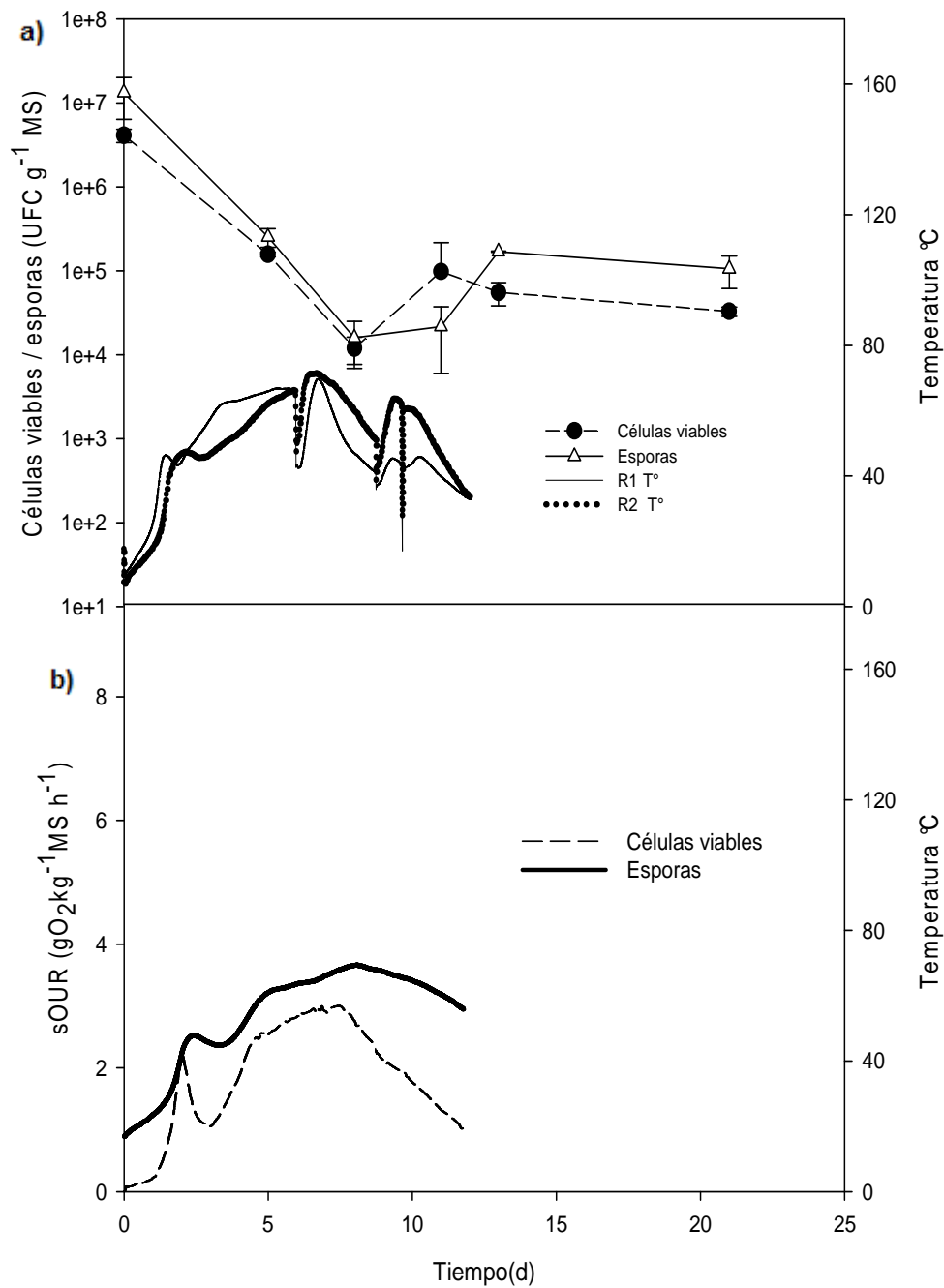


Figura 6.13 a) Perfiles de seguimiento de población de Bt con inóculo inicial en reactores 1 y 2, y temperatura. b) Perfil de seguimiento de temperatura y sOUR de reactor 3 (control sin inóculo).

El perfil de seguimiento de Bt que se observa en la Figura 6.13 sufre un descenso muy marcado desde su incorporación, probablemente sea por causa de las altas temperaturas (superiores a los 60°C) alcanzadas en un período de tiempo prolongado (de 2 a 8 días) con un ligero incremento de población el día 10, para estabilizarse a partir del día 12, cuando la temperatura alcanza los 33°C aproximadamente.

Si se compara con los resultados obtenidos con el residuo de soja (Capítulo 4), en ese caso Bt crece a pesar de alcanzar temperaturas de 63-65°C, en un rango de 3 a 5 días. Es decir, el tiempo en el que los reactores se encuentran a temperaturas mayores de 45°C influye en el crecimiento de Bt. Otro punto que también puede haber influido en el crecimiento de Bt dentro del reactor es el porcentaje de inóculo utilizado (en este caso, del 5%), que podría acentuar la competencia con los microorganismos presentes en cada fase del proceso de fermentación (fases mesofila y termófila).

En cuanto al reactor control, la temperatura siguió una evolución característica del proceso de FES alcanzando temperaturas superiores a 45°C a los dos días de proceso y manteniéndose hasta el final.

## **Estrategia 2**

A partir de los resultados de la estrategia anterior, y viendo los efectos que puede tener la temperatura y la carga bacteriana propia de la FORM en el crecimiento de Bt, se decidió utilizar otra estrategia de inoculación.

Este proceso se llevó a cabo en dos reactores: El primero (R1) inició sin inóculo. La idea fue esperar a inocular a que se alcanzasen rangos termófilos en la matriz y se higienizara de esta forma, eliminando la mayor cantidad posible de microorganismos propios de la FORM. Una vez alcanzado el rango termófilo se esperó a que la matriz alcanzase una temperatura adecuada, sobre los 35°C, para incluir el nuevo inóculo ya en menor porcentaje (sobre un 2% v/p). El segundo reactor (R2) se inoculó desde el inicio del proceso a fin de evaluar y comparar el comportamiento de Bt en rangos termófilos, pero esta vez con mayor inóculo, de un 9.5% v/p, a fin de que Bt pudiera repoblar más rápido la matriz y superar los rangos termófilos del proceso.

Los pasos de esta estrategia se detallan en la Figura 6.14

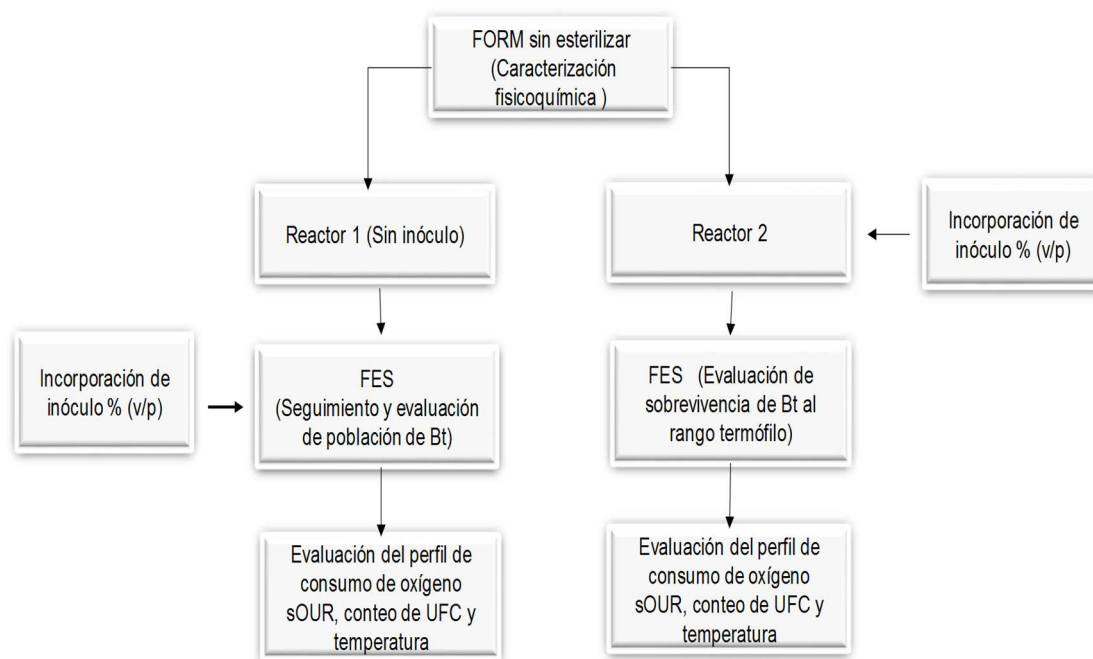


Figura 6.14 Estrategia de inoculación en dos tiempos diferentes, el primero después del rango termófilo y el segundo desde inicio con mayor porcentaje de inóculo (v/p)

Esta estrategia se realizó en reactores de 4.5 L de capacidad por facilitar la utilización de un porcentaje más elevado de inóculo. El primer reactor (R1), para proceso de higienización, inició el proceso con FORM sin inocular con una temperatura inicial de 22.3°C. Al cabo de 3 días la temperatura alcanzó un valor de 58.7°C. Este material se conservó para su inoculación con Bt al cuarto día de proceso (R1' reinoculado). El segundo reactor (R2) se inoculó con Bt desde un inicio del proceso incorporando el 9.5% (v/p). Los resultados de mayor relevancia se detallan en la Tabla 6.8.

El perfil de sOUR y temperatura en el reactor R1 (FORM sin inóculo) se pueden observar en la Figura 6.15, alcanzando una temperatura máxima de 57.8°C. Después de 3 días, la temperatura inicia su descenso, momento en el que se incorporó el inóculo de Bt (sobre los 35°C) a este mismo reactor (2.1%v/p) con la consigna de que al pasar por rangos termófilos la matriz quedara higienizada y no se necesitaría mayor porcentaje de Bt para colonizar y proliferar en un residuo con un contenido de materia orgánica de 67%.

Tabla 6.8 Valores iniciales y finales de parámetros característicos en el proceso de FES aplicando la Estrategia 2.

Parámetros	R1 Proceso de higienización	R2 Inóculo de Bt desde inicio	R1' Inoculado
Inóculo inicial	Sin inóculo	9.5% (v/p)	2.1% (v/p)
Duración de experimento en días	3	13	10
Peso inicial (g)	1212.5	1212.5	979.5
Humedad inicial (% b.h.)	60.67	65.37	45.16
Humedad final (% b.h.)	60.89	60.16	39.26
Materia Orgánica inicial (% b.s.)	78.36	80.61	67.11
Materia Orgánica final (% b.s.)	67.11	64.81	62.85
pH inicial	6.73	7.23	8.22
pH final	8.22	8.14	8.89
T inicial (°C)	22.3	22.1	30.2
T máx (°C)	57.8	40.4	37.3
Inicial células viables (UFC g <sup>-1</sup> MS)	-	2.1E+07 ± 4E+06	1E+06 ± 5E+05
Final células viables (UFC g <sup>-1</sup> MS)	-	4E+06 ± 1E+06	4E+05 ± 1E+05
Inicial esporas (UFC g <sup>-1</sup> MS)	-	1.3E+07 ± 6E+06	1E+06 ± 1E+06
Final esporas (UFC g <sup>-1</sup> MS)	-	4E+06 ± 1E+06	5E+05 ± 4E+05
Total inicial (UFC g <sup>-1</sup> MS)	-	3E+07 ± 1E+07	2E+06 ± 2E+06
Total final (UFC g <sup>-1</sup> MS)	-	9E+06 ± 3E+06	1.0E+06 ± 6E+05
sOUR máx (g O <sub>2</sub> kg <sup>-1</sup> SM h <sup>-1</sup> )	4.5	5.9	1.8
Fase de latencia (h)	1.1	2.2	1.5

b.h.: Base húmeda; b.s.: Base seca

En el reactor inoculado (R1') se evaluó el comportamiento de Bt con muestreos puntuales los días (4, 7, 10 y 13). También se continuó con la evaluación de temperatura y sOUR hasta el final del proceso (13 días). Como se observa en la Figura 6.15, el valor inicial de UFC de Bt no se incrementó ni en células viables (1.0E+06 UFC g<sup>-1</sup>MS), ni en esporas (1E+06 UFC g<sup>-1</sup>MS). Probablemente el hecho de que las temperaturas se mantuvieran en rangos termófilos (57.8°C) un período corto, 24h aproximadamente, no consiguió reducir suficientemente la carga bacteriana de la matriz de FORM, y por lo tanto, seguramente la competencia con Bt se mantuvo presente a lo largo del proceso después de la inoculación. En la Estrategia 1, usando control OUR en reactores de 10 L, las temperaturas termófilas se mantuvieron durante un período de 8 a 10 días. El hecho de haber trabajado con diferente cantidad de material (reactores de 4.5 L) seguramente haya influido en el tiempo de esta fase. Por lo tanto, probablemente se requiera trabajar con un mayor volumen para conseguir dichos rangos y poder higienizar la matriz antes de su inoculación con Bt. Algunos autores consideran que el rango óptimo para higienizar un residuo se encuentra entre

52 y 65°C, otros indican rangos más amplios entre 45 y 65°C y para residuos específicos rangos superiores entre 65 y 70°C (Elías, 2005).

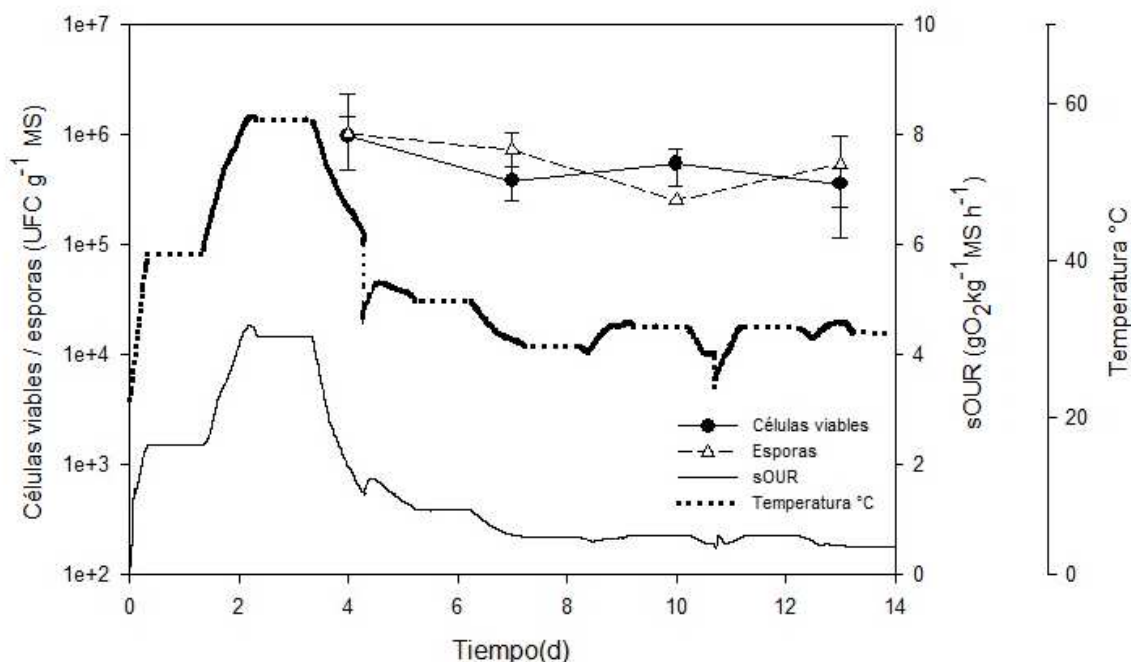


Figura 6.15 Perfil de evolución de la población de Bt, velocidad de consumo de oxígeno y temperatura del reactor R1 (Estrategia 2)

Por lo expuesto anteriormente, se decidió repetir la Estrategia 2 en reactores de 10 L de capacidad utilizando por tanto un mayor volumen de FORM.

Por otro lado, en la Figura 6.16 se presenta el perfil de crecimiento obtenido en el reactor R2 con inóculo de Bt desde el inicio de proceso. Bt incrementa población a las 24 y 48 horas respecto al inóculo inicial ( $2.1E+07$  UFC g<sup>-1</sup>MS) para luego mantenerse en el tiempo con una población muy homogénea. Este crecimiento a inicios de proceso se entendería que fue posible ya que los microorganismos propios de la FORM probablemente se encontraban en una fase de latencia (adaptación) y que al incorporar un 9.5% de inóculo (v/p) Bt tuvo la oportunidad de dominar la matriz e iniciar su crecimiento. La evolución de la temperatura también se muestra en la Figura 6.16. El proceso se mantiene a temperaturas mesófilas por 13 días, siendo 40.4°C la temperatura máxima alcanzada. Este comportamiento de la temperatura ha sido debido al control de aireación utilizado (OUR) que, con los valores elevados de sOUR registrados ha mantenido el caudal de aire a valores elevados también propiciando el enfriamiento de la masa. Este hecho podría haber también influido positivamente en el crecimiento de Bt.

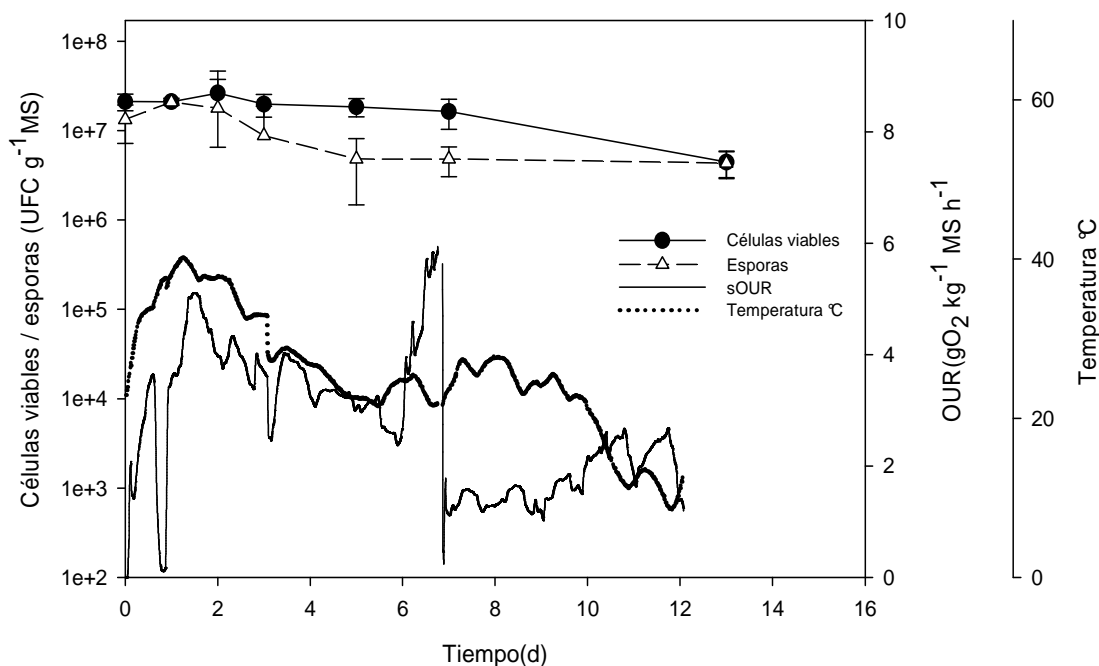


Figura 6.16 Perfil de evolución de la población de Bt en UFC, velocidad de consumo de oxígeno y temperatura del reactor 2 inicialmente inoculado con Bt (estrategia 2)

### Réplica de la Estrategia 2 trabajando en reactores de 10 L de capacidad y con dos cepas de Bt (*Bt kurstaki* y *Bt israelensis*)

La Estrategia 2 se volvió a repetir en reactores de 10 L de capacidad para asegurar tener etapas termófilas de duración más larga. En esta estrategia se trabajó con porcentajes menores al 5% (v/p) de inóculo, debido a que no se contó con un fermentador líquido para obtener inóculos homogéneos para todo el residuo en estudio (aproximadamente 5 kg de residuo por experimento). La preparación del inóculo se realizó mediante fermentación sumergida con medio comercial, en tres tiempos, al final de cada fermentación se unificó toda la cantidad de inóculo obtenido y se incorporó a reactor. Controlar la cantidad inicial de inóculo para poder hacer una réplica con precisión se tornó un tanto complicado. Por este motivo se decidió emplear porcentajes menores al 5% (v/p), ya que de esta forma era más viable trabajar con inóculos puros crecidos en medio comercial. Se evaluó en este caso el comportamiento de *Bt kurstaki* y *Bt israelensis*, ambos de la misma familia de *bacillus* pero con patogenicidades diferentes, el primero orientado al control de lepidópteros y el segundo al control de dípteros (CECT, 2014). Se trabajó con 4 reactores, los dos primeros, R1 y R2, corresponden a la incorporación de *Bt kurstaki*. Los otros dos, R4 y R5 son los reactores donde se incorporó el *Bt israelensis*. Las inoculaciones en cada

par de reactores se realizaron en tiempos diferentes, replicando el esquema de la Estrategia 2 descrita en la Figura 6.14

### Replicando la Estrategia 2: Bt kurstaki

Con la variedad *kurstaki* se ha desarrollado la mayor parte de los experimentos de esta tesis, y en la búsqueda de la mejor manera para su crecimiento y proliferación en FES se replicó la Estrategia 2 de la siguiente manera: se inició el estudio con el reactor R1 con FORM y sin inóculo (reactor de higienización de FORM) para ser inoculado con cepas de Bt después de 15 días de fermentación e higienización. El inóculo de Bt permaneció 15 días en R1'. En dicho reactor Bt incremento su población durante los 15 días que estuvo en fermentación. Después de ello el material producto de la fermentación con Bt se almacenó en condiciones ambiente (maduración) y se evaluaron las UFC de Bt después de 15 días más. La duración total de este proceso fue de 45 días. El Reactor 2 fue inoculado con Bt desde un inicio de proceso. El material se mantuvo en el reactor durante 28 días almacenándose también posteriormente, como en el caso de R1, en condiciones ambiente para su maduración (duración total de 45 días). En la Tabla 6.9 se presentan los valores iniciales y finales obtenidos para el proceso realizado en los dos reactores.

Tabla 6.9 Parámetros de interés en R1 y R2, réplica de la Estrategia 2 con la variedad *kurstaki*

Parámetros	R1	R2	R1'
	Higienización de FORM	Inoculado desde inicio	Inoculado a los 15 días
Inóculo	sin inóculo	2 % (v/p)	3 % (v/p)
Duración (d)	15	28	15
Peso inicial (g)	3200	3200	2217
% H inicial (% b.h.)	65.16	65.71	40.15
% H final (% b.h.)	54.62	70.14	58.65
% M.O. inicial (% b.s.)	75.87	80.32	42.28
% M.O. final (% b.s.)	72.24	71.97	45.21
pH inicial	5.23	5.27	8.16
pH final	8.15	9.18	8.98
Inicial células viables (UFC g <sup>-1</sup> MS)	0	6E+06 ± 1E+06	2.5E+06 ± 3E+05
Final células viables (UFC g <sup>-1</sup> MS)	0	2.7E+05 ± 2E+04	3E+06 ± 3E+06
Inicial esporas (UFC g <sup>-1</sup> MS)	0	2.4E+06 ± 5E+05	4.3E+06 ± 3E+05
Final esporas (UFC g <sup>-1</sup> MS)	0	3E+06 ± 2E+06	5E+06 ± 1E+06
Total inicial (UFC g <sup>-1</sup> MS)	0	8E+06 ± 2E+06	8E+06 ± 6E+05
Total final (UFC g <sup>-1</sup> MS)	0	4E+06 ± 2E+06	7.5E+06 ± 4E+06
sOUR máx (g O <sub>2</sub> kg <sup>-1</sup> MS h <sup>-1</sup> )	6.0	4.9	5.1
Fase de latencia (h)	11.0	12.1	4.3

b.h.: Base húmeda; b.s.: Base seca



El seguimiento de temperatura y sOUR se realizó hasta los 28 días que duró el proceso de fermentación en reactor y se presenta en la Figura 6.17.

En la Figura 6.17 a) se observa que la máxima temperatura alcanzada en R1 (sin inóculo inicial) fue de 64.63°C. Se puede observar también que rango termófilo se alcanzó a las 24h de iniciado el proceso (61.46°C) y tuvo una duración de 7 días con un promedio de temperatura de  $59 \pm 5^\circ\text{C}$ . Durante el día 6 de proceso se observa un descenso de temperatura brusca que se corresponde con un punto de muestreo. El inóculo de *Bt* crecido en medio comercial se incorporó al reactor a los 15 días de proceso cuando la temperatura era de 30.6°C. Desde ese momento hasta terminar con el proceso (15 días más), la temperatura no se incrementó y se mantuvo alrededor de 25°C. Como se puede observar en la Figura 6.17 a), la tasa de consumo de oxígeno y la temperatura siguen curvas casi paralelas: Cuando hay mayor consumo de oxígeno  $5.98 \text{ (g O}_2 \text{ kg}^{-1}\text{MS h}^{-1}\text{)}$  la temperatura se incrementa, mientras que cuando el consumo de oxígeno es menor, la temperatura baja.

*Bt inóculo de Bt kurstaki* fue incorporado a la matriz higienizada en un 3% (v/p) con una concentración inicial de  $2.5\text{E}+06 \text{ UFC g}^{-1}\text{MS}$  células viables. En la Figura 6.17 a) se observa un incremento de *Bt* de 4 veces su valor después de 13 días con una concentración de  $9\text{E}+06 \text{ UFC g}^{-1}\text{MS}$  de células viables. La evaluación continuó por 15 días más fuera del reactor (condición ambiente) observando una disminución de la población de *Bt*, tanto en células viables ( $3\text{E}+06 \text{ UFC g}^{-1}\text{MS}$ ), como en esporas ( $5\text{E}+06 \text{ UFC g}^{-1}\text{MS}$ ).

En la Figura 6.17 b) se observa el comportamiento de *Bt kurstaki* inoculado desde el inicio de proceso (R2) donde se produce un descenso de población en la toma de muestra del día 6 del proceso, correspondiendo a un 12% menor que el inóculo inicial. En cambio, el número de esporas duplica su valor en el día 6 de proceso. Una explicación a este resultado podrían ser las condiciones no favorables para *Bt* dentro del reactor, como son la existencia de microorganismos propios de la FORM que generan algún tipo de competencia con *Bt* y, evidentemente, el aumento de temperatura hasta valores superiores a los 60°C en el segundo día de proceso y el mantenimiento de ésta en rango termófilo. Después de este descenso inicial, la población de *Bt* se mantiene mientras el material continuó en el reactor, para descender hasta 26°C pasados los 15 días en condiciones ambiente. Por el contrario, el número de esporas presente en el material final (después de los 45 días) es superior a la inicial, con un aumento de 134%.

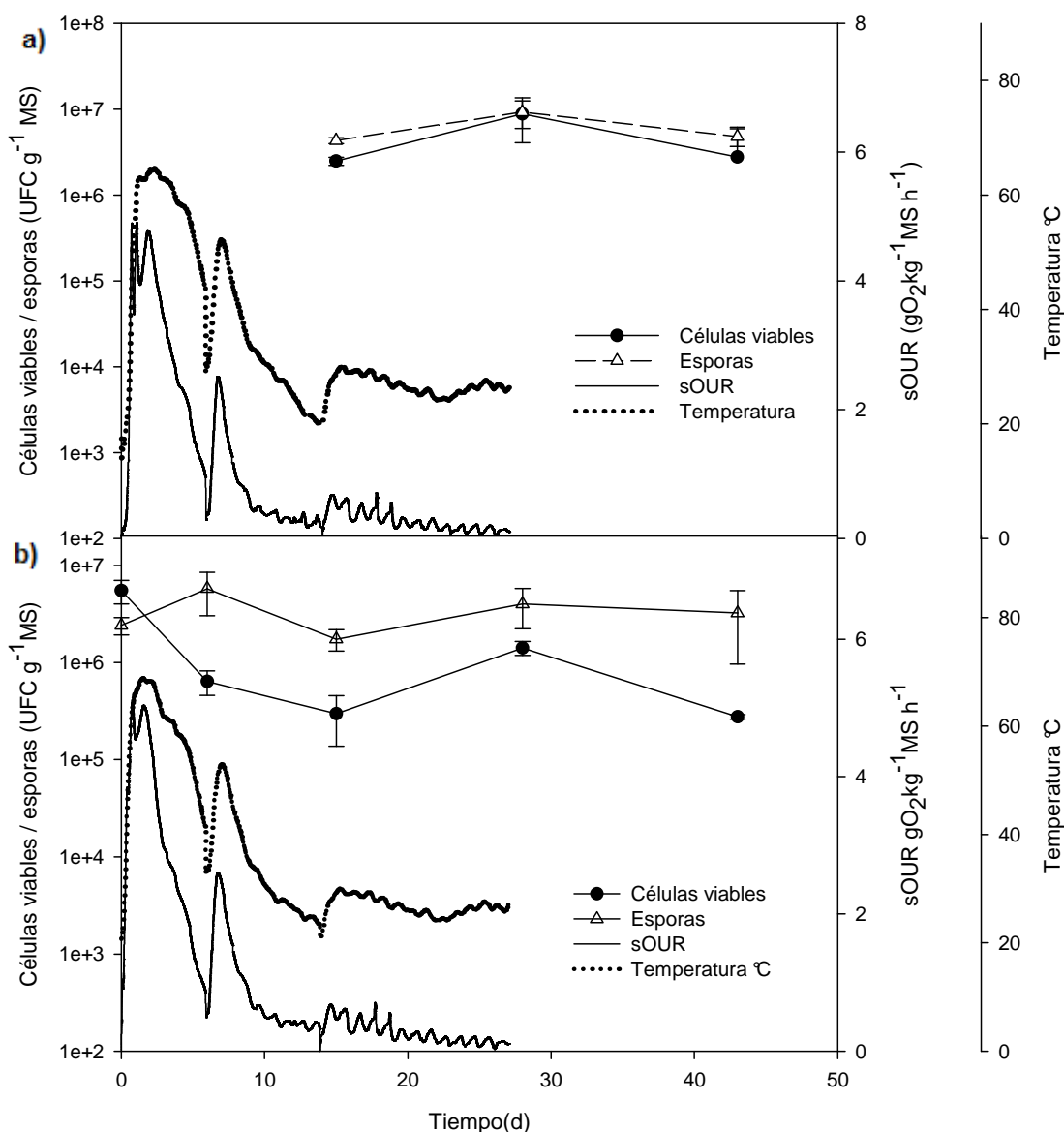


Figura 6.17 Perfiles de sOUR, temperatura y población de *Bt kurstaki* en (a) R1, inoculado después de la etapa termófila (temperaturas superiores a 45°C) y (b) R2 inoculado con *Bt kurstaki* desde inicio de proceso.

### Replicando la Estrategia 2: *Bt israelensis*

Los valores iniciales y finales del proceso de FES con *Bt israelensis* se describen en la Tabla 6.10 donde se muestran los parámetros del seguimiento de la FES y se evalúa el comportamiento de *Bt israelensis* en el residuo de la FORM con la misma Estrategia aplicada a *Bt kurstaki*.

Tabla 6.10 Parámetros de interés en reactores 4 y 5 con *Bt israelensis*

Parámetros	R4	R5	R4'
	Higienización de FORM	Inoculado desde inicio	Inoculado a los 15 días
Inóculo	sin inóculo	2 % (v/p)	3 % (v/p)
Duración Días	15	28	15
Peso (g)	3200	3200	2362
Humedad inicial (% b.h.)	54.62	58.93	38.42
Humedad final (% b.h.)	51.24	54.61	35.37
Materia Orgánica Inicial (% b.s.)	72.81	79.57	44.37
Materia Orgánica final (% b.s.)	61.73	44.36	31.54
pH inicial	5.34	5.45	8.26
pH final	8	8.14	8.35
Inicial células viables (UFC g <sup>-1</sup> MS)	-	5.4E+07 ± 4E+06	3.7E+07 ± 1E+07
Final células viables (UFC g <sup>-1</sup> MS)	-	5.7E+05 ± 5E+04	4.34E+05 ± 8.1E+04
Inicial esporas (UFC g <sup>-1</sup> MS)	-	4.5E+07 ± 5E+06	1.23E+07 ± 1.2E+06
Final esporas (UFC g <sup>-1</sup> MS)	-	6.9E+05 ± 5E+04	9.5E+05 ± 2E+05
Total inicial (UFC g <sup>-1</sup> MS)	-	1E+07 ± 1E+07	5E+07 ± 1E+07
Total final (UFC g <sup>-1</sup> MS)	-	1.3E+06 ± 1E+05	1.3E+06 ± 3E+05
sOUR máx (g O <sub>2</sub> kg <sup>-1</sup> SM h <sup>-1</sup> )	6.25	3.37	6.76
Fase de latencia (h)	12.58	7.6	17.06

b.h.: Base húmeda; b.s.: Base seca

El comportamiento de *Bt israelensis* resulto diferente si se compara con *Bt kurstaki*, a pesar de haber empleado la misma estrategia. El Reactor R4 inició el proceso de FES sin inóculo de *Bt* por 15 días alcanzando temperaturas superiores a los 45°C a partir del primer día de proceso, estas temperaturas en promedio alcanzaron los 59 ± 4°C con una duración de 10 días. En la Figura 6.18 a) se observa el perfil de temperatura que va descendiendo a partir del día 5 del proceso hasta alcanzar valores inferiores a 40°C para incorporar el inóculo de *Bt israelensis* a los 15 días de proceso.

*Bt israelensis* disminuyó en población como se observa Figura 6.18 a) tanto en células viables como en esporas a pesar de que la matriz de FORM se mantuvo en rangos termófilos por 10 días. Los resultados obtenidos sugieren que *Bt israelensis* es menos afín a la matriz de FORM que el *kurstaki* aún empleando la misma estrategia. Después de 15 días en reactor, el material fermentado de FORM con *Bt* se colocó al medio ambiente donde después de 15 días más se evaluó la población de *Bt* obteniéndose un valor muy similar al muestreo anterior.

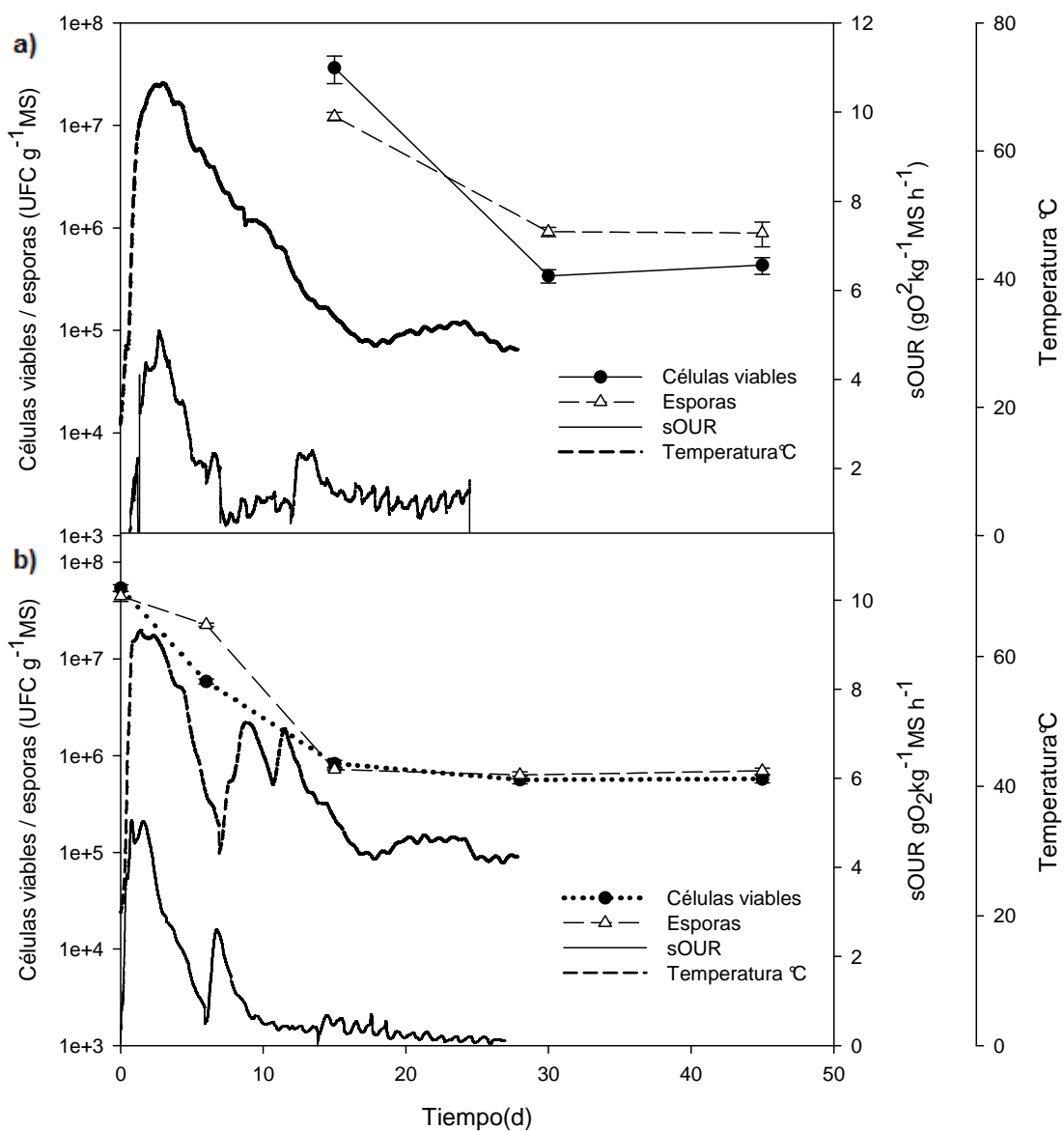


Figura 6.18 Perfiles de sOUR, temperatura y población de *Bt israelensis* en (a) R4, inoculado después de la etapa termófila (temperaturas superiores a 45°C) y (b) R5 inoculado con *Bt israelensis* desde inicio de proceso.

En la Figura 6.18 b) se observa el comportamiento de *Bt israelensis* inoculado desde el inicio del proceso, en FORM fresca. El seguimiento de *Bt* se realizó desde la incorporación del inóculo, obteniéndose el mismo resultado que en el reactor R4', un claro descenso de la población de *Bt*. La población de *Bt* decrece tanto en células viables como en número de esporas mientras se mantiene en reactor (28 días). En la maduración posterior, a los 17 días de permanecer al medio ambiente, la población de *Bt* se mantiene en el mismo número que al finalizar la etapa de reactor.

No se logró el crecimiento de *Bt israelensis* ni inoculando en la FORM higienizada (después del proceso termófilo) ni sin higienizar inoculándose al principio del proceso.

Debido a los resultados negativos obtenidos con *Bt israelensis* se decidió continuar la investigación con una tercera estrategia utilizando exclusivamente *Bt kurstaki*. *Bt israelensis* se volverá a utilizar de nuevo en el compostador doméstico, experiencia que se desarrolla en el Capítulo 7 de esta tesis.

### **Estrategia 3: Propagación en reactores de 10 L**

La Estrategia 3 se desarrolló de la siguiente manera:

- Un primer reactor (R1) conteniendo solo FORM, inició el proceso con la finalidad de alcanzar temperaturas mayores a 45°C para higienizar la matriz. A continuación de este proceso, que duró aproximadamente dos semanas, se inoculó la matriz con *Bt* crecido en medio comercial OXOID® en condiciones estériles en un porcentaje 6 a 10% (v/p) realizando el seguimiento de unidades formadoras de colonias, el consumo de oxígeno y temperatura de proceso.
- Un segundo reactor con FORM fresca (R2) se puso también a fermentar aproximadamente dos semanas después del primero (R1), con el objetivo de obtener un material higienizado.
- Después de 7 días de fermentación el contenido del reactor R1 se dividió en dos partes iguales con el objetivo de utilizarlas como inóculo, mezclándose cada una de ellas con una mitad del contenido de R2 (material ya higienizado). Como resultado se obtuvieron dos reactores idénticos inoculados con *Bt* en medio sólido (RA y RB). El esquema de trabajo se presenta en la Figura 6.19.

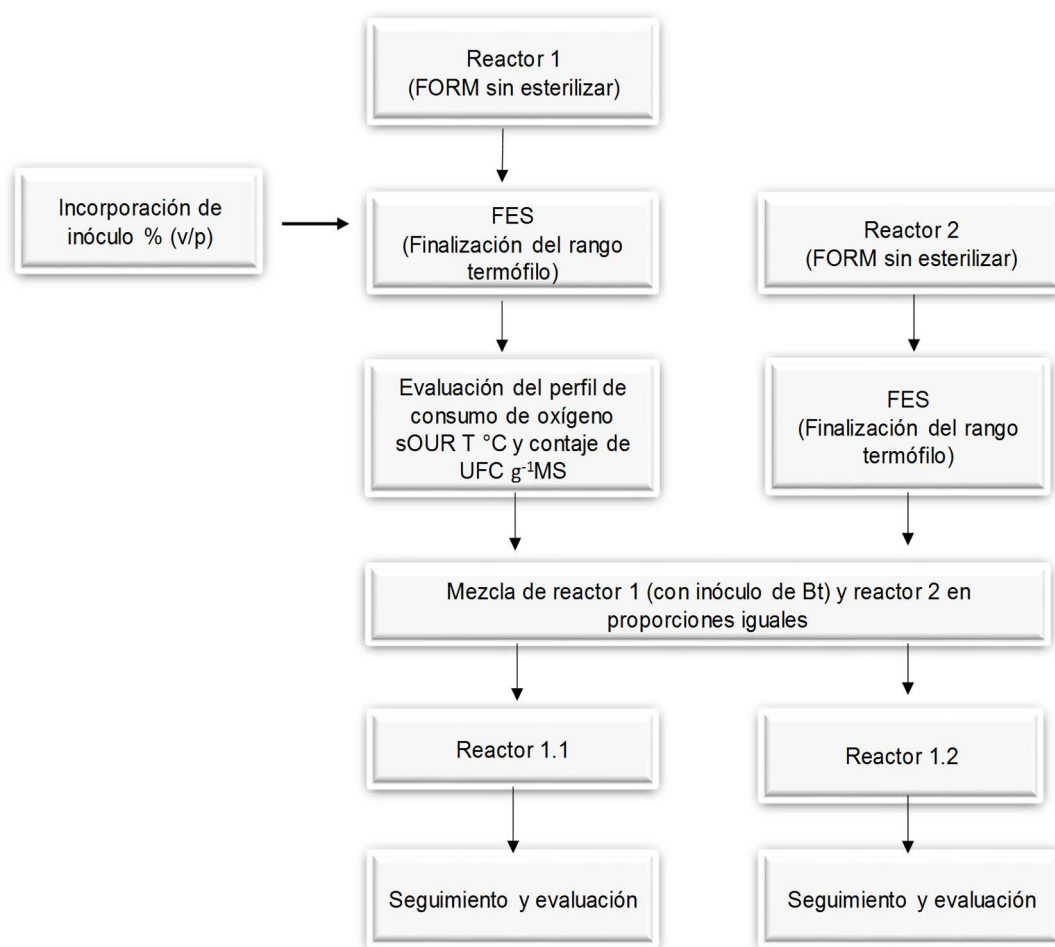


Figura 6.19 Estrategia 3, incorporación de inóculo a R1 tras el rango termófilo y separación de la matriz inoculada en dos nuevos reactores

En la Tabla 6.11 se recogen los valores iniciales y finales de los porcentajes humedad, M.O. y pH tanto de los reactores sin inóculo, como de los inoculados. En esta misma tabla también se detalla la concentración de UFC para células viables y esporas (iniciales, finales y totales), así como los datos obtenidos de consumo de oxígeno de la matriz con y sin inóculo.

En la Estrategia adoptada, el reactor R1, que inicio proceso sin inóculo, alcanzó el rango termófilo en el día 2 de proceso (44.63°C) y el máximo valor el día 4; (58.78°C); se mantuvo en rango termófilo desde el día 2 al día 10. A los 12 días de proceso se incorporó en R1 el inóculo de *Bt* 10% (v/p) (dando lugar a R1'). Pasados 7 días más, el contenido de R1' se mezcló con el de R2 que se encontraba en el día 19 de proceso, ya a temperaturas en el rango mesófilo. El perfil de seguimiento se puede observar en la Figura 6.20. En la primera parte de la Figura, los primeros 19 días, los perfiles de R1

y R2 són idénticos. A partir de este momento, el perfil de temperatura, sOUR y el contejo de colonias corresponden a los reactores RA y RB.

Tabla 6.11 Valores iniciales y finales de parámetros característicos en el proceso de FES aplicando la Estrategia 3

Parámetros	R1	R1'	R2	RA	RB
	FORM a higienizar	inoculado con Bt crecido en medio comercial	FORM a higienizar	1/2 (R1 +R2)	1/2 (R1+R2)
Inóculo	sin inóculo	10 % (v/p)	Sin inóculo		
Duración (días)	12	7	11	28	28
Peso inicial (g)	4000	3000	4000	2885	2885
H inicial (% b.h)	60.65	67.42	62.15	63.21	62.68
H final (% b.h)	57.88	61.65	58.69	59.43	60.17
M.O. inicial (% b.s)	79.13	75.69	75.13	69.35	67.38
M.O. final (% b.s)	75.78	69.9	71.89	62.81	61.16
pH inicial	5.76	8.29	5.74	8	8.1
pH final	8.86	8.45	8.12	8.94	8.95
Inicial células viables (UFC g <sup>-1</sup> MS)	--	2.34E+07 ± 7.4E+05	-	5.4E+05 ± 3E+04	1.9E+05 ± 3E+04
Final células viables (UFC g <sup>-1</sup> MS)	-	3.37E+06 ± 4.2E+04	-	8.5E+05 ± 9E+04	8E+05 ± 1E+05
Inicial esporas (UFC g <sup>-1</sup> MS)	-	1.89E+06 ± 7.4E+04	-	5E+05±1E+04	1.47E+05±6.4E+03
Final esporas (UFC g <sup>-1</sup> MS)	-	1E+06 ± 2E+05	-	1.6E+06±6.4E+04	2.1E+06 ± 3E+05
Total inicial (UFC g <sup>-1</sup> MS)	-	2.53E+07 ± 8.2E+05	-	1.1E+06 ± 1E+05	3.4E+05 ± 3.4E+04
Total final (UFC g <sup>-1</sup> MS)	-	4.4E+06 ± 2E+05	-	2.5E+06 ± 2E+05	2.9E+06 ± 4E+05
sOUR máx (g O <sub>2</sub> kg <sup>-1</sup> M h <sup>-1</sup> )	2.68	1.68	4.92	1.82	1.98
Fase de latencia (h)	17.25	2.42	26.83	1.18	4.25

b.h.: Base húmeda; b.s: Base seca

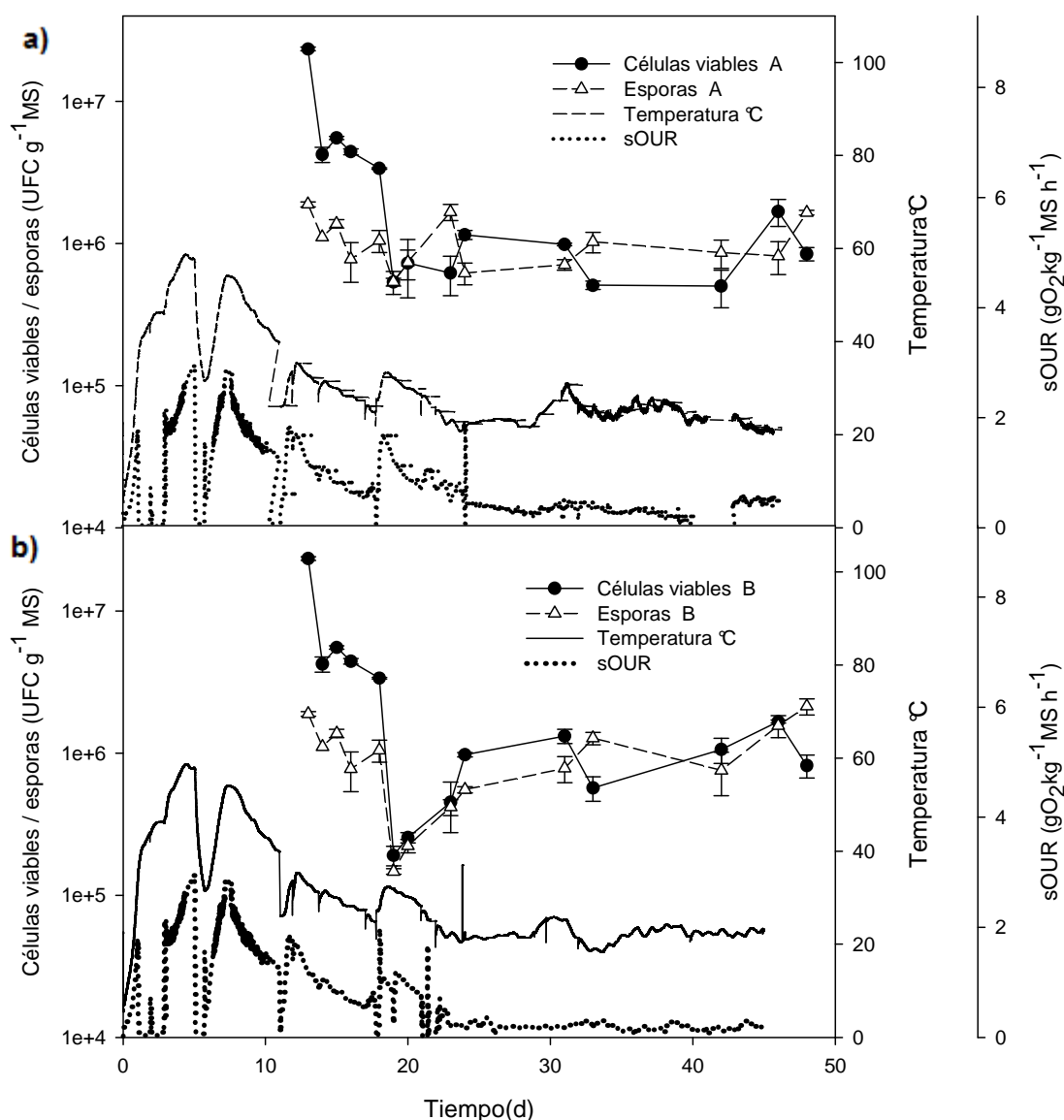


Figura 6.20 Perfil de temperatura y sOUR de todo el proceso de fermentación de la estrategia 3. Incluye proceso de higienización, incorporación de inóculo de Bt, mezcla y separación en a) RA y b) RB

Como se puede observar en la Figura 6.20, después de la puesta en marcha de los reactores RA y RB la temperatura se incrementó ligeramente, pero no llegó a rangos termófilos, quedándose en rangos mesófilos y favoreciendo de este modo el crecimiento de Bt. Aunque en principio los reactores fueron idénticos en cuanto a composición, presentan algunas diferencias en algunos de los parámetros analizados como se observa en la Tabla 6.11. Además, en el reactor RB, el crecimiento de Bt sigue una tendencia exponencial en comparación al reactor RA, donde la población de Bt aumenta menos. Sin embargo, ambos logran incrementar su población



aproximadamente en un orden de magnitud al día 4 de proceso (desde la puesta en marcha de RAy RB).

Con los resultados satisfactorios de los reactores RB y RA, se decidió realizar una réplica de estrategia, pero implementando un paso más en el proceso: esta vez se realizarían volteos periódicos a la matriz una vez incorporado el inóculo con el objetivo de homogeneizar el material y conseguir condiciones más uniformes de humedad y distribución de Bt.

### **Réplica de la Estrategia 3 realizando volteos periodicos del material**

La diferencia de esta réplica con la Estrategia 3 inicial son solo los volteos periódicos de la matriz con inóculo de Bt.

El reactor R4 inició su proceso de higienización por 12 días, después de ello se incorporó el inóculo de Bt al 10% (v/p). Un segundo reactor, R5 se puso a higienizar una semana después de R4. Así se consigue tener a R4' con Bt y al reactor R5 higienizado. La mezcla de ambos (en el día 19 de proceso) generó dos reactores iguales RC y RD, ambos reactores comparten mitad y mitad la FORM higienizada con Bt. En ambos reactores la homogenización se realizó dos veces por día los 2 primeros días (20 y 21), una vez al día durante los siguientes días (23, 27 y 30) y finalmente 1 vez en los días 32, 41, 43 y 48.

El resultado del seguimiento de la población de Bt, de cada reactor se presenta en la Tabla 6.12 donde también se recogen los parámetros iniciales y finales del proceso.

Tabla 6.12 Valores iniciales y finales de parámetros característicos en el proceso de FES aplicando la Estrategia 3 con volteos periódicos del material

	R4	R4'	R5	RC	RD
	FORM a higienizar	inoculado con Bt, crecido en medio comercial	FORM a higienizar	1/2 ( R4+R5)	1/2 (R4+R5)
Inóculo	sin inóculo	10 % (v/p)	Sin inóculo		
Duración (días)	12	6	11	28	28
Peso inicial (g)	3800	3000	4000	3067	3067
H inicial (% b.h)	67.42	65.47	63.13	66.58	66.34
H final (% b.h)	64.23	62.14	60.46	62.57	62.82
M.O. inicial (% b.s)	72.92	78.45	76.65	70.52	70.34
M.O. final (% b.s)	68.13	72.03	73.12	63.82	64.27
pH inicial	5.38	8.22	5.53	8.24	8.32
pH final	8.16	8.36	8.23	8.83	8.45
Inicial células viables (UFC g <sup>-1</sup> MS)	-	6E+06 ± 1E+06	-	7.8E+05 ± 8E+04	1.1E+06 ± 3E+05
Final células viables (UFC g <sup>-1</sup> MS)	-	3.8E+06 ± 8E+05	-	1.7E+07 ± 3E+06	2.2E+07 ± 6E+06
Inicial esporas (UFC g <sup>-1</sup> MS)	-	5E+06 ± 3E+06	-	1.5E+06 ± 3E+05	1.42E+06 ± 4.5E+04
Final esporas (UFC g <sup>-1</sup> MS)	-	3.52E+06 ± 4.9E+04	-	1.3E+07 ± 2E+06	2.1E+07 ± 2E+06
Total inicial (UFC g <sup>-1</sup> MS)	-	1.1E+07 ± 1E+06	-	2.3E+06 ± 3E+05	2.5E+06 ± 3E+05
Total final (UFC g <sup>-1</sup> MS)	-	7.4E+06 ± 8E+05	-	3.0E+07 ± 5E+06	4.3E+07 ± 8E+06
sOUR máx (g O <sub>2</sub> kg <sup>-1</sup> M h <sup>-1</sup> )	4.9	0.8	6.1	2.5	2.2
Fase de latencia (h)	32.8	6.1	11.4	1.7	3.0

b.h.: Base húmeda; b.s.: Base seca

En el proceso de abrir y mezclar el material, la temperatura se incrementó ligeramente en ambos reactores manteniéndose no obstante por debajo de 30°C. Se verificó la humedad de la matriz que siempre se mantuvo alrededor del 55% para los dos reactores en evaluación. En la Figura 6.21 se presenta los perfiles de seguimiento de temperatura, sOUR y población de Bt para los reactores RC (a) y RD (b).

En ambos reactores se logró incrementar la población inicial de Bt, tanto en número de células viables, como en número de esporas. En el reactor RC (Figura 6.21 a) se lograron incrementos en células viables de 2 y 3 veces su valor respecto al valor inicial

del día cero de mezcla (día 19 de proceso). Los mayores incrementos se reportan el día 41 y 43 de proceso (día 13 y 22 si se cuenta desde el inicio de mezcla de Bt y FORM higienizada). En cuanto a esporas, el mayor incremento se observa el día 43 (12 veces el valor inicial). En el reactor RD se consiguieron mayores incrementos de población de Bt, destacando el de células viables desde el día 32 de proceso hasta el día 48. Las esporas también se incrementan durante el proceso, pero con más altos valores a partir del día 32 y 41 hasta el final (Figura 6.21 b).

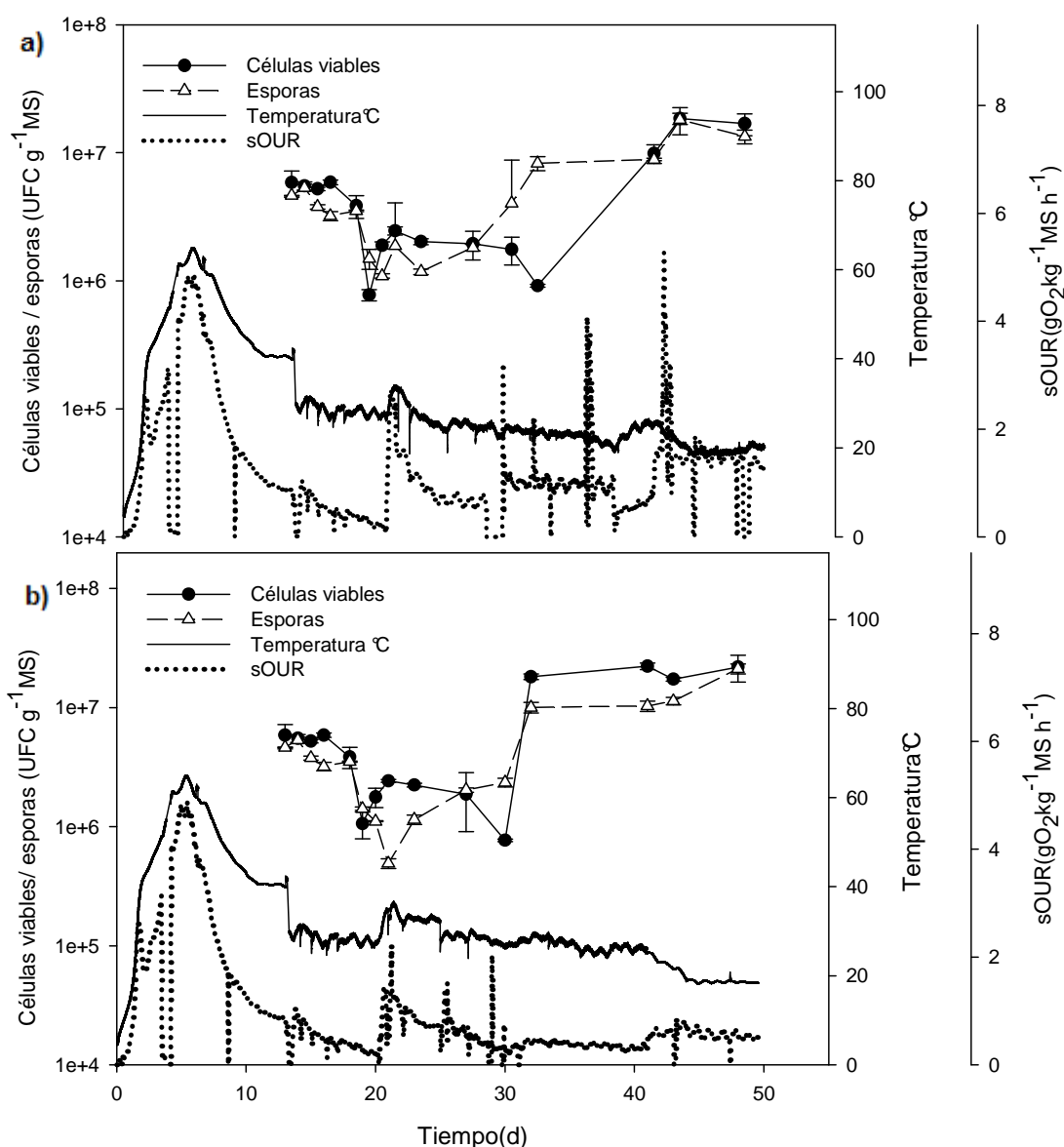


Figura 6.21 Replica de Estrategia 3 (con volteos periódicos). Perfil de temperatura y sOUR de todo el proceso de fermentación incluye proceso de higienización, incorporación de inóculo de Bt, mezcla y separación en a) RC y b) RD.

Cabe destacar que con esta Estrategia de operación se logra incrementar la población de Bt respecto a la inicial, además de doblar la cantidad de material inoculado, que contiene esta población de Bt incrementada: un reactor (R4') con una concentración de células totales de Bt de  $6E+06$  UFC  $g^{-1}$  MS da lugar a dos reactores, RC y RD con una concentración de células viables ( $1.7E+07$  y  $2.2E+07$  UFC  $g^{-1}$  MS) cada uno con la misma cantidad de material que (R4'). Siendo el incremento de la concentración de esporas similar.

### Confirmación de la presencia de cristales paraesporales de Bt en los reactores

En las Figuras de la 6.22, 6.23 y 6.24 se presentan imágenes obtenidas mediante SEM correspondientes a material en los reactores RA, RC y RD, (Estrategia 3) en ellos se puede comparar la presencia de cristales tóxicos producidos por el Bt.

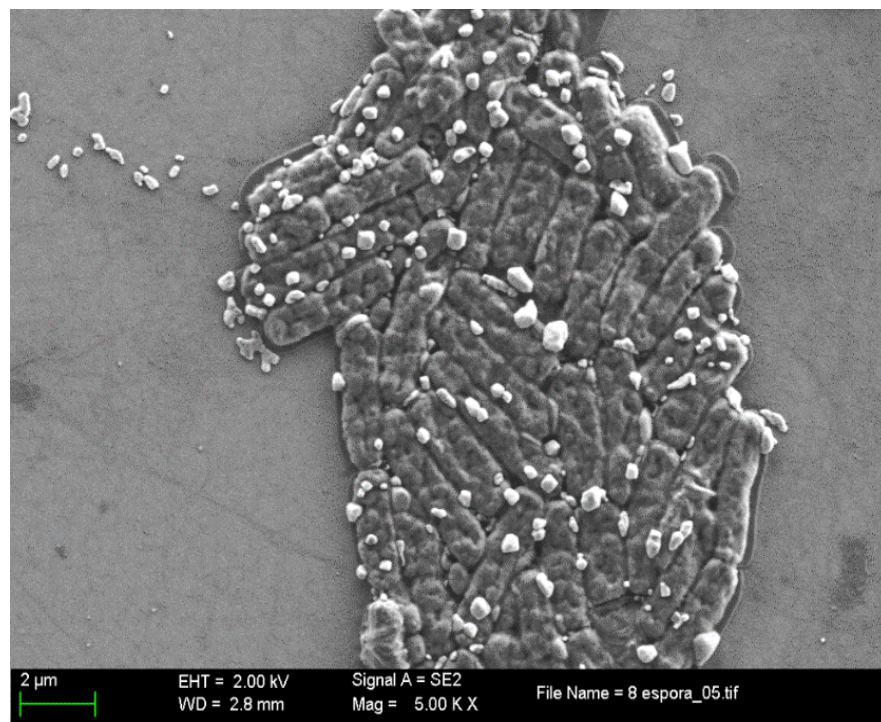


Figura 6.22 Imagen de células y cristales en muestra esporulada (Reactor RC, a las 24 horas de proceso, réplica Estrategia 3)

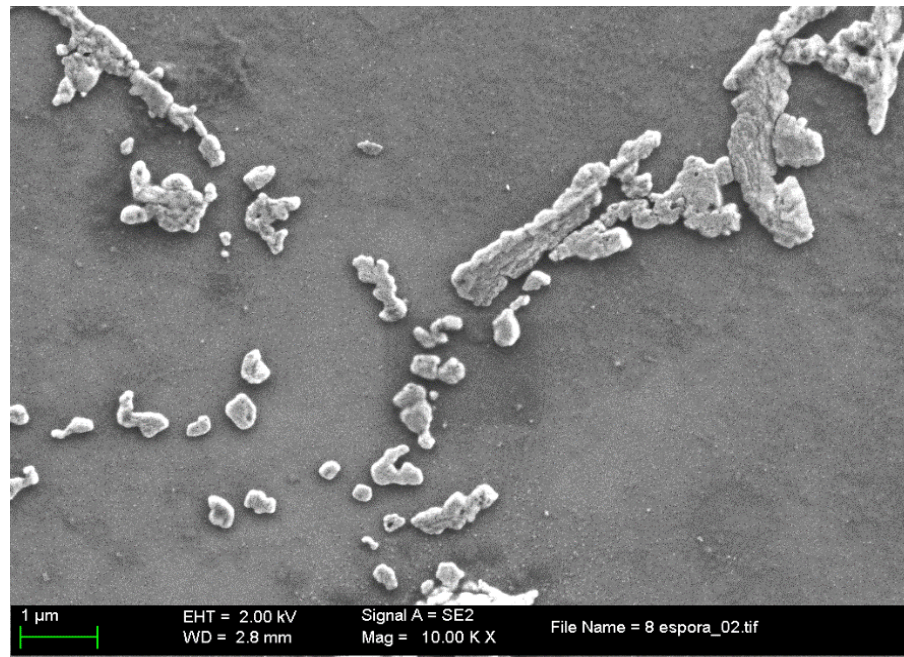


Figura 6.23 Imagen de cristales en muestra esporulada (reactor RC, réplica estrategia 3)



Figura 6.24 Imagen de cristal en una muestra sin esporular a las 24 horas de proceso (reactor RD, réplica estrategia 3)

En resumen, los experimentos realizados en este capítulo muestran que el crecimiento de Bt en FORM no estéril es posible, tanto en fermentación sumergida como en FES. En reactores de 10 L, la aireación se ha demostrado como un factor importante en el crecimiento, así como la temperatura de operación. De las diferentes estrategias de operación probadas, la inoculación de Bt al reactor después de la fase termófila de temperatura se ha demostrado la más adecuada. Se ha logrado la propagación de reactores de 10 L, con crecimiento de Bt en un intento de operación en semicontinuo. Este tipo de operación podría ser un primer paso para la aplicación del proceso a escala industrial.



## CAPÍTULO 7

---

*Los resultados que se presentan en este capítulo están en fase de preparación para envío a revista científica en los próximos tres meses. El título tentativo para éste artículo es: Home composting as a biopesticide producer. Bacillus thuringiensis behaviour and compost quality assurance.*





## 7 PRODUCCIÓN DE COMPOST CON EFECTO BIOPESTICIDA EN UN PROCESO ESTÁNDAR DE COMPOSTAJE DOMÉSTICO

### 7.1 *Introducción*

El auge actual de la demanda de productos de proximidad y la tendencia creciente de prácticas de autoconsumo ha llevado a la aparición de numerosos huertos urbanos y al aprovechamiento de patios y jardines con esta finalidad. La autogestión de residuos generados en las casas y la opción de producir un compost propio se enmarcan claramente en esta tendencia.

El objetivo de este capítulo es estudiar el efecto de la adición de Bt en un compostador casero para obtener un compost de calidad y con propiedades biopesticidas, empleando como sustrato residuos de frutas y hortalizas. Este compost se aplicaría en el propio huerto o en huertos vecinos para contribuir al control de algunas plagas comunes. Otra opción sería realizar un extracto del compost (conocido como té de compost), y utilizarlo directamente para su aplicación en las partes aéreas de las plantas. Para determinar las diferencias que pueda presentar un compost a causa de la presencia de Bt, se pusieron en marcha simultáneamente dos compostadores caseros, uno sin adición de este microorganismo.

### 7.2 *Materiales y Métodos*

#### **Residuo**

El residuo utilizado en los compostadores fue restos de frutas y hortalizas procedentes de tiendas y mercados situados en la periferia de la UAB, asimilables a restos vegetales de cocina domésticos (de ahora en adelante, FORM verde). Los residuos se trituraron manualmente a un tamaño no superior a 2 cm, para acelerar su transformación. Cada vez que se alimentaron los compostadores se utilizó material fresco, recogido en los días previos a su uso. El estructurante que se usó en la mezcla de FORM verde fue broza (restos de poda) procedente de las áreas verdes de la misma Universidad. Se trituraron a un tamaño aproximado de 2 a 4 cm con una trituradora Modelo Eco 5.5 de 4kw de potencia (TECOINSAEN SL. España). La FORM verde y el estructurante se mezclaron en una relación 2:1 en volumen antes de incorporarlos a los compostadores.

### **Microorganismos**

Se emplearon las cepas de Bt, variedad *israelensis* CECT 5904 (Bti) y variedad *kurstaki* CECT 4497 (Btk), las mismas con las que se ha trabajado en los capítulos anteriores, (5 y 6)

### **Preparación del inóculo**

La preparación del inóculo se inició a partir de una crioperla de Bt incubada a 30°C y a 130 rpm en 100 mL de medio comercial OXOID® durante 20h. El pre-inóculo se añadió después a FORM líquida en un porcentaje del 10% (v/v) dejándolo crecer por 96 horas. La proporción de FORM en el líquido (112.5 gr de FORM fresca esterilizada y 1800 mL de agua destilada) se calculó en base a materia seca de la FORM original (40%) y la materia seca del medio comercial. La FORM utilizada en toda la preparación del inóculo procedía de la Planta de Compostaje de Manresa.

Las cepas Btk y Bti crecieron en reactores separados con agitación y suministro continuo de aire a temperatura constante (30°C). Al cabo de las 96 horas se centrifugó la suspensión y se obtuvo un sólido conteniendo Bt y algunos restos de FORM. Este proceso se describe con más detalle en el Capítulo 3. El peso de sólido obtenido fue de aproximadamente 600 g de cada variedad, mezclándose ambas variedades de Bt para ser utilizado como inóculo en un reactor de 50 L de capacidad conteniendo FORM previamente higienizada en el mismo reactor. Este reactor sirvió a su vez como inóculo del compostador doméstico. La incorporación de las dos variedades de Bt pretendía ampliar el efecto pesticida del producto final a lepidópteros y dípteros (en este último caso se pretendía que Bt tuviera ya efecto durante el proceso sobre las larvas de mosca dentro del compostador doméstico).

Se pusieron en marcha dos reactores de 50 L (descritos en el Capítulo 3) conteniendo FORM de la Planta de Compostaje de Manresa ya estructurada. Estos reactores se mantuvieron en operación durante 21 días, alcanzando temperaturas superiores a 45°C. Pasado este tiempo, la FORM higienizada de uno de los reactores (R1), se destinó al compostador doméstico usado como control. El otro reactor (R2) se inoculó con Bt, manteniendo la operación de R2 durante 6 días más para incrementar la población de este microorganismo. El parámetro de control durante el proceso fue la OUR.

### **Puesta en marcha de los compostadores domésticos**

Los compostadores domésticos de 400 L de capacidad Modelo Thermo star de dimensiones 79x79x100 (altura, anchura y profundidad), fueron acondicionados cada uno, con una capa de tierra de 10 cm de altura, otra capa de pallet triturado y 8 kg de compost maduro procedente de la planta de compostaje de Manresa. El objetivo de incorporar la tierra y los pallets fue el de dar porosidad a la base del material a compostar para que circulara bien el aire y por otro lado absorber los lixiviados que se pudieran producir. Al añadir el compost maduro, el objetivo era incorporar un inóculo para favorecer el arranque del proceso con el nuevo material. Aprovechar el compost previamente obtenido para poner en marcha un nuevo compostador (es una práctica habitual).

La puesta en marcha de los dos compostadores se realizó con un intervalo de tiempo de una semana. En primer lugar, se inició el compostador control (sin inóculo) y el segundo compostador 7 días después (FORM verde + inóculo de Bt). Durante los días posteriores a la puesta en marcha (19 días en el caso del compostador control sin Bt y 12 días en el compostador con Bt), se alimentaron ambos compostadores en diversos días con FORM verde más estructurante. Se tomó muestra del material de ambos compostadores (50 g de cada compostador) antes de cada adición de nueva FORM verde para determinar parámetros de seguimiento habituales como el porcentaje de humedad, materia orgánica y pH, además del conteo de colonias de Bt.

En la Figura 7.1 se pueden observar algunas de las etapas y materiales mencionados en la puesta en marcha de los compostadores. En la imagen a) se observan los compostadores armados listos para ser acondicionados; en la imagen b) se observa el llenado de tierra; en la imagen c) sobre la capa de tierra se puede observar los pallets y la capa de compost maduro y finalmente, en la imagen d) se observa el residuo de frutas y hortalizas ya en el compostador mezclado con el estructurante en una proporción de 2:1 en volumen.



Figura 7.1a) Compostadores domésticos de 400 L; b) Preparación de lecho para compostaje rellenando con capas de tierra; c) Incorporación de estructurante y compost en ambos compostadores; d) Incorporación de FORM verde más estructurante

### ***Estabilidad y test de germinación***

Se determinó la estabilidad del material final de ambos compostadores mediante un test de respirometría dinámica (IRD). También se realizó el test de germinación para descartar efectos fitotóxicos del material. Ambos tests se encuentran descritos en el Capítulo 3.

### ***Identificación de Bt***

La identificación de Bt, se ha realizado, además de los métodos de contaje de células en placa y SEM, mediante pirosecuenciación. El protocolo seguido para la extracción de ADN se encuentra descrito en el Capítulo 3 de materiales y métodos. Además, se ha identificado a Bt mediante la prueba 16S rDNA (desde colonias en placa Petri).

### ***Prueba ecotoxicológica de compost con y sin Bt***

Para la realización de la prueba ecotoxicológica, las muestras de compost de ambos compostadores (con y sin inóculo) se enviaron al Centro de Investigación Ecológica y Aplicaciones Forestales (CREAF) de la UAB. En el CREAF se realizó un ensayo de

toxicidad basado en el colémbolo (insecto) edáfico *Folsomia candida*, utilizado como especie modelo representativo de potenciales efectos del compost en suelos, siguiendo la norma estandarizada OECD 232:2009 (Collembolan Reproduction Test in Soil. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 2. Effects on Biotic Systems. Test No. 232. Organisation for Economic Co-operation and Development, París, Francia). Para la realización del test, el compost se mezcló con suelo agrícola alcalino típico de la zona. La cantidad de muestra (compost) se calculó en base a la cantidad de compost que se recomienda usar en la tierra agrícola, 50 t/ha (Moreno y col., 2014). Para trasladar esta dosis a los ensayos de laboratorio, se realizan las siguientes consideraciones y cálculos: se consideran 20 cm de profundidad del suelo (capa arable) y una densidad del suelo de 1.3 t m<sup>-3</sup>. A partir de estos valores se calcula el peso equivalente de suelo para una hectárea arable, 2600 t. La dosis recomendada de compost (Sánchez y col., 2014) y las características de compost y suelo referentes a humedad resultaron en la mezcla de 2.34 g de compost y 117.6 g de suelo para cubrir los 6 replicados de cada ensayo (compost con y sin Bt).

Las muestras fueron evaluadas de la siguiente manera: se humedecieron al 50% de la capacidad de campo (capacidad máxima de retención de humedad después de saturación y 24h de drenaje). Se prepararon 6 réplicas para cada tipo de mezcla. En cada contenedor test se colocaron 30 g de muestra humedecida. En cada uno, se introdujeron 10 individuos (colémbolos) de 10-12 días de edad y se añadió levadura como alimento *adlibitum*. Se realizó, además, un blanco conteniendo sólo suelo. Los contenedores se mantuvieron a 21°C, sin luz, y se airearon dos veces por semana. Se volvió a añadir alimento a los 14 días. Al cabo de 28 días del inicio de la incubación, cada contenedor se inundó con agua para reflotar los adultos iniciales y su descendencia y se hizo una fotografía de la superficie a fin de realizar el recuento de colémbolos mediante un software de tratamiento de imágenes.

### **7.3 Resultados y Discusión**

#### **7.3.1 Puesta en marcha y seguimiento de los compostadores domésticos**

##### **Primera fase: obtención del inóculo de Bt for FES en reactores de 50 L de capacidad**

Como ya se ha comentado, para la obtención del inóculo de Bt en suficiente cantidad para el compostador doméstico, se realizó una FES en un reactor de 50 L, utilizando la Estrategia 3 definida en el capítulo anterior, es decir, inoculando Bt después de la fase

termófila. Para poder comparar la evolución del compostador doméstico con Bt con un control, se realizó el mismo proceso en otro reactor de 50 L, pero sin inocular con Bt. De esta forma se disponía de la misma cantidad de material fermentado (uno con Bt y otro sin) para añadir a los dos compostadores, con el objetivo de que el arranque de ambos se hiciese de forma similar. La fermentación en el reactor R1 duro 21 días, esta matriz ya fermentada pasó al compostador casero que se usó como control. La fermentación en el reactor R2 se mantuvo 28 días (inoculando con Bt a los 21 días), para pasar después al compostador doméstico (compostador con Bt).

En la Tabla 7.1 se presenta un resumen de valores iniciales y finales de los parámetros característicos del proceso de FES obtenidos para los dos reactores de 50 L de capacidad. Se puede observar que la humedad se mantuvo constante, siempre dentro del rango de valores recomendados para el proceso (40-60% humedad) en los dos reactores. El pH inicial de la muestra de ambos reactores fue 5.36 en promedio y el final 8.29. Como era de esperar, se produjo una progresiva alcalinización del medio debido a la pérdida de los ácidos orgánicos y la generación de amoníaco procedente de la descomposición de las proteínas. Ambos reactores alcanzaron valores máximos de temperatura de 69.51 y 70.60°C (R1 y R2 respectivamente), manteniéndose las temperaturas en el rango termófilo durante 7 y 6 días respectivamente, tiempos de proceso que aseguran la higienización del material.

Tabla 7.1 Parámetros iniciales y finales de proceso de FES de FORM en reactores de 50 L para obtener el preinoculo de Bt para el compostador doméstico

Parámetros	R1		R2	
	Reactor de 50 L		Reactor de 50 L	
	Inicial	Final	Inicial	Final
Humedad (% wb *)	54.62	48.82	51.43	50.24
pH	5.24	8.32	5.48	8.26
Temperatura °C	14.24	40.00	17.31	32.19
Temperatura Máx °C	69.51		70.60	
Peso g	20000	12000	20000	12000
Nº de días de permanencia en reactor	21		21	

Tras 21 días de proceso, se procedió a inocular el reactor R2 con las cepas de Bt. La cantidad de inóculo obtenida inicialmente de la fermentación líquida con FORM esterilizada fue de 1200 g en peso húmedo, correspondiendo a la mezcla de *Bt kurstaki* y *Bt israelensis* (suspensión de FORM + Bt a 70% humedad), con una concentración de  $3.2 \times 10^9$  UFC  $g^{-1}$  totales. Este inóculo se mezcló con los 12 kg de FORM higienizada de R2, alcanzando una concentración de colonias viables de  $8.9 \times 10^6$  UFC  $g^{-1}$  MS. Con la inoculación se incrementó la humedad del material de un 50.24% hasta un 61.28%. Esta mezcla permaneció en el reactor (R2) durante 6 días alcanzando una población final de Bt de  $1.3 \times 10^7$  UFC  $g^{-1}$  MS de células viables y  $5.7 \times 10^7$  UFC  $g^{-1}$  MS de esporas.

En la Figura 7.2 se presenta el perfil de consumo de oxígeno para los 6 días de proceso del reactor R2 con inóculo, así como también el de temperatura. Se representan asimismo los valores iniciales y finales, ya comentados, para el recuento de colonias de Bt. Durante este período se observa un incremento de la temperatura alcanzando como máximo  $53^\circ C$ , que se relaciona con el aumento en la sOUR, y que es debido al efecto de mezclar el material y hacer accesible materia orgánica biodegradable que todavía no había sido degradada a los microorganismos (Berthe y col., 2007) (Abraham, 2013). A pesar del aumento de temperatura, se observó un incremento de UFC de Bt, seguramente propiciado por el poco tiempo que la temperatura se mantuvo por encima de los valores reportados como óptimos para el crecimiento de este microorganismo (Caballero y col., 2001).

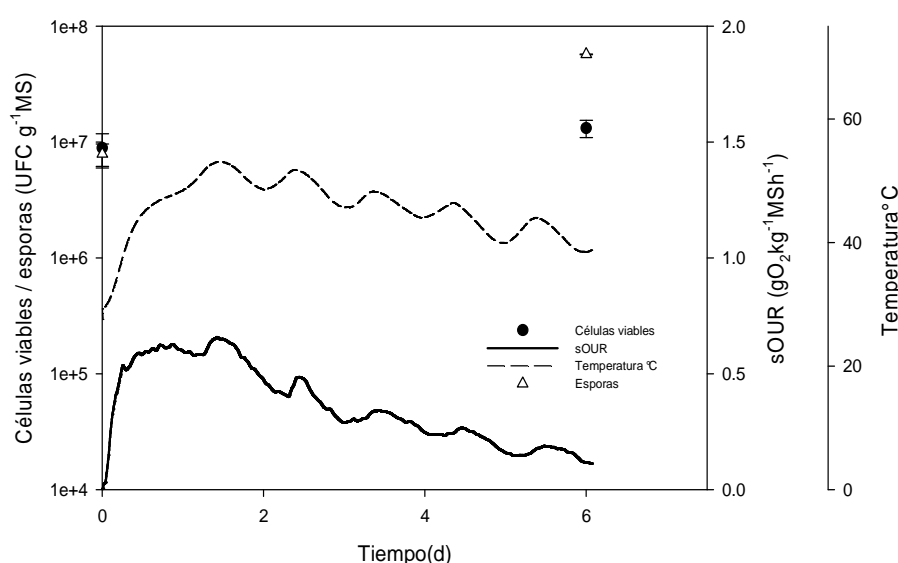


Figura 7.2 Evolución de la temperatura y la sOUR de la FORM inoculada con Bt en reactor de 50 L. Valores iniciales y finales de células viables y esporas



### 7.3.2 Segunda fase: Inoculación y seguimiento de los compostadores domésticos

El primer compostador que se puso en marcha fue el control (sin inóculo de Bt). El material procedente de reactor R1 se adicionó al compostador casero que contenía 20 kg de FORM verde mezclada con 7 kg de estructurante (proporción volumétrica 2:1). Este punto se considera como el día 1 de proceso en el compostador casero o el día 22 del proceso global, considerando la primera etapa en reactor. El compostador se alimentó los días, 25, 29, 34 y 41. Antes de cada alimentación se tomó una muestra para seguir la evolución de la humedad, la materia orgánica y el pH. Los valores de estos parámetros se recogen en la Tabla 7.2. En esta tabla se muestra la duración del proceso total, diferenciando los días que la FORM permaneció en reactor de 50 L, los días que duró la alimentación (19 días) y los días de maduración (193 días). En total, se añadieron al compostador doméstico 59 kg de FORM verde y 23 kg de estructurante.

Tabla 7.2 Parámetros evaluados en el proceso control (reactor y compostador doméstico control) según etapa de proceso

Proceso control (compost estándar)	R1 (21 días)		Alimentación de compostador control sin inóculo (19 días)					Maduración del compost (193 días)		
	Inicial	Final	19					28	79	86
Días muestreo y/o alimentación	0	21	22	25	29	34	41	69	148	234
Humedad (%)	54.62	48.82	48.82	75.39	69.93	56.83	52.77	54.72	38.92	33.44
MO (% b.s.)	78.62	62.73	62.73	65.82	66.21	65.37	67.43	-	58.72	56.45
pH	5.2	8.3	8.3	7.8	8.3	8.5	-	-	8.17	8.42
FORM verde (kg)			20	10	9	10	10			
Estructurante (kg)			7	4	4	4	4			

El compostador doméstico inoculado con Bt se puso en marcha una semana después, con el material procedente de R2 e, igual que el compostador control, con 20 kg de FORM verde y 7 kg de estructurante. Análogamente, en la Tabla 7.3 se presentan los parámetros de seguimiento del proceso de compostaje para los dos períodos, en reactor de 50 L y en compostador doméstico. Se realizaron dos alimentaciones en los

días 34 y 41 del proceso completo, muestreando el compostador antes de cada alimentación. En total se incorporaron al compostador 55 kilogramos de FORM verde y 19 kilogramos de estructurante. Se realizaron un total de 7 muestreos. Los tres primeros se realizaron antes de cada alimentación, mientras los dos últimos corresponden a la maduración del compost, una vez que se dejó de incorporar material nuevo, etapa que tuvo una duración de 193 días.

Un estudio realizado por la Agència de Residus de Catalunya (ARC) en base a datos reales procedentes de 300 familias durante un año, estableció que se generan (de media) 254 g de FORM por persona y día (Agència de Residus de Catalunya, 2014). Con este valor, el aporte medio a los compostadores domésticos corresponde, aproximadamente, a la FORM generada por 12-18 personas (en realidad, podrían ser más pues se ha alimentado solo FORM verde y el valor proporcionado por la ARC correspondía a FORM total). La carga podría simular la que recibe un compostador de una pequeña comunidad.

Tabla 7.3 Parámetros evaluados en el proceso con Bt (reactor y compostador doméstico control) según etapa de proceso

Proceso con Bt incorporado (compost enriquecido)	R2				Alimentación de compostador (12días)			Tiempo de maduración de compost (193 días)					
	Higienización de FORM (21 días)		Incorporación de Bt (6 días)		12			28		79		86	
	Inicial	Final	Inicial	Final									
Días muestreo y/o alimentación	0	21	22	28	29	34	41	60	69	148	234		
Humedad (%)	51.43	50.24	61.28	59.2	59.2	65.7	60.28	57.85	54.57	33.13	31.51		
MO (% b.s.)	75.87	64.78	70.24	68.45	68.45	73.78	n.d.	60.35	n.d.	58.82	n.d.		
Ph	5.5	8.3	8.5	9.0	9.0	8.3	n.d.	8.2	8.2	8.15	8.23		
FORM verde (kg)					20	15	20						
Estructurante (kg)					7	5	7						

n.d.= no determinado

### 7.3.2. Seguimiento de Bt en los compostadores domésticos

El reactor R1 de control se muestreó al inicio del proceso y se descartó la presencia de Bt (células viables y esporas). El seguimiento del crecimiento de Bt en R2 se realizó en los días 29, 34, 41, 60 y 69 de proceso global. En la Figura 7.3 se presentan los perfiles de seguimiento de Bt, tanto de células viables como esporas. Aunque la tendencia que se observa es la disminución de la concentración de Bt, se ha de tener en cuenta que en el compostador doméstico se fue aumentando progresivamente la cantidad de material a compostar. La mayor disminución de población corresponde a los primeros días de operación del compostador (del 29 al 34), pudiéndose atribuir a una aclimatación de Bt al nuevo sustrato y a las nuevas condiciones de proceso. A partir de ese momento, la concentración del microorganismo se mantiene más o menos constante.

En la misma figura se observa el perfil de temperatura desde el inicio del proceso hasta los 21 días (primer proceso en reactor de 50 L), período en el que la matriz se higienizó, de los 21 a los 28 días, período de crecimiento del inóculo de Bt y los 40 días en compostador doméstico.

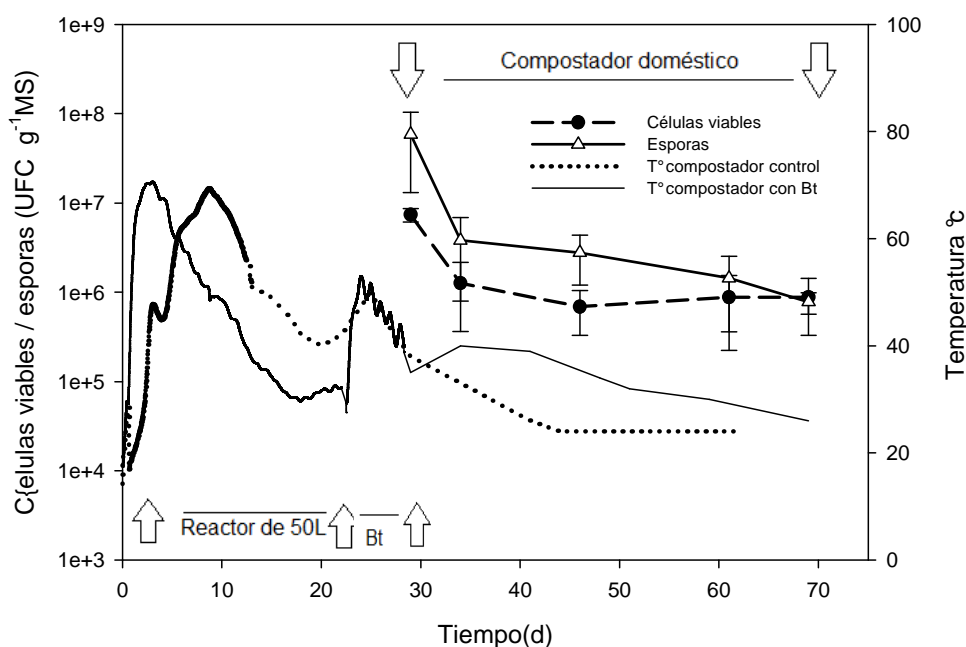


Figura 7.3 Perfil de temperatura en reactores de 50 L y en compostador doméstico control e inoculado. Seguimiento de población de Bt (células viables y esporas) en compostador doméstico inoculado

También se observa en la Figura 7.3 el perfil de temperatura correspondiente primero a R1 y después al compostador control. La evolución de la temperatura en ambos casos es similar, mientras se encuentran en reactor, la única diferencia que se observa es que en R1 se tarda más en alcanzar la temperatura máxima y que R2 muestra un repunte de la temperatura al incorporar el inóculo y mezclar. Este repunte se observa también en el caso del compostador control al incorporar el material de R1, debiéndose también al efecto mezcla y la fracción biodegradable que aún conserva el material al finalizar el período de reactor (Berthe y col., 2007). Ambos compostadores siguieron en evaluación con muestreos puntuales, hasta el día 69 del proceso, después de 28 días sin añadir FORM verde nueva a los compostadores. Este período correspondería a la etapa de maduración del compost.

Contra todo pronóstico, en el muestro que se realizó al compost a los 28 días de maduración (69 de proceso), se observó la aparición de colonias que podrían corresponder a Bt en las muestras del compostador doméstico control (sin inóculo de Bt). En las primeras fases del proceso, hasta el quinto muestreo no se observaron estas colonias en el reactor control. Hasta el momento, esta es la única vez que se había detectado una colonia parecida a Bt en las muestras control. Este hecho, implicaba por una parte, que el reactor control se hubiese contaminado con Bt, o la aparición de otro *Bacillus* de morfología parecida a Bt.

Para comprobar o descartar la presencia de Bt en ambos compostadores se remitieron muestras al laboratorio de Microbiología de la Facultad de Veterinaria de la UAB (se enviaron muestras de tres tiempos diferentes de maduración).

Para la realización de estas evaluaciones se emplearon agares selectivos e incubación en placa mediante diluciones e identificación al microscopio con tinciones. El resultado de estos análisis se recoge en la Tabla 7.4 donde se detalla la población de Bt en UFC g<sup>-1</sup> de compost y también en base a su materia seca. La población de Bt se mantiene durante toda la fase de maduración, quedando en el producto final a exponente 6.

Tabla 7.4 Población de Bt procedente de muestras de compostador doméstico inoculado en tres tiempos diferentes de evaluación (días totales de proceso).

Días	69	148	234
MS (%)	45.43	66.87	68.49
UFC g <sup>-1</sup>	1.25E+06	7.00E+06	2.00E+06
UFC g <sup>-1</sup> MS	2.75E+06	1.05E+07	2.92E+06

Para la muestra de compost del compostador control no se observó presencia de Bt en ninguna de las tres evaluaciones. Estos resultados sugieren entonces la presencia de otro *Bacillus* a partir de un determinado momento del proceso en el compostador control, y posiblemente en el reactor inoculado con Bt. Para estudiar esta posibilidad se realizaron diferentes análisis (pirosecuenciación y análisis 16S rDNA desde colonias en placa Petri).

#### **Análisis microbiológico de las muestras de compostador doméstico con y sin inóculo mediante pirosecuenciación**

Una vez confirmada la presencia de Bt, y debido a la interferencia de otro u otros *Bacillus* en el conteo rutinario de colonias, se decidió buscar otras opciones para poder tener una idea de la cantidad de Bt que contenía el compost. Se realizó una pirosecuenciación de genes (16S ARNr) para bacterias, con la finalidad de conocer el porcentaje de Bt del compost enriquecido con Bt y del resto de *Bacillus*. Este análisis se realizó sobre dos muestras de compost, normal y enriquecido con Bt, a los 79 días de maduración.

En contra de lo esperado, los resultados de la pirosecuenciación no mostraron la presencia de Bt en la muestra de compost enriquecida con este *Bacillus*. Sin embargo, una búsqueda bibliográfica mostró la posibilidad de que Bt hubiese sido identificado como otro *Bacillus*, en concreto, *Bacillus cereus*. Estudios realizados por Chen y Tsen (2002) mencionan que es difícil desarrollar un método molecular fiable para la diferenciación de cepas de *Bacillus thuringiensis* y *Bacillus cereus*. Sus resultados mostraron que no hubo claras diferencias en los sitios de hibridación de

cebadores de 16S rDNA y gyrB genes de *Bacillus cereus* y cepas de *Bacillus thuringiensis*.

Por este motivo, y para asegurar que se había producido este error en la identificación, se procedió a realizar la identificación de las colonias obtenidas en placas de agar nutriente, derivadas de extractos de muestras de ambos compostadores. Estas colonias, previamente identificadas en placa por su morfología, fueron enviadas a la Universidad de León, al área de ácidos nucleicos, donde se aisló el ADN y se procedió a su secuenciación.

Los resultados confirman la existencia de Bt en las muestras del compostador inoculado (muestras triplicadas) y también confirman la presencia de *Bacillus cereus* en ambos compostadores, tanto en el control como en el compostador inoculado. *Bacillus cereus* es un patógeno común de los alimentos (Drobniewski, 1993), y en comparación a Bt, fenotípicamente son muy parecidos, la única característica por la cual se pueden distinguir es por el cristal paraesporal junto a la espora que presenta Bt que es liberado en el momento de la esporulación (Chen y Tsen., 2002).

Trabajar con sustratos complejos como es el caso de la FORM, y obtener la muestra de placa Petri para su identificación bacteriana mediante el ADNr 16S resultó en algunas ocasiones complicado pues algunas placas evaluadas no solo presentaban colonias de Bt puras, si no también otras muy pequeñas. Colonias grandes de Bt podrían haberse solapado con colonias más pequeñas de otras especies y a la hora de extraer el ADN de una sola especie y utilizar primers universales resultó en algunos casos en presencia de otros microorganismos. Sin embargo, se comprobó la presencia de Bt en las muestras de compost procedentes de FORM inoculada y se descartó de las muestras control.

Por otro lado, los resultados de la pirosecuenciación han permitido comparar los microorganismos presentes en ambos compost, el estándar y el enriquecido con Bt. En la Figura 7.4 se muestra el porcentaje de los Phylum de bacteria encontrados para cada compost.

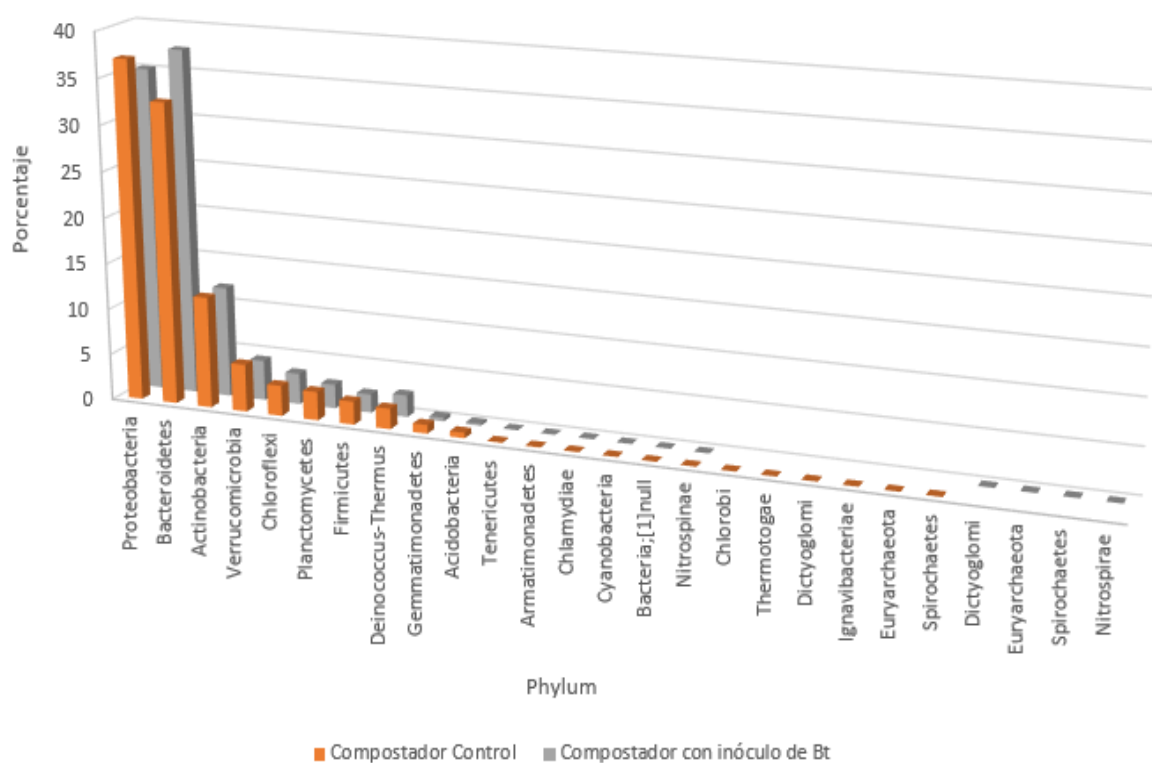


Figura 7.4 Porcentaje de Phylum identificados mediante pirosecuenciación en muestras de compost estándar y compost con Bt.

En ambos compostadores, (con y sin inóculo de Bt) destacan las Proteobacterias que suelen convertirse en competidores superiores en condiciones de enriquecimiento de carbono, desplazando así a otras bacterias (Trillas y col., 2014). También se observan diferencias entre ambos compostadores, existiendo pequeños porcentajes de Phylum presentes en un compostador y ausentes en el otro. En concreto, en el compostador control se evidencian seis Phylum que no están presentes en el compostador con inóculo de Bt. Se desconoce la razón teniendo en cuenta que las diferencias entre ambos compostadores solo deberían ser atribuidas a la inoculación de Bt en uno de ellos. En la Figura 7.5 están representados los porcentajes de diferentes especies del *genero Bacillus* identificados en ambas muestras de compost, donde se observa que también hay diferencias entre ambas muestras.

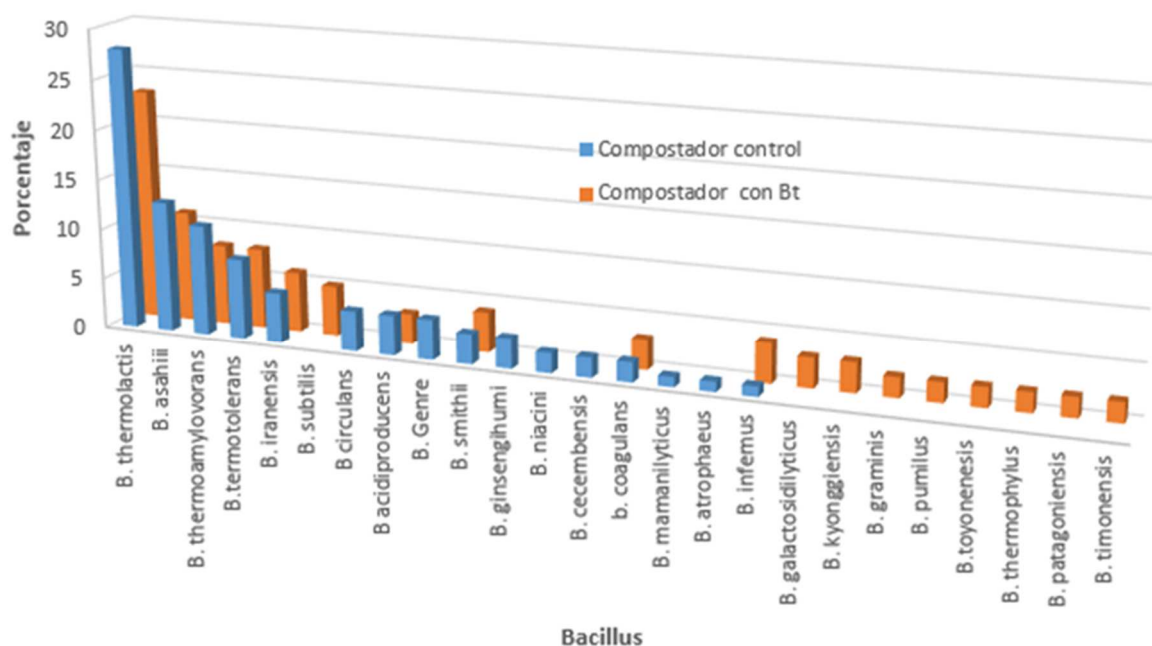


Figura 7.5 Porcentaje de *Bacillus* identificados mediante pirosecuenciación en muestras de compost estándar y compost con Bt

### Confirmación de la presencia de Bt mediante SEM, identificación de la espora y el cristal paraesporal

Se analizó el material de los compostadores domésticos, con y sin Bt mediante SEM para confirmar la presencia en este último, de esporas y cristales paraesporales de Bt. Las imágenes que se presentan a continuación revelan la presencia de la toxina producida por Bt, con la forma romboidal característica. En la Figura 7.6 se presentan los cristales paraesporales de forma romboide, esporas y *bacillus* obtenidos mediante SEM, resultado del extracto de muestras de compostador con inóculo de Bt del día 79 de proceso de maduración.

Smitha y col. (2013) reportan medidas de esporas de Bt producidas en fermentación sumergida y en FES, concluyendo que las que se producen por FES son más grandes a las producidas en fermentación sumergida. Las medidas que reportan para esporas obtenidas en FES son de 0.7 a 2.0 micras de largo y de 0.6 a 1 micras de diámetro, mientras que con fermentación sumergida las medidas que reportan son 0.5-1.0 micras de largo y 0.4-0.6 micras de diámetro. En la Figura 7.7 se pueden observar esporas obtenidas en el material del compostador doméstico inoculado con Bt, con



dimensiones de 1.25 micras de largo y 0.74 micras de diámetro, valores dentro de los rangos reportados por Smitha y col. (2013) trabajando en FES.

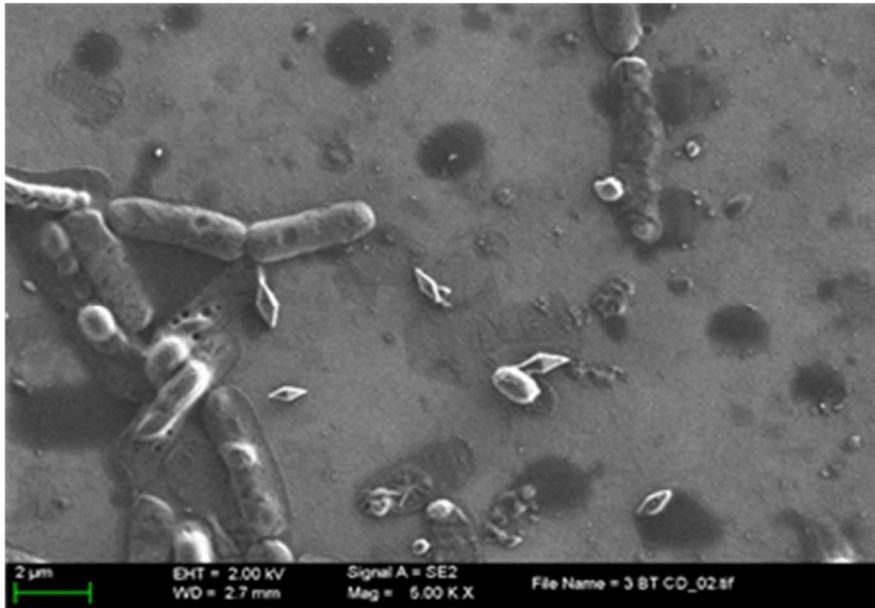


Figura 7.6 Imagen de cristales, esporas y células de Bt obtenida mediante SEM de compost enriquecido con Bt

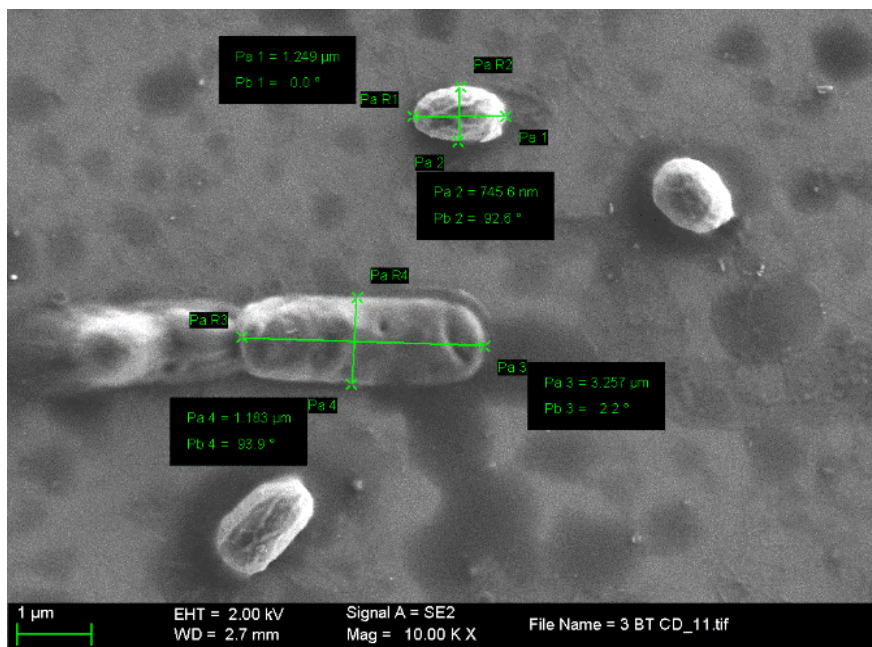


Figura 7.7 Dimensiones de esporas (1.25 x 0.74 micrometers) y de Bt (3.26 x 1.19 micrometers) de material de compost doméstico enriquecido con Bt

Los cristales paraesporales de Bt encontrados en compost enriquecido con Bt se observan en la Figura 7.8. Sus dimensiones son de 1.14 micras de largo y 0.32 micras de ancho. Caballero y col. (2001) reportan cristales paraesporales de diversas formas dependiendo de las proteínas que los integran, encontrándose cristales con tamaños desde 350 nm hasta 2 micras de longitud.

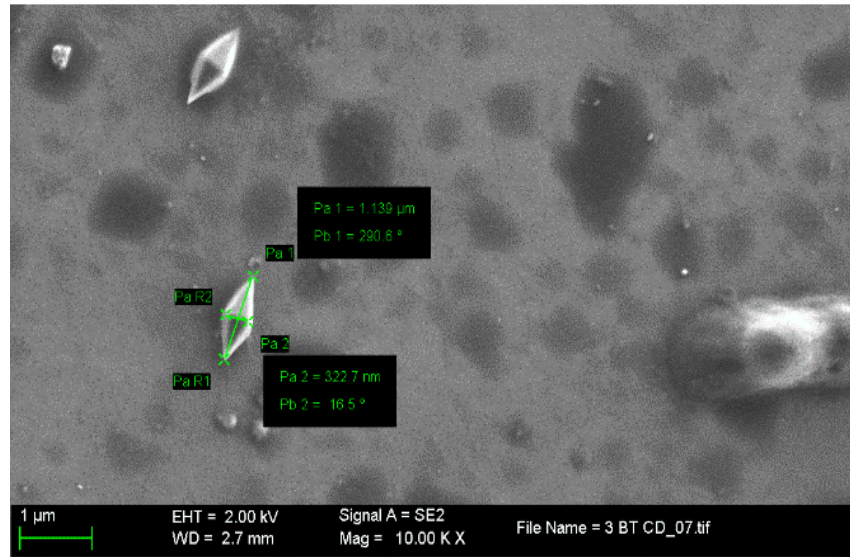


Figura 7.8 Dimensiones de cristal paraesporal (1.14 x 0.32  $\mu\text{m}$ ) de Bt en el compost enriquecido con Bt

Los resultados del análisis con SEM de muestras del compostador sin inóculo de Bt se presentan en la Figura 7.9, donde se aprecia algún tipo de bacilo, pero no se ven esporas ni cristales característicos de Bt, pudiéndose tratar de *Bacillus cereus*.

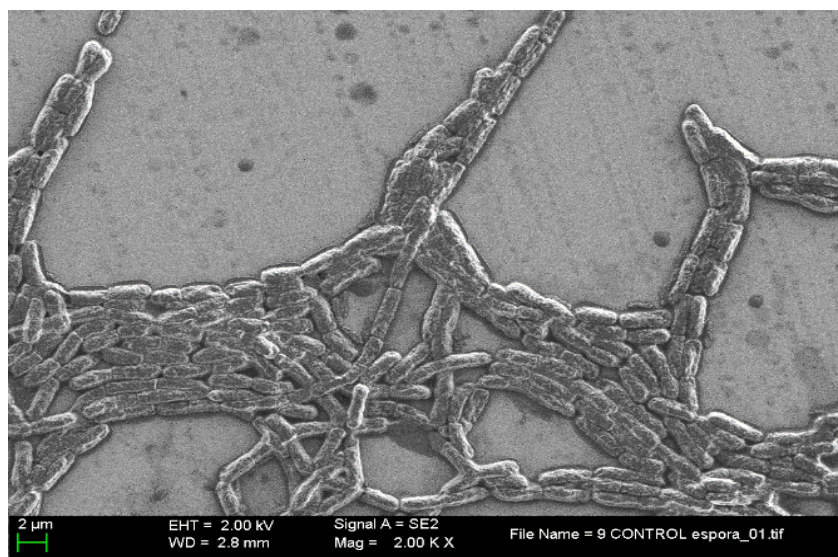


Figura 7.9 Resultados del análisis por SEM del material del compostador doméstico control, sin inóculo de Bt

### 7.3.3. Calidad del compost final

La caracterización del compost final se realizó para ambos compostadores sobre una muestra de material correspondiente al día 79 de maduración (día 148 de proceso total) de ambos compostadores. En la Tabla 7.5 se presentan los valores medios de composición de muestras de compost del compostador control y del compostador con inóculo de Bt.

Tabla 7.5 Caracterización de compost del día 148 de proceso total (día 79 de maduración) de compostador control sin inóculo de Bt y de compostador inoculado con Bt.

Parámetros	Compostador control	Compostador con Bt
Humedad (% b.h.)	38.92	33.13
M.O (% b.s.)	58.72	58.82
pH.	8.17	8.15
C/N	12.9	13.2
Carbono (% b.s)	38.8 ± 0.5	41 ± 1.2
Hidrógeno (% b.s.)	4.5 ± 1.7	4.8 ± 1.7
Nitrógeno (% b.s.)	3.0 ± 2.9	3.1 ± 1.7
Azufre (% b.s.)	< 0.1	0.15 ± 3
Na (mg g <sup>-1</sup> MS)	4.8 ± 0.8	3.6 ± 2.1
Mg (mg g <sup>-1</sup> MS)	4.9 ± 1.9	4.7 ± 1.7
P (mg g <sup>-1</sup> MS)	4.5 ± 2.4	4.8 ± 1.3
K (mg g <sup>-1</sup> MS)	22.0 ± 0.5	23 ± 1.4

% b.s: Porcentaje sobre base seca; % b.h: Porcentaje sobre base húmeda

El contenido en materia orgánica y de nitrógeno en ambos compostadores es muy parecido. Estas características son de especial interés en la valorización del compost, ya que determinan el valor que tendrá como enmienda para el suelo (Young y col., 2016).

### **Estabilidad y madurez del compost**

Un compost inmaduro y sin estabilizar puede tener efectos negativos sobre el suelo y el crecimiento de las plantas. La medida de la estabilidad biológica suele ser determinada mediante índices respirométricos, a través del consumo de oxígeno de un compost en un tiempo determinado, y por lo tanto puede considerarse equivalente a la actividad biológica del material, condicionando su comportamiento agronómico (Barrena y col., 2006). En la Tabla 7.6 se presenta el valor de IRD máximo promedio de triplicados y el consumo acumulado de oxígeno (AT<sub>4</sub>) obtenido de muestras de

compostadores con inóculo y sin inóculo a los 69 de proceso general y 28 días de maduración.

Tabla 7.6 IRD máx y AT4 de compostador doméstico con y sin inóculo.

Parámetros	Compostador control	Compostador con Bt
IRD máx (g O <sub>2</sub> kg <sup>-1</sup> MO h <sup>-1</sup> )	0.9 ± 0.1	0.5 ± 0.1
AT <sub>4</sub> Total (g O <sub>2</sub> kg <sup>-1</sup> MO)	56 ± 4	23 ± 4

Los valores de IRD obtenidos, por debajo de 1g O<sub>2</sub> Kg<sup>-1</sup> MO h<sup>-1</sup>, indican que el material de ambos compostadores es estable. Por otro lado, y siguiendo el mismo patrón, el consumo acumulado de oxígeno para el compostador control sin inóculo fue mayor que el compostador con inóculo. Estas diferencias no son importantes, sobretodo teniendo en cuenta que se realizaron a los 28 días de maduración y podrían deberse al tiempo extra que pasó parte del material en el reactor. A partir de este momento se considera que el compost ya es estable y no se realizaron más respirometrías de las muestras que se obtuvieron al final del proceso de maduración.

En la Tabla 7.7 se recogen los valores del índice de germinación (%), el porcentaje de germinación y la longitud relativa de la raíz correspondientes al test de germinación realizado. Tiquia y col. (1996) sugieren que valores IG (producto del % de germinación y la longitud relativa de la raíz) superiores al 80% indican la ausencia de sustancias fitotóxicas en el compost (Tiquia y col., 1996). Además, al estar estos valores por encima del 100% indican un efecto beneficioso en la germinación y crecimiento de las semillas (Ponsá y col., 2009). La combinación de),

Tabla 7.7 Índice de germinación de muestras de compost, compostadores domésticos con y sin inóculo de Bt a los 79 días de maduración

	Germinación (%)	Longitud relativa de la raíz	Índice de Germinación (%)
Compost Control sin Bt	103.8 ± 15.1	245.8 ± 17.7	255.3 ± 15.7
Compost con Bt	100 ± 13.8	214.9 ± 14.2	214.9 ± 14.2

La combinación de ambos parámetros, madurez y estabilidad se consideran una buena opción para determinar la calidad de un compost (Komilis y Tziouvaras, 2009). De acuerdo a los valores obtenidos, los compost procedentes de los compostadores domésticos, tanto el que ha seguido un proceso estándar, como el que contiene Bt, se pueden considerar un material estable y maduro, y se pueden aplicar de forma segura como enmienda orgánica al suelo.

### **Análisis microbiológico del compost final**

Se realizó un análisis microbiológico del material de los compostadores domésticos en la etapa de maduración incluyendo la determinación de la presencia o ausencia de patógenos. Se enviaron muestras de ambos compostadores al laboratorio de microbiología de la Facultad de Veterinaria de la UAB. En la Tabla 7.8 se presenta el resultado del análisis microbiológico de las muestras de compostador control y en la Tabla 7.9 el de las muestras de compostador con inóculo de Bt.

Como se puede observar en las Tablas 7.8 y 7.9, no se detectó la presencia de patógenos de importancia (según la normativa española de fertilizantes, BOE, 2013) como *E coli*, *Salmonella sp*, *Listeria sp*, *C. perfringens*, *S. aureus* en ninguno de los compostadores. Respecto a la presencia de enterobacterias, la concentración obtenida es relativamente alta en ambos compostadores si se compara con los trabajos de Christensen y col. (2002) que reportan enterobacterias para un compost acabado de  $10E+04$  a  $10E+06$  UFC g<sup>-1</sup>. La evolución de la concentración de enterobacterias indica que en el proceso de maduración estas pueden aumentar y volver a poblar el compost.

En cuanto a población de *Coliformes*, esta es mayor en una unidad exponencial en el reactor control sin inóculo si se compara con la del compostador con inóculo de Bt. En un estudio realizado a 4 compost elaborados a base de residuos verdes (Nagerabi y col., 2012), se encontró presencia de *aspergillus niger* en todos los compostadores y *coliformes* en concentraciones de  $1.55E+03$  y  $6.40E+01$  respectivamente. Estas concentraciones son menores a las reportadas en las Tablas 7.8 y 7.9 de esta investigación.

Tabla 7.8 Análisis microbiológico de compost procedente de muestras de compostador control (sin inóculo de Bt) en tres tiempos de evaluación correspondiente a período de maduración

<b>Muestras de compostador control (sin inóculo)</b>			
<b>Microorganismos</b>	<b>Días de maduración del compost</b>		
	28	79	86
<i>Enterobacterias totales</i>	2.00E+08	2.00E+08	6.00E+08
<i>Coliformes</i>	9.00E+07	6.00E+07	7.00E+07
<i>E. coli</i> *	Ausencia	Ausencia	Ausencia
<i>S. aureus</i>	Ausencia	Ausencia	Ausencia
<i>Salmonella</i> ** sp.	Ausencia	Ausencia	Ausencia
<i>Listeria</i> sp.	Ausencia	Ausencia	Ausencia
<i>Bacterias lácticas</i>	2.00E+03	8.00E+09	3.00E+03
<i>Bacterias anaeróbicas</i>	3.00E+06	7.00E+05	3.00E+06
<i>Bacterias aeróbicas</i>	8.00E+09	4.00E+09	2.00E+08
<i>C. perfringens</i>	Ausencia	Ausencia	Ausencia
<i>Hongos filamentosos</i>	2.00E+07	1.00E+09	8.00E+08
<i>Levaduras</i>	2.00E+02	9.00E+03	7.00E+03

Ausencia \* en 10 g \*\* en 25g

Tabla 7.9 Análisis microbiológico del compost procedente de compostador inoculado con Bt en tres tiempos de evaluación correspondientes al período de maduración

Muestras de compostador con inóculo de Bt			
Microorganismos	Días de maduración del compost con Bt		
	28	79	86
<i>Enterobacterias totales</i>	2.00E+08	8.00E+08	4.00E+08
<i>Coliformes</i>	8.00E+06	5.00E+06	6.00E+06
<i>E. coli</i>	Ausencia	Ausencia	Ausencia
<i>S. aureus</i>	Ausencia	Ausencia	Ausencia
<i>Salmonella sp</i>	Ausencia	Ausencia	Ausencia
<i>Listeria sp.</i>	Ausencia	Ausencia	Ausencia
<i>Bacterias lácticas</i>	1.00E+06	2.00E+08	2.00E+03
<i>Bacterias anaeróbicas</i>	8.00E+06	8.00E+05	6.00E+05
<i>Bacterias aeróbicas</i>	6.00E+08	8.00E+09	2.00E+09
<i>C. perfringens</i>	Ausencia	Ausencia	Ausencia
<i>Hongos filamentosos</i>	1.00E+07	2.00E+09	6.00E+08
<i>Levaduras</i>	2.00E+02	8.00E+03	6.00E+03

Ausencia \* en 10 g \*\* en 25g

En la Tabla 7.10 se presentan, a modo de resumen y comparación, los resultados para cepas del género *Bacillus*, bacterias y hongos detectados en ambos compostadores. Se puede observar la presencia de poblaciones microbianas beneficiosas pertenecientes a los géneros que degradan materiales lignocelulósicos recalcitrantes, los hongos, tales como *Penicillium*, *Fusarium* y *Aspergillus*, y las especies procariotas afiliados a *Bacillus* (Ventorino y col. 2016).

Tabla 7.10 Evaluación de muestras de compostador control y compostador inoculado con Bt en tres tiempos diferentes. Incluye cepas del género *Bacillus*, bacterias y hongos

	Compost control (Sin inóculo)			Compost - Bt (Con inóculo de Bt)		
	28	79	86	28	79	86
Muestras tomadas en días de maduración compost						
<b>Cepas del Género Bacillus</b>						
<i>Bacillus subtilis</i>	X	X	X	X	X	X
<i>Bacillus stearothermophilus</i>	X	X	X	X	X	X
<i>Bacillus thuringiensis</i>				X	X	X
<b>Bacterias</b>						
<i>Bacillus spp.</i>	X	X	X	X	X	X
<i>kocuria spp.</i>	X	X	X	X	X	X
<i>Pseudomonas sp.</i>	X	X	X	X	X	X
<i>Streptomyces sp.</i>	X	X	X	X	X	X
<i>Thermus sp.</i>	X	X	X	X	X	X
<i>Staphylococcus spp.</i>	X	X	X	X	X	X
<i>Lactobacillus spp.</i>	X	X	X	X	X	X
<i>Lactococcus spp.</i>	X	X	X		X	X
<i>Clostridium spp.</i>		X	X		X	X
<i>Serratia sp.</i>		X				
<i>Proteus sp.</i>				X	X	X
<b>Hongos</b>						
<i>Aspergillus spp.</i>	X	X	X	X	X	X
<i>Rhizopus sp.</i>	X	X		X	X	X
<i>Penicillium spp.</i>	X	X	X		X	
<i>Fusarium spp.</i>						X
<i>Saccharomyces sp.</i>	X	X	X	X	X	X

Según Trillas y col. (2014) la microbiota presente en un compost depende del tipo de sustrato de partida, el tipo de operación y las condiciones ambientales externas. Vargas y col. (2014) apuntan que la composición de la microbiota fúngica asociada al proceso de compostaje es diversa, pero habitualmente se detectan géneros tales como *Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium* o *Trichoderma* entre otros, aunque las poblaciones de *Aspergillus* suelen predominar. Los géneros *Penicillium*, *Aspergillus*, *Trichoderma* y *Fusarium* son importantes solubilizadores de elementos poco disponibles en el suelo como el fósforo, hierro etc., facilitando a la planta su absorción y transporte. Sin embargo, Anastasi y col., (2005) también reportan que existen otros géneros, como las especies integradas al género *Penicillium*, que se caracterizan por un elevado potencial enzimático que les permite la degradación de las principales macromoléculas presentes en la materia orgánica, tales como almidón, proteínas, celulosa o hemicelulosa. Además, actúan como agentes de control biológico (bacterias que controlan fitopatógenos) y agentes promotores del crecimiento vegetal. Entre los géneros bacterianos encontramos a los *Azotobacter*, *Acetobacter*, *Azospirillum*, *Pseudomonas* y *Bacillus* (Trillas y col., 2014).



No existe un patrón de diversidad microbiana general en compostaje, pero se conoce que el grupo de las bacterias alcanza mayores niveles en las fases mesófilas y termófilas iniciales, decreciendo considerablemente en la fase de maduración (Trillas y col., 2014). Estas bacterias se convierten en un grupo muy competitivo debido a su adaptación a la disponibilidad de sustratos, temperatura, humedad y oxígeno. Grupos de hongos y actinomicetos predominan en las fases de enfriamiento y maduración, en las cuales, polímeros como la lignina, celulosa y hemicelulosa constituyen los únicos sustratos disponibles (Trillas y col., 2014).

### **Ensayo ecotoxicológico del compost final**

Confirmada la presencia de Bt, y una vez comprobada la existencia de cristales paraesporales en el compost, se procedió a realizar un ensayo ecotoxicológico para asegurar que la aplicación de compost enriquecido con Bt no tendría ningún efecto perjudicial sobre el suelo.

Los ensayos ecotoxicológicos se utilizan para evaluar la toxicidad de una sustancia o mezcla de sustancias hacia la fauna del suelo. Las pruebas de contaminación del suelo se han normalizado en Europa utilizando el colémbolo *Folsomia candida* (Chenon y col., 2000). Entre las pruebas estandarizadas para suelos, la prueba de la reproducción de este colémbolo se encuentra entre las más ampliamente utilizadas (Filser y col. 2014). Los colémbolos son un grupo que es muy abundante en casi cualquier entorno (Hopkin, 1997) y por lo general dominan los números individuales de los artrópodos en suelos más cultivables en todo el mundo (Filser y col., 2002). La supervivencia y la reproducción de colémbolo *Folsomia candida* en la muestra en estudio bajo las condiciones de laboratorio, garantizan la no toxicidad del material en estudio.

En el presente trabajo, añadiendo dosis de aplicación agronómica realistas (1,9% p/p), no se detectaron reducciones globales significativas en la supervivencia ni en la reproducción entre tipos de mezcla (Kruskal-Wallis test  $p= 0.78$  y  $p= 0.37$ , respectivamente). Al hacer comparaciones dos a dos, tampoco se detectó ningún efecto significativo en la supervivencia y la reproducción (Mann-Whitney test  $p < 0,05$ ). La Tabla 7.11 presenta los resultados de la supervivencia y la reproducción del colémbolo. Las evaluaciones se realizaron al compostador control sin inóculo y al compostador con inóculo de Bt.

Tabla 7.11 Supervivencia y reproducción de *F. candida* en un suelo agrícola (control) y la mezcla de éste con un compost convencional i con compost enriquecido con Bt.

Muestra	Supervivencia (%)	Reproducción (%)
Suelo control	100 ± 5.3	100 ± 11.5
Suelo + compost	98 ± 5.7	108 ± 20.1
Suelo + compost con Bt	97 ± 8.4	108 ± 10.8

Los resultados indican la inexistencia de efectos nocivos en la aplicación del compost en la especie indicadora, respecto al suelo control, en términos de supervivencia y reproducción, descartando efectos tóxicos para el suelo a corto plazo a las dosis probadas. No hay ninguna diferencia significativa entre los dos composts probados, indicando la falta de efecto nocivo de la inoculación con Bt. Los resultados son representativos de los 28 días siguientes a la aplicación de los composts en el suelo agrícola estudiado, aunque no se pueden descartar efectos a más largo plazo.

En resumen, el compost obtenido en ambos compostadores cumple con los estándares de calidad establecidos en el R.D. 506/2013 sobre productos fertilizantes, presentando humedad entre el 33-38%, contenido de materia orgánica del 60% y relación C/N de 13 (3% en peso de nitrógeno en base seca). El material es estable (IRD máx, 0.9-0.5 g O<sub>2</sub> kg<sup>-1</sup>MO h<sup>-1</sup>), libre de patógenos (ausencia de *E. coli*, *S. aureus*, *Salmonella* sp. y *Listeria* sp.), con un Índice de germinación superior a 200% (255-214%) indicando efectos no fitotóxicos y beneficiosos para su aplicación al suelo. Además, el compost prodecente del compostador dónde se inoculó Bt contiene este microorganismo a una concentración de 2E+06 UFC g<sup>-1</sup>MS y cristales paraesporales correspondientes a la toxina que produce Bt. La concentración de esta toxina y el efecto biopesticida no se han determinado quedando este aspecto como propuesta de trabajo futuro. Se podría también explorar la posibilidad de extraer Bt del material sólido para su aplicación por aspersión, pues en los extractos observados mediante SEM se detectó el cristal tóxico.



## CAPÍTULO 8

---



## 8 Conclusiones

Las conclusiones derivadas del trabajo de investigación son las siguientes:

- Los resultados obtenidos a diferentes escalas, principalmente en reactores de 10 L confirman la posibilidad de la valorización de distintos residuos orgánicos por medio fermentación en estado sólido (FES) a través de un producto que puede ser aplicado como enmienda orgánica para el suelo conteniendo *Bacillus thuringiensis* (bacteria con poder biopesticida).
- Se seleccionaron dos residuos: uno de procedencia industrial (residuo de fibra de soja procedente de una industria que produce leche de soja y otros derivados) y otro de amplia producción, de procedencia doméstica y comercial, la Fracción Orgánica de Residuos Municipales (FORM) recogida selectivamente.
- Se seleccionaron las variedades *kurstaki* e *israelensis* de *Bacillus thuringiensis* (Bt). La primera, con poder pesticida frente a lepidópteros y la segunda frente a dípteros. Se ha observado que la variedad *kurstaki* ofrece mejores resultados en FES.
- Se utilizaron técnicas respirométricas para el seguimiento de la actividad biológica durante el proceso de FES. El seguimiento y evaluación de la población de Bt se realizó mediante técnicas microbiológicas como el conteo de células viables y esporas en placa, las tinciones y la microscopía electrónica de barrido, demostrándose adecuadas tanto en condiciones estériles como no estériles de residuo.
- Se concluye que en reactores de 500 mL es viable el crecimiento de Bt en residuo de soja y en FORM a través del proceso de FES, logrando el crecimiento óptimo de Bt en residuos estériles a temperatura constante (30°C) y aireación constante que asegure concentración de oxígeno por encima del 15% (v/v).

- A escala superior, en reactores adiabáticos de 10L, se ha conseguido la supervivencia de Bt en residuo de soja incluso alcanzando temperaturas superiores a 60°C por un período corto de tiempo que permitieron eliminar microorganismos patógenos. El producto final se demostró estable e higienizado, apto para su aplicación al suelo como enmienda orgánica conteniendo Bt.
- Se confirmó que la FORM estéril en fermentación sumergida, puede suplir al medio comercial a la hora de preparar el inóculo de Bt, consiguiendo además un inóculo aclimatado al sustrato en caso de utilizarse para FES. La utilización de FORM estéril como medio de cultivo supone también una reducción de costes en materia prima.
- En un medio no estéril y a escala 500 mL se concluye que la mayor proporción de inóculo inicial puede favorecer el crecimiento de Bt. Cabe tener en cuenta que, en estas condiciones, se establece competencia entre Bt y la población microbiana propia del residuo.
- En reactores adiabáticos de 10 L, trabajando en FES con residuo no estéril, el incremento de la temperatura sumado a la carga bacteriana propia de la FORM y la falta de aire dentro del reactor, son impedimentos para que Bt pueda desarrollarse plenamente.
- Cuando la matriz de FORM se ha mantenido en rango termófilo por un promedio de 7 días aproximadamente, se garantiza la reducción de competencia de los microorganismos nativos de la FORM, asegurando el crecimiento de Bt. Las mejores condiciones para este crecimiento se dan al homogeneizar regularmente el contenido del reactor.
- Se ha desarrollado una estrategia de operación en reactores de 10L que permite el crecimiento de Bt en FORM mediante FES consistente en inocular Bt después de la etapa termófila del proceso. Las condiciones que se dan durante esta etapa permiten reducir la carga microbiana propia de la FORM favoreciendo el crecimiento de Bt. Además, con esta estrategia no se somete a Bt a elevadas temperaturas. Se ha comprobado que la homogeneización del material influye positivamente en el crecimiento de Bt.

- La estrategia desarrollada, permite utilizar el material de un reactor de FES como inóculo de un segundo reactor permitiendo la operación en semicontinuo. Esta estrategia podría ser extrapolada a escala industrial, asegurando obtener un producto que proviene de un residuo que se ha mantenido en condiciones termófilas durante suficiente tiempo para cumplir con los estándares de higienización.
- Se ha obtenido, mediante compostaje doméstico, un compost de calidad, higienizado y estable que no supone efectos tóxicos para el suelo y que puede aplicarse a éste de forma beneficiosa conteniendo Bt y cristales paraesporales.

## **TRABAJO FUTURO**

Los siguientes aspectos podrían ser de interés para complementar este trabajo de investigación:

1. Escalado del proceso.
2. Determinación de los efectos biopesticidas del producto obtenido.

Estos dos puntos se desarrollarán dentro del proyecto DECISIVE (iniciado a Setiembre de 2016). Los objetivos de este proyecto contemplan la producción de biopesticida a partir de digestato de FORM a escala piloto (100 L) y su aplicación en campo para determinar los efectos tóxicos sobre organismos plaga específicos.

3. Búsqueda de una técnica fiable que permita cuantificar la toxina de Bt en el compost y también durante el proceso de FES en condiciones de no esterilidad.





## CAPÍTULO 9

---



## 9 Referències

- Abraham, J. (2014). Production of proteases from industrial wastes through solid-state fermentation at different scales Potential applications. Tesis doctoral. Universitat Autònoma de Barcelona.
- Abraham, J., Gea, T., Sánchez, A. (2013). Potential of the solid-state fermentation of soy fibre residues by native microbial populations for bench-scale alkaline protease production. *Biochemical Engineering Journal*, 74, 15–19.
- Adani, F., Confalonieri, R., & Tambone, F. (2004). Dynamic respiration index as a descriptor of the biological stability of organic wastes. *Journal of Environmental Quality*, 33(5), 1866–1876.
- Adani, F., Ubbiali, C., & Generini, P. (2006). The determination of biological stability of composts using the Dynamic Respiration Index: The results of experience after two years. *Waste Management*, 26, 41–48.
- Adhikari, B. K., Trémier, A., Barrington, S., Martinez, J., & Daumoin, M. (2013). Gas emissions as influenced by home composting system configuration. *Journal of Environmental Management*, 116, 163–171.
- Agrocabildo. (2014). Bioplagicidas y Fitofortificantes de distribución aprobada: Reglamento (CE) nº 1107/2009 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 21 de octubre de 2009, relativo a la comercialización de productos fitosanitarios. Retrieved from.
- Agència de Residus de Catalunya, (2014). Panell a llars de Catalunya envers la producció de residus ordinaris. [http://residus.gencat.cat/web/.content/home/actualitat/2014/1211\\_composicio\\_brossa/Panel-a-llars-de-Catalunya-envers-la-produccio-de-residus-pdf](http://residus.gencat.cat/web/.content/home/actualitat/2014/1211_composicio_brossa/Panel-a-llars-de-Catalunya-envers-la-produccio-de-residus-pdf)
- Alef, K., & Nannipieri, P. (1995). *Methods in Applied Soil Microbiology and Biochemistry*. Academic Press Limited, San Diego.
- Almeira, N., Komilis, D., Barrena, R., Gea, T., & Sánchez, A. (2015). The importance of aeration mode and flowrate in the determination of the biological activity and stability of organic wastes by respiration indices. *Bioresource Technology*, 196, 256–262.
- Anastasi, A., Varese, G., & Marchisio, V. F. (2005). Isolation and identification of fungal communities in compost and vermicompost. *Mycologia*, 97(1), 33–44.
- Artola, A., Barrena, R., Font, X., Gabriel, D., Gea, T., Mudhoo, A., & Sánchez, A. (2009). Composting from a Sustainable Point of View : Respirometric Indices as Key Parameter. *Dynamic soil, Dynamic plant 3 special issue1*, 1-16.
- Ash, G. J. (2010). The science, art and business of successful bioherbicides. *Biological Control*, 52(3), 230–240.
- Awasthi, M. K., Pandey, A. K., Bundela, P. S., & Khan, J. (2015). Co-composting of organic fraction of municipal solid waste mixed with different bulking waste: Characterization of physicochemical parameters and microbial enzymatic dynamic. *Bioresource Technology*, 182, 200–207.
- Babu, R., Sajeena, A., & Seetharaman, K. (2004). Solid substrate for production of *Alternaria alternata* conidia: A potential mycoherbicide for the control of *Eichhornia crassipes* (water hyacinth). *Weed Research*, 44(4), 298–304.

- Barrena, R. (2006). Compostaje de residuos orgánicos. Aplicación de técnicas respirométricas en el seguimiento de proceso. Tesis doctoral. Universitat Autònoma de Barcelona.
- Barrena, R., d'Imporzano, G., Ponsá, S., Gea, T., Artola, A., Vázquez, F., Adani, F. (2009). In search of a reliable technique for the determination of the biological stability of the organic matter in the mechanical-biological treated waste. *Journal of Hazardous Materials*, 162, 1065–1072.
- Barrena, R., Font, X., Gabarrell, X., & Sánchez, A. (2014). Home composting versus industrial composting: Influence of composting system on compost quality with focus on compost stability. *Waste Management*, 34(7), 1109–1116.
- Barrena, R., Vázquez, F., & Sánchez, A. (2006). The use of respiration indices in the composting process: a review. *Waste Management & Research: The Journal of the International Solid Wastes and Public Cleansing Association*, ISWA, 24, 37–47.
- Khedher, B.S., Jaoua, S. & Zouari. (2011). Improvement of bioinsecticides production by sporeless *Bacillus thuringiensis* strains in response to various stresses in low cost medium. *Current Microbiology*, 62(5), 1467–1477.
- Ben Rebah, F., Prévost, D., Yezza, A., & Tyagi, R. D. (2007). Agro-industrial waste materials and wastewater sludge for rhizobial inoculant production: A review. *Bioresource Technology*, 98, 3535–3546.
- Berthe, L., Druilhe, C., Massiani, C., Tremier, A., & de Guardia, A. (2007). Coupling a respirometer and a pycnometer, to study the biodegradability of solid organic wastes during composting. *Biosystems Engineering*, 97(1), 75–88.
- Blackburn, D., Shapiro-Ilan, D. I., & Adams, B. J. (2016). Biological control and nutrition: Food for thought. *Biological Control*, 97, 131–138.
- BOE (2013). Boletín Oficial de Estado. Real Decreto 506/2013, de 28 de junio, sobre productos fertilizantes y compost.
- Botella, C., De Ory, I., Webb, C., Cantero, D., & Blandino, A. (2005). Hydrolytic enzyme production by *Aspergillus awamori* on grape pomace. *Biochemical Engineering Journal*, 26(2–3), 100–106.
- Brar, S. K., Verma, M., Tyagi, R. D., Valéro, J. R., & Surampalli, R. Y. (2007). *Bacillus thuringiensis* fermentation of hydrolyzed sludge - Rheology and formulation studies. *Chemosphere*, 67, 674–683.
- Bravo, A. (2001). Proteínas insecticidas de *Bacillus thuringiensis*. En *Bioinsecticidas: Fundamentos y Aplicaciones de Bacillus thuringiensis en el Control Integrado de Plagas*. (1ª Edición). Navarra- España: Phytoma, (72–84).
- Bravo, A., Likitvivatanavong, S., Gill, S. S., & Soberón, M. (2011). *Bacillus thuringiensis*: A story of a successful bioinsecticide. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 41, 423-431.
- Caballero, P., & Ferré, J. (2001). *Bioinsecticidas: Fundamentos y Aplicaciones de Bacillus thuringiensis en el Control Integrado de Plagas*. (M. V. P.-E. S.L., Ed.) (1ª Edición). Navarra- España: Phytoma, 317p.
- Chang, M., Zhou, S.G., Lu, N., & Ni, J.R. (2007). Enhanced *Bacillus thuringiensis* production from sewage sludge with alkaline and ultrasonic pretreatments. *Water, Air, and Soil Pollution*, 186(1–4), 75–84.

- Chen, M. L., & Tsen, H. Y. (2002). Discrimination of *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* with 16S rRNA and gyrB gene based PCR primers and sequencing of their annealing sites. *Journal of Applied Microbiology*, 92(5), 912–919.
- Chenon, P., Rousset, A., & Crouau, Y. (2000). Genetic polymorphism in nine clones of a parthenogenetic collembolan used in ecotoxicological testing. *Applied Soil Ecology*, 14(2), 103–110.
- Christensen, K. K., Carlsbæk, M., & Kron, E. (2002). Strategies for evaluating the sanitary quality of composting. *Journal of Applied Microbiology*, 92(6), 1143–1158.
- Couto, S. R., & Sanroman, M. A. (2006). Application of solid-state fermentation to food industry - A review. *Journal of Food Engineering*, 76(3), 291–302.
- Crickmore, N., Zeigler, D. R., Feitelson, J., Schnepf, E., Van Rie, J., Lereclus, D., Baum, J. Dean, D. H. (1998). Revision of the nomenclature for the *Bacillus thuringiensis* pesticidal crystal proteins. *Microbiology and Molecular Biology Reviews : MMBR*, 62(3), 807–813.
- Crouau, Y., & Cazes, L. (2003). What causes variability in the *Folsomia candida* reproduction test? *Applied Soil Ecology*, 22(2), 175–180.
- Darriet, F. (2015). An anti-mosquito mixture for domestic use, combining a fertiliser and a chemical or biological larvicide. *Pest Management Science*, 72, 1340–1345.
- De Gannes, V., Eudoxie, G., & Hickey, W. J. (2013). Insights into fungal communities in composts revealed by 454-pyrosequencing: Implications for human health and safety. *Frontiers in Microbiology*, 4, 164p.
- De la Cruz Quiroz, R., Roussos, S., Hernández, D., Rodríguez, R., Castillo, F., & Aguilar, C. N. (2014). Challenges and opportunities of the bio-pesticides production by solid-state fermentation: filamentous fungi as a model. *Critical Reviews in Biotechnology*, 8551, 1–8.
- Devi, P. S. V., Ravinder, T., & Jaidev, C. (2005). Cost-effective production of *Bacillus thuringiensis* by solid-state fermentation. *Journal of Invertebrate Pathology*. 88, 163–168.
- Drobniowski, Francis A., (1993). *Bacillus cereus* and Related Species. *Clinical Microbiology Reviews*, 6, 324-338
- Dulmage, H. T. (1970). Production of the spore-delta-endotoxin complex by variants of *Bacillus thuringiensis* in two fermentation media. *Journal of Invertebrate Pathology*, 16, 385–389.
- Elías, X. (2005). Tratamiento y valorización energética de residuos. (Fundación Universitaria Iberoamericana, Ed.) (reimpresa). Díaz de Santos.
- Ernandes, Bianchi, V. L. del, & Moraes, I. D. O. (2013). Evaluation of two different culture media for the development of biopesticides based on *Bacillus thuringiensis* and their application in larvae of *Aedes aegypti*. *Acta Scientiarum. Technology*, 35(1), 11–18.
- Filser, J., Mebes, K. H., Winter, K., Lang, A., & Kampichler, C. (2002). Long-term dynamics and interrelationships of soil *Collembola* and microorganisms in an arable landscape following land use change. *Geoderma*, 105(3–4), 201–221.

- Filser, J., Wiegmann, S., & Schröder, B. (2014). *Collembola* in ecotoxicology-Any news or just boring routine. *Applied Soil Ecology*, 83, 193–199.
- Gea, T., Abraham, J., Ballardo C., Cerda, A., Jimenez, P., Yazid, N., Artola, A., Barrena, R., El Barky, M., Font, X., Sánchez, A. (2014). Obtención de Proteasas a partir de residuos de pelo vacuno por Fermentación en Estado Sólido y sus usos potenciales. *Red Española de Compostaje -De Residuo a Recurso : Estrategias de Gestión Tratamiento y Valorización*. Murcia, España.
- Gea, T., Barrena, R., Artola, A., & Sánchez, A. (2004). Monitoring the biological activity of the composting process: Oxygen uptake rate (OUR), respirometric index (RI), and respiratory quotient (RQ). *Biotechnology and Bioengineering*, 88, 520–527.
- Graminha, E. B. N., Gonzalves, A. Z. L., Pirota, R. D. P. B., Balsalobre, M. A. A., Da Silva, R., & Gomes, E. (2008). Enzyme production by solid-state fermentation: Application to animal nutrition. *Animal Feed Science and Technology*, 144, 1-22.
- Grau, D. (1999). *Reactores Discontinuos y Semicontinuos: Modelización Y Comprobación Experimental*. Universitat Politècnica de Catalunya.
- Haug, R. T. (1993). *The Practical Handbook of Compost Engineering*. (F. Boca Raton, Ed.) (Lewis Publ).
- Hölker, U., Höfer, M., & Lenz, J. (2004). Biotechnological advantages of laboratory-scale solid-state fermentation with fungi. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 64, 175-186.
- Hopkin, S. (1997). *Biology of the Springtails (Insecta Collembola)*. Oxford University Press, New York, USA, 491, 285-300.
- Iriarte y Caballero. (2001). Biología y ecología de *Bacillus thuringiensis*. En J. Caballero, P. y Ferré (Ed.), *Bioinsecticidas: Fundamentos y Aplicaciones de Bacillus thuringiensis en el Control Integrado de Plagas*. (1ª Edición). Navarra- España: Phytoma, pp. 16-37.
- Jisha, V. N., Babysarojam Smitha, R., Priji, P., Sajith, S., & Benjamin, S. (2014). Biphasic Fermentation Is an Efficient Strategy for the Overproduction of Endotoxin from *Bacillus thuringiensis*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 175(3), 1519–1535.
- Karki, B., Maurer, D., Kim, T. H., & Jung, S. (2011). Comparison and optimization of enzymatic saccharification of soybean fibers recovered from aqueous extractions. *Bioresource Technology*, 102(2), 1228–1233.
- Khanh Dang, Tyagi, R. D., Valéro, J. R., & Surampalli, R. Y. (2009). Impact of different pH control agents on biopesticidal activity of *Bacillus thuringiensis* during the fermentation of starch industry wastewater. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 32, 511- 519.
- Khare, S. K., Jha, K., & Gandhi, A. P. (1995). Citric acid production from Okara (soy-residue) by Solid-State Fermentation. *Bioresource Technology*, 54(3), 323–325.
- Ko, K. S., Kim, J. M., Kim, J. W., Jung, B. Y., Kim, W., Kim, I. J., & Kook, Y. H. (2003). Identification of *Bacillus anthracis* by rpoB sequence analysis and multiplex PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, 41(7), 2908–2914.

- Komilis, D. P., & Tziouvaras, I. S. (2009). A statistical analysis to assess the maturity and stability of six composts. *Waste Management*, 29, 1504–1513.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680–685.
- Lee, L. W., Cheong, M. W., Curran, P., Yu, B., & Liu, S. Q. (2016). Modulation of coffee aroma via the fermentation of green coffee beans with *Rhizopus oligosporus*: I. Green coffee. *Food Chemistry*, 211, 916–924.
- Liang, C., Das, K. C., & McClendon, R. W. (2003). The influence of temperature and moisture contents regimes on the aerobic microbial activity of a biosolids composting blend. *Bioresource Technology* 86, 131–137.
- Mayende, L., Wilhelmi, B., & Pletschke, B. (2006). Cellulases (CMCases) and polyphenol oxidases from *thermophilic Bacillus spp.* isolated from compost. *Soil Biology and Biochemistry*, 38, 2963–2966.
- Mitchell, D. A., de Lima Luz, L. F., Krieger, N., & Berovič, M. (2011). Bioreactors for Solid-State Fermentation. In -Chief: Murray (Ed.), *Comprehensive Biotechnology* (pp. 347–360).
- Mona Fatin Syazwanee M.G., and Noormasshela U.A., and Nor Azwady A.A., and Rusea G. , and Muskhazli M., (2016) *Bacillus thuringiensis* entomotoxicity activity in wastewater sludge-culture medium towards *Bactrocera dorsalis* and their histopathological assessment. *Sains Malaysiana*, 45 (4) 589-594
- Moreno, J. y, & Mormeneo, S. (2008). Microbiología y bioquímica del proceso de compostaje en: *Compostaje*. (Moreno, Ed.). Mundi Prensa Libros S. A. Madrid, pp. 530.
- Moyano., M. (2014). Fermentación en Estado Sólido (FES) de la papa (*solanum tuberosum*), como alternativa tecnológica para la alimentación animal. Tesis de Master. Universidad Nacional abierta y a distancia (UNAD), Escuela de Ciencias Agrícolas, Pecuarias y del Medio Ambiente; especialización en nutrición animal sostenible. Tunya, Colombia.
- Nagerabi y col. (2012). Physicochemical and microbial characteristics of locally processed green waste composts. *Compost Science and Utilization*, 20,120–127.
- Owen, P. Ward. (1991). *Biotechnology de la Fermentación: Principios, Procesos y Productos*. Acribia S.A. Zaragoza. pp 290.
- Pandey, A. (2003). Solid-state fermentation. *Biochemical Engineering Journal*, 13, 81–84.
- Pandey, A., Selvakumar, P., Soccol, C., & Nigam, P. (1999). Solid state fermentation for the production of industrial enzymes. *Current Science*, 77(1), 149–162.
- Pandey, A., Soccol, C. R., & Larroche, C. (2013). Current developments in solid-state fermentation. *Biochemical Engineering Journal* 81, 146– 161.
- Pandey, A., Soccol, C., & Mitchell, D. (2000). New developments in solid state fermentation: I-bioprocesses and products. *Process Biochemistry*, 35(10), 1153–1169.



- Patil, S. R., Amena, S., Vikas, A., Rahul, P., Jagadeesh, K., & Praveen, K. (2013). Utilization of silkworm litter and pupal waste-an eco-friendly approach for mass production of *Bacillus thuringiensis*. *Bioresource Technology*, 131, 545–547.
- Patyka, V., Buletsa, N., Pasichnyk, L., Zhitkevich, N., Kalinichenko, A., Gnatiuk, T., & Butsenko, L. (2016). Specifics of pesticides effects on the phytopathogenic bacteria. *Ecological Chemistry and Engineering S*, 23(2), 311–331.
- Pierantozzi, P., Zampini, C., Torres, M., Isla, M. I., Verdenelli, R. A., Meriles, J. M., & Maestri, D. (2012). Physico-chemical and toxicological assessment of liquid wastes from olive processing-related industries. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 92(2), 216–223.
- Pimentel, D., & Burgess, M. (2014). Environmental and economic costs of the application of pesticides primarily in the United States. In *Integrated Pest Management* 3, 47–71.
- Pognani. (2011). Organic matter evolution in biological solidwaste treatment plants. Raw waste and final product characterization. Tesis doctoral. Universitat Autònoma de Barcelona.
- Pognani, M., Barrena, R., Font, X., Scaglia, B., Adani, F., & Sánchez, A. (2010). Monitoring the organic matter properties in a combined anaerobic/aerobic full-scale municipal source-separated waste treatment plant. *Bioresource Technology*, 101, 6873–6877.
- Ponsá, S., (2010). Different indices to express biodegradability in organic solid wastes. Application to full scale waste treatment plants. Tesis doctoral. Universitat Autònoma de Barcelona.
- Ponsá, S., Gea, T., Alerm, L., Cerezo, J., & Sánchez, A. (2008). Comparison of aerobic and anaerobic stability indices through a MSW biological treatment process. *Waste Management*, 28, 2735–2742.
- Ponsá, S., Pagans, E., & Sánchez, A. (2009). Composting of dewatered wastewater sludge with various ratios of pruning waste used as a bulking agent and monitored by respirometer. *Biosystems Engineering*, 102, 433–443.
- Poopathi, S., & Archana, B. (2012). A novel cost-effective medium for the production of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* for mosquito control. *Tropical Biomedicine*, 29, 81–91.
- Porcar, M., & Caballero, P. (2000). Molecular and insecticidal characterization of a *Bacillus thuringiensis* strain isolated during a natural epizootic. *Journal of Applied Microbiology*, 89, 309–316.
- Puyuelo, B., Gea, T., & Sanchez, A. (2010). A new control strategy for the composting process based on the oxygen uptake rate. *Chemical Engineering Journal*, 165(1), 161–169.
- Puyuelo, B., Ponsá, S., Gea, T., & Sánchez, A. (2011). Determining C/N ratios for typical organic wastes using biodegradable fractions. *Chemosphere*, 85(4), 653–9.

- Puyuelo, B. (2012). Estrategias per optimitzar el procés de compostatge: Desenvolupament d'un sistema de control de l'aeració i d'una nova metodologia per definir la relació de nutrients en termes de biodegradabilitat. Tesis doctoral. Universitat Autònoma de Barcelona.
- Rahbani - Mounsef, J., Salamehc,D., Loukac,N., Brandama, C., Lteif, R., (2015). The effect of aeration conditions, characterized by the volumetric mass transfer coefficient  $K^L a$ , on the fermentation kinetics of *Bacillus thuringiensis* kurstaki. *Journal of Biotechnology*, 210, 100–106.
- Raimbault, M. (1998). General and microbiological aspects of solid substrate fermentation. Universidad Católica de Valparaíso- Chile. *Electronic Journal of Biotechnology* 1, 3.
- Rausell, C., Martínez, A., García, I., Real, D. (2001). *Bacillus thuringiensis* en el control de lepidópteros que constituyen plagas forestales. En J. Caballero, P. y Ferré (Ed.), *Bioinsecticidas: Fundamentos y Aplicaciones de Bacillus thuringiensis en el Control Integrado de Plagas*.
- Raymond, B., Johnston, P. R., Nielsen-LeRoux, C., Lereclus, D., & Crickmore, N. (2010). *Bacillus thuringiensis*: An impotent pathogen? *Trends in Microbiology*, 18, 189–194.
- REC. (2014). Red Española de Compostaje - De Residuo a Recurso: Estrategias de Gestión, Tratamiento y Valorización. (C. R. Bernal M.P., Pascual J.A., Ros M., Ed.). Murcia, España.
- Rodríguez, E., Gamboa, M., Hernández, F., Danilo, J. (2005). *Bacteriología General, Principios y prácticas de laboratorio*. Editorial Universidad de Costa Rica. San José, Costa Rica.
- Ruggieri, L., Gea, T., Artola, A., & Sanchez, A. (2008). Influence of different co-substrates biochemical composition on raw sludge co-composting. *Biodegradation*, 19(3), 403–415.
- Ruiz-Leza, H. A., Rodríguez-Jasso, R. M., Rodríguez-Herrera, R., Contreras-Esquivel, J. C., & Aguilar, C. N. (2007). Bio-reactors desing for solid state fermentation. *Revista Mexicana De Ingeniería Química*, 6, 33–40.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., & Maniatis, T. (1989). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. New York.
- Sánchez Ferrer, A. Artola Casacuberta, A. Gea Leiva, T. Barrena Gómez R. y Font Segura, X. (2015). Un nuevo paradigma para la gestión de residuos orgánicos. *Revista Industriambiente*, 10, 26-29.
- Sánchez, A., Artola, A., Barrena, R., Dios, M., García - Gil, J. C., López, R., Perez- Murcia, M. D., Puig, I., Soto, M., Gea, T., (2014). De Residuo a Recurso. El camino hacia la sostenibilidad. I Recursos Orgánicos. 4. Residuos Urbanos. (Ed) Moreno J., Moral, R., García Morales J.L., Pascual JA., Bernal M.P. Ediciones Mundi- Prensa. Madrid. 356pp.
- Santis, A. (2013). Estudio de la producción de lipasas por Fermentación en Estado Sólido a partir de residuos ricos en grasas. Impacto ambiental y posibles usos. Tesis doctoral. Universitat Autònoma de Barcelona.
- Santis, A., Gea, T., Barrena, R., & Sánchez, A. (2011). Production of lipases by solid state fermentation using vegetable oil-refining wastes. *Bioresource Technology*, 102, 10080–10084.

- Scaglia, B., Tambone, F., Genevini, P. L., & Adani, F. (2000). Respiration index determination: Dynamic and static approaches. *Compost Science & Utilization*, 8(2), 90–98.
- Schnepf, E., Crickmore, N., Van Rie, J., Lereclus, D., Baum, J., Feitelson, J., Dean, D. H. (1998). *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* : MMBR, 62, 775–806.
- Smitha, R. B., Jisha, V. N., Pradeep, S., Josh, M. S., & Benjamin, S. (2013). Potato flour mediated solid-state fermentation for the enhanced production of *Bacillus thuringiensis*-toxin. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 116, 595–601.
- Soliva, M. (2001). Compostaje i residuos organicos. Estudios i Monografía n° 21. Diputación de Barcelona, Barcelona.
- Swiecicka, I., Bideshi, D. K., & Federici, B. A. (2008). Novel isolate of *Bacillus thuringiensis* subsp. *thuringiensis* that produces a quasicuboidal crystal of Cry1Ab21 toxic to *larvae* of *Trichoplusia ni*. *Applied and Environmental Microbiology*, 74(4), 923–930.
- Tiquia, M S., Tam, N F Y., & Hodgkiss I. J., (1996). Effects of composting on phytotoxicity of spent pig manure sawdust litter. *Environ Pollut*, 93, 249-256.
- Tirado, M., Tyagi, R. D., & Valero, J. R. (2001). Wastewater treatment sludge as a raw material for the production of *Bacillus thuringiensis* based biopesticides. *Water Research*, 35(16), 3807–3816.
- Trillas, M. I., Avilés M., Suárez, F., Moreno, J., (2014). De Residuo a Recurso. El camino hacia la sostenibilidad. *Compost y control biológico de las enfermedades de las plantas*. Edit Mundi Prensa. Madrid, España.
- Tosun, I., Gönüllü, M. T., Arslankaya, E., & Günay, A. (2008). Co-composting kinetics of rose processing waste with OFMSW. *Bioresource Technology*, 99(14), 6143–6149.
- Tremier, A., De Guardia, A., Massiani, C., Paul, E., & Martel, J. L. (2005). A respirometric method for characterising the organic composition and biodegradation kinetics and the temperature influence on the biodegradation kinetics, for a mixture of sludge and bulking agent to be co-composted. *Bioresource Technology*, 96(2), 169–180.
- US Department of Agriculture US Composting Council, (2001). Test Methods for the Examination of Composting and Compost (TMECC). Edaphos International. Houston, TX, USA.
- USDA. (2010). (United States Department of Agriculture), Keys to Soil Toxonomy. Eleventh Edition. Washington, D.C., 337.
- Vargas, M<sup>a</sup> C., López, M<sup>a</sup> J., Suárez F., Jurado, M., López J., Moreno, J., (2014). El Género *penicillium* en el compostaje de residuos vegetales: diversidad y persistencia. En Red Española de Compostaje. De Residuo a Recurso. Estrategias de Gestión, Tratamiento y Valorización . (Ed) Bernal M<sup>a</sup>., Pascual J.A., Ros, M., Clemente, R. Ediciones Mundi-Prensa Madrid. 376pp.
- Vázquez, M. A., Sen, R., & Soto, M. (2015). Physico-chemical and biological characteristics of compost from decentralised composting programmes. *Bioresource Technology*, 198, 520–532.

- Ventorino, V., Parillo, R., Testa, A., Viscardi, S., Espresso, F., & Pepe, O. (2016). Chestnut green waste composting for sustainable forest management: Microbiota dynamics and impact on plant disease control. *Journal of Environmental Management*, 166, 168–177.
- Vidyarathi, A., Tyagi, R., Valero, J., & Surampalli, R., (2002). Studies on the production of *B. thuringiensis* based biopesticides using wastewater sludge as a raw material. *Water Research*, 36(19), 4850–4860.
- Wang, X., Xue, Y., Han, M., Bu, Y., & Liu, C. (2014). The ecological roles of *Bacillus thuringiensis* within phyllosphere environments. *Chemosphere*, 108, 258–264.
- Wu, S., Lan, Y., Huang, D., Peng, Y., Huang, Z., Xu, L., Gelbic, I., Carballar, R., Xiong, L., Zhang, L., Zou, S. (2014). Use of spent mushroom substrate for production of *Bacillus thuringiensis* by solid-state fermentation. *Journal of Economic Entomology*, 107(1), 137–143.
- Yeza, A., Tyagi, R. D., Valéro, J. R., & Surampalli, R. Y. (2006). Bioconversion of industrial wastewater and wastewater sludge into *Bacillus thuringiensis* based biopesticides in pilot fermentor. *Bioresource Technology*, 97, 1850–1857.
- Young, B. J., Rizzo, P. F., Riera, N. I., Torre, V. Della, López, V. A., Molina, C. D., Sánchez, A. (2016). Development of phytotoxicity indexes and their correlation with ecotoxicological, stability and physicochemical parameters during passive composting of poultry manure. *Waste Management*, 54, 101–109.
- Zhang, L., Zhang, H., Wang, Z., Chen, G., & Wang, L. (2016). Dynamic changes of the dominant functioning microbial community in the compost of a 90-m<sup>3</sup> aerobic solid state fermentor revealed by integrated meta-omics. *Bioresource Technology*, 203, 1–10.
- Zhang, W., Qiu, L., Gong, A., Cao, Y., & Wang, B. (2013). Solid-state Fermentation of Kitchen Waste for Production of *Bacillus thuringiensis*-based Bio-pesticide. *BioResources*, 8(1), 1124–1135.
- Zhuang, L., Zhou, S., Wang, Y., Liu, Z., & Xu, R. (2011). Cost-effective production of *Bacillus thuringiensis* biopesticides by solid-state fermentation using wastewater sludge: Effects of heavy metals. *Bioresource Technology*, 102, 4820–4826.
- Zhuang, Zhou, S., Wang, Y., & Chang, M. (2011). Mosquito biolarvicide production by sequential fermentation with dual strains of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* and *Bacillus sphaericus* using sewage sludge. *Bioresource Technology*, 102, 1574–1580.
- Zou, H., Ding, S., Zhang, W., Yao, J., Jiang, L., & Liang, J. (2016). Study on influence factors in *Bacillus thuringiensis* production by semi-solid state fermentation using food waste. *Procedia Environmental Sciences*, 31, 127–135.
- Zouari, N., & Jaoua, S. (1999). The effect of complex carbon and nitrogen, salt, Tween-80 and acetate on delta-endotoxin production by a *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki*. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 23(6), 497–502.
- Zucconi, F., Forte, M., Monaco, A., & De Bertoldi, M. (1981). Biological evaluation of compost maturity. *BioCycle*, 22(4), 27–29.



ANEXO

---





## Research article

# Valorization of soy waste through SSF for the production of compost enriched with *Bacillus thuringiensis* with biopesticide properties



Cindy Ballardo <sup>1</sup>, Juliana Abraham <sup>1</sup>, Raquel Barrena, Adriana Artola <sup>\*</sup>, Teresa Gea, Antoni Sánchez

Composting Research Group, Department of Chemical, Biological and Environmental Engineering, Escola d'Enginyeria, Universitat Autònoma de Barcelona, Cerdanyola del Vallès, 08193 Barcelona, Spain

## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 25 September 2015  
 Received in revised form  
 16 December 2015  
 Accepted 19 December 2015  
 Available online xxx

## Keywords:

Waste valorization  
 Soy fiber residues  
*Bacillus thuringiensis*  
 Soil amendment  
 Solid state fermentation  
 Compost

## ABSTRACT

There is a growing generation of biodegradable wastes from different human activities from industrial to agricultural including home and recreational activities. On the other hand, agricultural and horticultural activities require significant amounts of organic amendments and pesticides. In this framework, the present study evaluates the viability of soy fiber residue valorization as organic soil amendment with biopesticide properties through aerobic solid-state fermentation (SSF) in the presence of *Bacillus thuringiensis* (Bt). The experiments were performed first under sterile and non-sterile conditions at lab scale using 115 g of sample and controlled temperature (30 °C). Bt growth was successful in sterile conditions, obtaining  $6.2 \times 10^{11}$  CFU g<sup>-1</sup> DM and  $8.6 \times 10^{10}$  spores g<sup>-1</sup> DM after 6 days. Bt survived on solid culture under non-sterile conditions ( $3.8 \times 10^9$  CFU g<sup>-1</sup> DM and  $1.3 \times 10^8$  spores g<sup>-1</sup> DM). Further, the valorization process was scaled-up to 10 L reactors (2300 g) under non-sterile conditions obtaining a final stabilized material with viable Bt cells and spores ( $9.5 \times 10^7$  CFU g<sup>-1</sup> DM and  $1.1 \times 10^8$  spores g<sup>-1</sup> DM in average) after 9 days of SSF. These results confirm the possibility of managing biodegradable wastes by their transformation to a waste derived soil amendment with enhanced biopesticide effect, in comparison to traditional compost using a valuable and low-cost technique (SSF).

© 2015 Elsevier Ltd. All rights reserved.

## 1. Introduction

Organic wastes are worldwide produced in increasing amounts from different sources. Many industrial wastes contain an organic fraction or are mainly organic in nature. From those wastes, some are biodegradable. In that case, preferred management options include their valorization to obtain biogas, valuable products or a soil organic amendment among others (Murthy and Naidu, 2012). A good example are wastes from agro and food industries that are hardly contaminated by substances that can prevent them from being recycled into valuable products such as fertilizers, closing in this manner the cycle: raw materials for agro and food products come from agriculture and agricultural soils, thus valorization of organic wastes from these industries into soil will contribute to maintain soil fertility and compensate the loss of nutrients (Chiew et al., 2015; Paradelo et al., 2013). Specifically, a local factory

produces soy milk and tofu and generates 20 t per week of soy residues following grain processing. These soy residues are currently treated by composting and/or used for livestock feed. Furthermore, these soy residues are rich in water-insoluble ingredients including fiber in its majority, but also protein, fat, starch and sugar. Thus, they can be potentially used as high quality media for fermentation (Hiesh and Yang, 2004). About 1.1 kg of fresh residue has been reported to be produced from every kilogram of soybeans processed into soy milk or tofu (Khare et al., 1995). In fact, different researchers explored the possibilities of soy wastes as raw material in the production of organic acids, acetone, butanol, ethanol or enzymes from fermentable sugars (Karki et al., 2011).

There is also the novel possibility of obtaining a soil amendment with added biopesticide properties through solid-state fermentation processes in presence of *Bacillus thuringiensis* (Bt). Solid-state fermentation (SSF) has been defined as the fermentation process that involves a solid matrix and it is performed in the absence or near absence of free water on a substrate possessing enough moisture to ensure microorganisms' growth and metabolism (Pandey, 2003). The SSF process has been used in different studies

<sup>\*</sup> Corresponding author.

E-mail address: [adriana.artola@uab.cat](mailto:adriana.artola@uab.cat) (A. Artola).

<sup>1</sup> Both authors contributed equally.



for the production of high value added products such as enzymes, biofuel, biosurfactants and biopesticides from many residues, mostly working at laboratory scale (Murthy and Naidu, 2012; Singhania et al., 2009). Thus, SSF is also presented as a viable technique for waste valorization as a source of valuable products to be considered in a biorefinery scheme (Forster-Carneiro et al., 2013).

On the other hand, *B. thuringiensis* (Bt) is a spore former, facultative anaerobic gram-positive bacterium present in soil, water and plant surfaces. It is a producer of a parasporal crystal protein also called  $\delta$ -endotoxin. The toxin has a great potential to cause mortality to insects belonging to different orders such as Diptera, Coleoptera and Lepidoptera, pests that destroy more than 40% of the world's food, forage, and fiber production. Conversely, these toxins are innocuous for plants, animals and human beings. The biopesticides used in biological control of plagues are an environmentally safe alternative to synthetic pesticides. They have been used worldwide for many years for food crops and forestry pests (Chandler et al., 2011).

The production of Bt based-biopesticides has been studied mainly by submerged fermentation and applied at industrial scale, with few studies in solid-state fermentation. In these cases, different wastes have been used as substrates, such as soy residues, wastewater treatment sludge, kitchen waste, wheat bran, among others (Devi et al., 2005; Zhang et al., 2013; Zhuang et al., 2011). So far, all the SSF studies have been performed under sterile conditions and mesophilic temperatures (Pham et al., 2010; Smitha et al., 2013).

Taking advantage of the ability of Bt to produce spores in adverse conditions, the aim of this study is to valorize soy fiber residue (from food industry) by SSF to obtain a soil amendment with the biopesticide effect of Bt. In this sense, the challenge is to make this specific bacterium grow in soy fiber residue under SSF process without sterilization and under self-heating conditions (which is the case of SSF at real scale with significant amounts of waste) including two scales (500 mL and 10 L reactors). This is, to our knowledge, the first study conducted under these conditions, as a viability waste valorization test for future application at industrial scale as a management option for different biodegradable organic residues including industrial, agricultural and municipal wastes.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Materials

Soy fiber residue (95.9% organic matter, C/N 12.2, pH 7.35) from a local food industry in Barcelona (Spain) was used as substrate in valorization tests. Wood sticks were mixed with soy fiber (1:1, v:v) to add structure to the solid matrix and compensate the soy waste high moisture content (83.78%). Soy fiber residue presented a dynamic respiration index (DRI) of  $4.7 \pm 0.2 \text{ g O}_2 \text{ kg}^{-1} \text{ DM h}^{-1}$  that indicates a high biodegradability (Ponsá et al., 2010), due to its N and C content and availability. A strain of *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* (ATCC 35866) was used in this study.

### 2.2. SSF at 500 mL and 10 L reactors

Both 500 mL and 10 L reactors were equipped with temperature, airflow and oxygen monitoring and online calculation of the specific oxygen uptake rate, sOUR. This value was calculated as the difference in O<sub>2</sub> content of input and output airflow per amount of dry matter present in the reactor, following Equation (1):

$$sOUR = F(0.209 - y_{O_2}) \frac{P \times 60 \times 32}{R \times T \times DM} \quad (1)$$

where sOUR is the specific oxygen uptake rate ( $\text{g O}_2 \text{ kg}^{-1} \text{ DM h}^{-1}$ ); F, the airflow in the reactor ( $\text{L min}^{-1}$ );  $y_{O_2}$ , is the oxygen molar fraction in the exhaust gases ( $\text{mol O}_2 \text{ mol}^{-1}$ ); P, the pressure of the system assumed constant at 101,325 Pa; 32 is the oxygen molecular weight ( $\text{g O}_2 \text{ mol}^{-1}$ ); 60 is the conversion factor from minute to hour; R, the ideal gas constant ( $8310 \text{ Pa L K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$ ); T, the temperature at which F is measured (K) and DM, the dry matter present in the reactor (kg).

The experiments at 500 mL scale were performed at constant temperature (30 °C) in triplicate both in sterile and non-sterile conditions as well as control test (without Bt inoculation, in triplicate) for a period of 6 days, using 100 g of soy residue with 5–10% Bt as inoculum and properly mixed with wood sticks as bulking agent (15 g). Constant aeration was provided at  $15 \text{ mL min}^{-1}$ .

Experiments at 10 L scale were performed with 2300 g of mixture operating under near-adiabatic conditions (no temperature control). Aeration was provided following a control strategy with sOUR as the control parameter in order to maximize biological activity as detailed in Puyuelo et al. (2010). Runs were undertaken for 20 days, taking samples in days 0, 6, 9, 13, 16 and 20. The mixture was prepared by first mixing soy fiber and Bt inoculum (10%), and adding in a second step wood sticks as bulking agent in a wet weight ratio of 1:1.

Inoculum for SSF was prepared by culturing Bt in 5 mL nutrient broth (Oxoid®, Powder 1%, Peptone 1%, NaCl 0.5%) at 30 °C and 130 rpm for 3 h, then 1 mL of the mixture was transferred to a 500 mL Erlenmeyer flask with 100 mL of liquid medium until achieving 24 h of growing. Biomass was centrifuged (3500 rpm) and the concentrated inoculum was applied to the substrate in the 500 mL reactors. In the case of 10 L reactors, a Bt-soy fiber mixture obtained by SSF in 24 h at 500 mL scale (attaining viable cells and spore counts of  $3.5 \cdot 10^9$  and  $4.6 \cdot 10^9$  CFU  $\text{g}^{-1}$  DM) was used as inoculum.

### 2.3. Analytical methods

Viable cells were quantified by mixing 10 g of solid sample with 90 mL of Ringer solution (NaCl 0.225%, KCl 0.001%, CaCl<sub>2</sub> 0.012%, NaHCO<sub>3</sub> 0.005%) in a shaker at 130 rpm for 30 min. Serial dilutions were prepared from this mixture, then plated on nutrient agar petri dishes and incubated at 30 °C during 18 h. Manual counting of viable cells was performed afterwards. To quantify the spore's content, the diluted sample was maintained at 80 °C during 10 min, followed by 5 min in a cold bath (iced bath) (Zhuang et al., 2011). After this, the same procedure for viable cells was applied. In both cases, results were expressed as the mean value of triplicates. The viable cells are expressed as CFU (colony forming units) per gram of dry matter of the solid matrix. Gram stain was used to differentiate and identify Bt in the mixture and malachite green (Brock et al., 1984) was used as a differential stain for bacterial endospores. Scanning electron microscopy (SEM) was used (Evo® MA10, Carl Zeiss) in order to identify the toxin morphologically.

The dynamic respiration index (DRI) of initial mixtures and final products was measured in triplicate using a dynamic respirometer (Ponsá et al., 2010) to evaluate the degree of biological stability and final material stability. In this analysis, 100 g waste sample was placed in an Erlenmeyer flask, containing a plastic net to support the organic waste and provide an air distribution chamber, placed in a water bath at 37 °C (Barrena et al., 2005). Airflow in the reactors was manually adjusted by means of an air flow controller (Bronkhorst Hitec, the Netherlands) to provide constant airflow, and

modified when necessary to ensure minimum oxygen content in exhaust gases of 10% v/v. Exhaust air from the flasks was sent to an oxygen sensor prior dehumidification in a water trap. Both air flow meters and oxygen sensors were connected to a data acquisition system to continuously record these values for DRI calculation. Equation (1) is also valid for DRI in the conditions of the analysis.

Germination tests were performed as proposed in Komilis and Tziouvaras (2009) using radish seeds. 10 g (ww) of the final material obtained in the 10 L reactors were mixed with deionized water in an Erlenmeyer flask at a ratio of 10:1 (water volume, in mL, to dry weight, in g) for 30 min at room temperature using a magnetic stirrer. The suspension was then filtered under vacuum using a 0.45- $\mu$ m filter. 10 radish seeds were plated in a Petri dish where also 10 mL of filtrate were added. A control test was performed adding 10 mL of deionized water instead of filtrate. Tests were undertaken in triplicate. Petri dishes were left at room temperature (22 °C) for seven days. After this period germinated seeds were counted and root length measured. Germination percentage and root length were expressed as a percentage of the corresponding values of the control (Komilis and Tziouvaras, 2009).

MacConkey agar medium N°2 (Oxoid®) as described by Brock et al. (1984) was used to evaluate the presence of *Enterobacteriaceae* in initial and final samples. As Bt toxicity has been related to protease activity, this parameter was also determined. The extraction and quantification of protease activity was realized as described previously by Abraham et al. (2013). One unit of alkaline protease activity was defined as 1  $\mu$ g of tyrosine released per minute and per g of DM of residue under the assay conditions. Moisture content, organic matter content, total organic carbon (TOC), total nitrogen Kjeldahl (TNK) and pH were determined according to the standard procedures recommended by the Test Methods for the Examination of Composting and Compost (2001).

### 3. Results and discussion

In a first step, the viability of Bt growth on soy fiber residue was tested at lab scale (500 mL Erlenmeyer reactors) under sterile and non-sterile conditions. Afterwards, to attain the main objective of this work, experiments working under non-sterile and self-heating conditions as well as at a pilot scale (10 L reactors) were undertaken, simulating the conditions performed at industrial scale.

#### 3.1. SSF experiments at 500 mL scale

SSF experiments were first performed in sterile conditions to check the capability of Bt to grow in soy fiber residue. sOUR profiles clearly showed the development of Bt in the solid matrix. The maximum rate of oxygen consumption (sOUR max) was  $2.8 \pm 0.2$  g

O<sub>2</sub> kg<sup>-1</sup> DM h<sup>-1</sup>, reached at day 2, after a lag phase of  $16 \pm 8$  h (Table 1). The cumulative oxygen consumption for four days (COC<sub>4</sub>) was  $236 \pm 2$  g O<sub>2</sub> kg<sup>-1</sup> DM.

Viable cells and spore count were performed in one of the triplicates. Gram and malaquite green stains were used to confirm the presence of Bt during the fermentation using microscopy ( $\times 100$ ). CFU at the moment of maximum sOUR were higher than the initial inoculum ( $6.2 \times 10^{11}$  compared to  $1.5 \times 10^9$  CFU g<sup>-1</sup> DM) and remained at that order of magnitude. Besides, the amount of spores counted at final stage (6 days) was  $8.6 \times 10^{10}$  spores g<sup>-1</sup> DM. Both parameters showed the adequate development of Bt in the selected solid matrix and agreed with previous SSF studies. Devi et al. (2005) found that the production of Bt at lab scale on sterile wheat bran medium was  $6.6 \times 10^{10}$  spores g<sup>-1</sup> DM and  $1 \times 10^{11}$  spores g<sup>-1</sup> DM when enriching medium with C and N sources.

Brar et al. (2007) and Yezza et al. (2006) found a correlation between the toxicity of Bt (spore formation), the cell count and the protease activity produced in submerged fermentation experiments on Bt growth on sterile conventional media, wastewater and wastewater sludge. Thus, protease activity was also determined in this work. Protease activity values obtained in days 3 and 6 were  $1282 \pm 32$  and  $1357 \pm 18$  U g<sup>-1</sup> DM respectively. The protease yield was much higher than that obtained in SmF at the same scale in sterile conditions ( $336 \pm 8$  U g<sup>-1</sup> DM) and in previous SSF experiments using the same residue in non-sterile conditions without the addition of Bt ( $310 \pm 9$  U g<sup>-1</sup> DM, Abraham et al., 2013).

With the aim of checking the viability of valorizing the waste as obtained from the industrial process, a second experiment was performed in non-sterile conditions. The amount of inoculum was increased from 5 to 10% due to the possibility of major competition with autochthonous microorganisms. The experiment was performed twice (Test 1 and Test 2) in triplicate using soy fiber collected at the food industry in two different days. The results of the fermentation are summarized in Table 1. Values for sOURmax and COC<sub>4</sub> obtained in SSF in presence of Bt were lower than the values obtained in the reactors without Bt addition. Total oxygen consumed in Bt reactors was 13% and 10% less than in non-inoculated soy fiber reactors. Bt growth can induce a reduction of biodiversity in the solid matrix, implying lower rates of oxygen consumption compared to the native microbial population. Contrarily, the lag phase was shorter in Bt experiments (21% and 69% respectively), suggesting a fast adaptation of Bt during the initial phase of SSF. Values of sOURmax under non-sterile conditions are higher than those obtained in the tests with the sterilized soy residue while the lag phase is shorter when non-sterilized waste is used. This comparison suggests that the activity of Bt progresses in parallel to the activity of the microorganisms originally present in soy fiber residue contributing to organic matter

**Table 1**

Parameters obtained in sterile and non-sterile SSF experiments of soy fiber residue with Bt inoculum (6 days of fermentation).

	sOURmax (g O <sub>2</sub> kg <sup>-1</sup> DM h <sup>-1</sup> )	COC <sub>4</sub> (g O <sub>2</sub> kg <sup>-1</sup> DM)	Lag phase (h)	Final spore count (CFU g <sup>-1</sup> DM)	Final viable cells (CFU g <sup>-1</sup> DM)	Protease Activity (U g <sup>-1</sup> DM)
Sterile test						
Soy + Bt ( $1.5 \times 10^9$ CFU g <sup>-1</sup> DM)	$2.8 \pm 0.2$	$236 \pm 2$	$16 \pm 8$	$8.6 \times 10^{10}$	$6.2 \times 10^{11}$	$1282 \pm 32$ (3d) $1357 \pm 18$ (6d)
Test 1 (non-sterile)						
Soy	$6.5 \pm 0.7$	$325 \pm 1$	$6.5 \pm 1.0$	n.a.	n.a.	n.a.
Soy + Bt ( $4.3 \times 10^9$ CFU g <sup>-1</sup> DM)	$4.8 \pm 0.7$	$292 \pm 13$	$5.2 \pm 0.6$	$1.3 \times 10^8 \pm 2.83 \times 10^7$	$3.8 \times 10^9 \pm 7.7 \times 10^7$	$616 \pm 18$ (3d) $497 \pm 17$ (6d)
Test 2 (non-sterile)						
Soy	$7.0 \pm 0.9$	$319 \pm 51$	$4.6 \pm 1.5$	n.a.	n.a.	n.a.
Soy + Bt ( $4.3 \times 10^9$ CFU g <sup>-1</sup> DM)	$5.9 \pm 1.6$	$277 \pm 20$	$1.4 \pm 0.5$	n.a.	n.a.	n.a.

sOUR: specific oxygen uptake rate; COC<sub>4</sub>: cumulative oxygen consumption in 4 days; n.a. not analyzed. Results are a mean  $\pm$  SD of three values.

degradation and stabilization.

Protease activity values obtained after 3 and 6 days of experiment were  $616 \pm 18$  and  $497 \pm 17 \text{ U g}^{-1} \text{ DM}$  respectively, values clearly lower than those obtained on sterile soy waste and higher than those reported in Abraham et al. (2013) for non-sterile soy residue without Bt addition. Thus, the presence of Bt increases the production of proteases from non-sterile soy fiber waste although better conditions for the production of these enzymes seem to be found under sterile conditions.

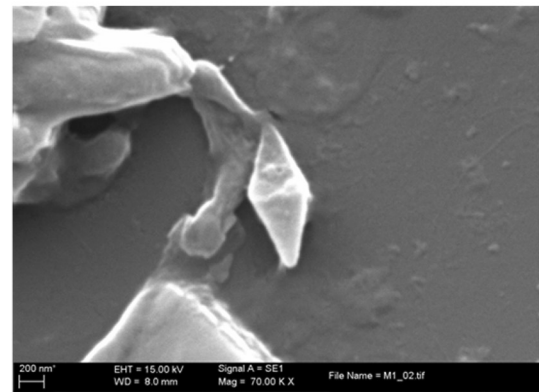
Viable cells and spore counts were performed only in one of the replicates. The results showed a slight decrease in the number of viable cells during the experiment (from an initial value of  $4.3 \times 10^9$  to a value of  $3.6 \times 10^8 \text{ CFU g}^{-1} \text{ DM}$  at day 6) probably due to the consumption of the nutrients and to the ending of the exponential Bt growth, or due to competition with other microorganisms. Finally, at 6 days of SSF, a production of spores due to adverse conditions was detected ( $1.3 \times 10^8 \text{ spores g}^{-1} \text{ DM}$ ). Viable cells and spores in the final material indicate that Bt is able to survive in a non-sterile soy fiber waste after 6 days of a SSF process. SEM (Scanning Electron Microscopy) image in Fig. 1a reveals the presence of the toxin produced by Bt since this toxin has rhomboidal shape and has been previously recognized using this technique (Swiecicka et al., 2008).

### 3.2. 10 L reactors scale-up

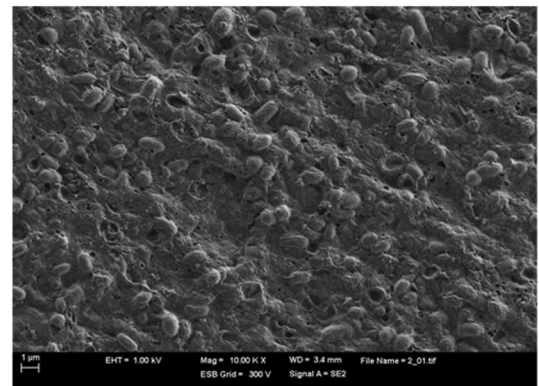
Bt growth was investigated under non-sterile conditions and with no temperature control (self-heating of the material) in 10 L adiabatic reactors simulating the real conditions that would be found in a full-scale SSF, composting-like, process. The metabolic heat generated during waste degradation was accumulated and a dynamic profile of temperature was developed. This allowed determining the effect of temperature on Bt growth and the possibility of waste hygienization. Fig. 2 shows temperature and sOUR profiles for a control reactor without inoculation (R1) and for the Bt inoculated reactors in duplicate (R2 and R3). Viable cells and spore counts are also shown for the latest (Fig. 2b and c). Table 2 summarizes the initial and final values of other process parameters (pH, water content and DRI) as well as initial and final total cell count, total oxygen consumption along the SSF processes and results of the germination tests. As stated above, aeration was provided according to a sOUR control strategy to maximize biological activity. There was a moisture increase in the material due to the use of completely closed reactors since a significant part of the water produced during SSF is retained inside the reactor as condensate in vessels' cover affecting moisture content of the upper material layers.

As can be seen in Fig. 2, temperature reached the thermophilic range ( $>45 \text{ }^\circ\text{C}$ ) in the first day of the process. Maximum temperatures achieved were  $60.1 \text{ }^\circ\text{C}$  (R1),  $63.3 \text{ }^\circ\text{C}$  (R2) and  $65 \text{ }^\circ\text{C}$  (R3) occurring in day 3 of process in the case of control reactor and in day 2 for reactors R2 and R3 containing Bt. Temperatures over  $45 \text{ }^\circ\text{C}$  were maintained during 6.3 days in R1, 3.6 and 4.7 days in R2 and R3 respectively. This difference can be due to the presence of Bt inoculum previously acclimated to soy waste and active in degrading organic matter at initial temperatures. Higher temperatures and higher sOUR values in R2 and R3 when compared to R1 could lead to a lower amount of degradable organic matter in Bt inoculated reactors to support a longer thermophilic phase. Lag phase in R2 and R3 is almost non-existent compared to R1 (12 h). Temperature and sOUR profiles show a peak after material sampling and mixing (days 5 and 8) due to the enhancement of organic matter availability as observed by Abraham et al. (2013). Total oxygen consumed (Table 2) shows no real difference between Bt inoculated reactors and control. Final DRI values are characteristic

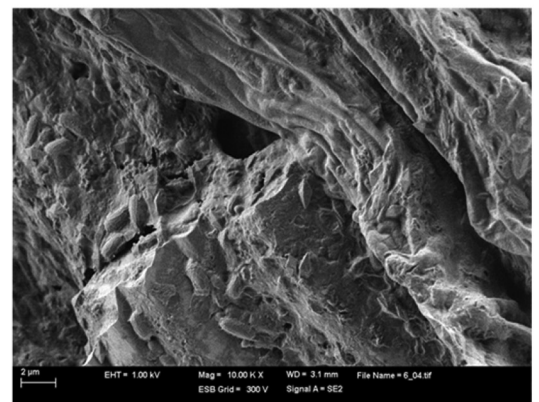
a)



b)



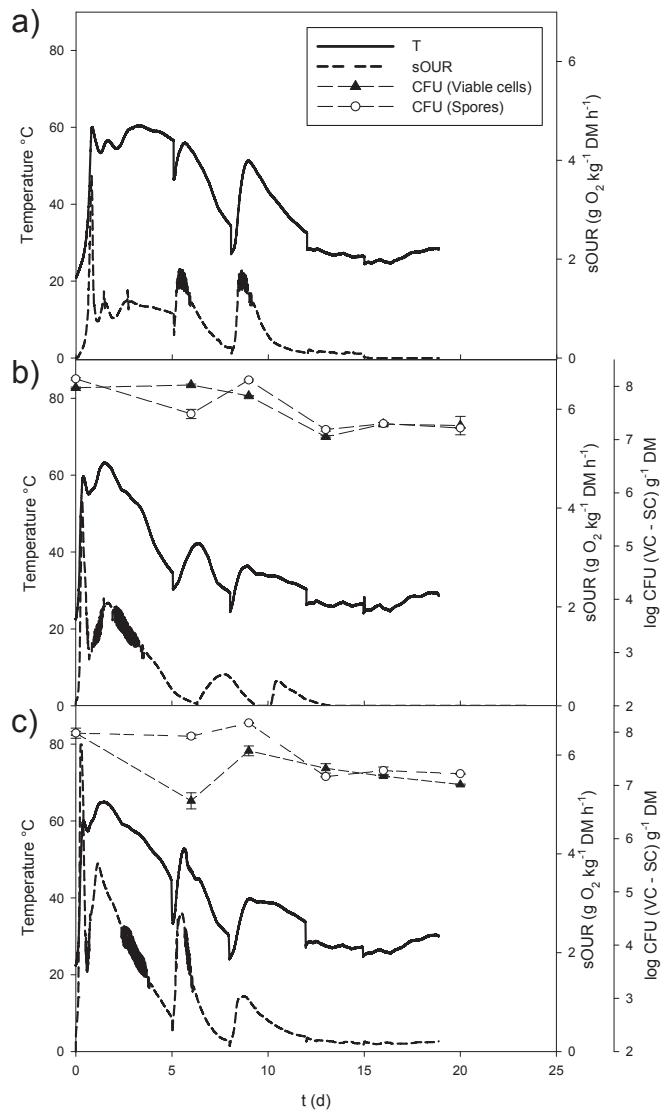
c)



**Fig. 1.** SEM images of the parasporal Bt crystal and spores: a) product obtained at lab scale (10kX) and samples taken after 60 h of process at 10 L reactors (70 kX) b) R2 and c) R3.

of a very stable material (Ponsá et al., 2010). Germination index over 100% in all samples indicate no phytotoxic effects of the material. Thus, the compost obtained in the three reactors can be considered as a mature and stable material adequate for soil application (Komilis and Tziouvaras, 2009).

Values of sOUR in Fig. 2 indicate significant microbial activity until day 10 of the process approximately in the three reactors. In this period, viable Bt cells were maintained almost constant in R2



**Fig. 2.** Temperature profile (solid line), sOUR evolution (dashed line), viable cells (VC) (triangle) and spore counts (SC) (circle) for SSF test 10 L Reactors: a) R1 (control, no Bt); b) R2 (Bt inoculated) and c) R3 (Bt inoculated).

**Table 2**

Initial and final values of pH, moisture, DRI, total O<sub>2</sub> consumed, viable, spores and total cell count in 10 L reactors.

Parameters	R1 (control, no Bt)		R2 (Bt)		R3 (Bt)	
	Initial	Final	Initial	Final	Initial	Final
Moisture (% wb <sup>a</sup> )	48.9	57.3	50.1	56.4	45.7	54.7
pH	6.69	9.10	7.33	9.01	7.25	8.94
DRI (g O <sub>2</sub> kg <sup>-1</sup> DM h <sup>-1</sup> )	2.1 ± 0.5	0.19 ± 0.02		0.27 ± 0.01		0.33 ± 0.03
Total O <sub>2</sub> consumed (g)		418.2		317.4		516.2
Germination index (%)		134 ± 21		115 ± 20		146 ± 22
Bt Viable cell count (CFU g <sup>-1</sup> DM)	0	0	$9.3 \times 10^7 \pm 0.3 \times 10^7$	$1.8 \times 10^7 \pm 0.7 \times 10^7$	$9.6 \times 10^7 \pm 1.6 \times 10^7$	$1.7 \times 10^7 \pm 0.1 \times 10^7$
Bt Spore count (CFU g <sup>-1</sup> DM)	0	0	$1.4 \times 10^8 \pm 0.1 \times 10^8$	$1.7 \times 10^7 \pm 0.1 \times 10^7$	$9.6 \times 10^7 \pm 0.8 \times 10^7$	$1.0 \times 10^7 \pm 0.1 \times 10^7$
Enterobacteriaceae (CFU/g)	$7 \cdot 10^2$	nd <sup>b</sup>	$4 \cdot 10^2$	nd	$2 \cdot 10^2$	nd

<sup>a</sup> wb: wet basis.

<sup>b</sup> nd: not detected.

highest spore and viable cells concentration with enough stability of final product. In any case, results evidence that Bt can resist thermophilic temperatures that would be achieved in a full-scale waste treatment plant during waste processing and is capable of competing with microorganisms already present in soy waste without addition of supplementary nutrient or applying any pre-treatment to waste. This fact will enhance the possibilities of industrial scale utilization of soy fiber residue for Bt enriched soil amendment production. Zhuang et al. (2011) obtained values over  $10^{10}$  for viable Bt cells and spore counts working with sterilized sewage sludge in 8 L SSF reactors operating at constant temperature, enhancing Bt growth with the addition of wheat bran and straw powder. Zhang et al. (2013) attributed to the difficulty of maintaining process temperature at desired values the decreased in spore count from  $10^{10}$  working with 4 kg to  $10^5$  working with 50 kg of sterilized kitchen waste.

Finally, SEM images of the final material in R2 and R3 (Fig. 1b and c) show Bt spores and the characteristic rhomboidal shape  $\delta$ -endotoxin crystals, confirming presence of Bt in the fermented solid matrix. The protease activity values obtained in R2 and R3 were 392 and 290 U g<sup>-1</sup> DM respectively and correspond to the period of maximum biological activity and maximum temperature achieved in the SSF process. These values were lower than the obtained at 500 mL scale at the same conditions but 30 °C. Temperature rise in 10 L reactors due to scale up could affect the production of these enzymes.

In addition, hygienization tests of final product were performed. While enterobacteriaceae were present in fresh waste samples, they were absent in the final material from R1, R2 and R3 (Table 2). Thus, a sanitized material was obtained with a significant content of Bt cells and spores in the cases of R2 and R3.

In conclusion, the results obtained at different scales, mainly in 10 L reactors, confirm the possibility of soy fiber waste valorization by means of SSF process through a product that can serve as soil amendment with enhanced biopesticide effect. This process can be also explored as potential valorization route for other type of organic wastes as obtained in the industrial plant or collection system, including organic fraction of municipal solid wastes, wastewater sludge or other agro or food industrial wastes.

## Acknowledgments

The authors thank the financial support of the Spanish Ministry

and R3 to decrease afterwards. Spore count decreased after temperature peak in both reactors to rise again in day 8 before the final descent to  $1.7 \times 10^7$  CFU g<sup>-1</sup> DM and  $1 \times 10^7$  CFU g<sup>-1</sup> DM in R2 and R3 respectively. The duration of process must be optimized to the

of Economía y Competitividad (CTM 2012-33663) with FEDER funding, Natursoy<sup>®</sup> for the material provided and Dr. Calvo Torras from Department of Microbiology and Health Service, Veterinary School, UAB. C. Ballardo thanks the Peruvian Government for the

President of the Republic Scholarship (PRONABEC).

## References

- Abraham, J., Gea, T., Sánchez, A., 2013. Potential of the solid-state fermentation of soy fiber residues by native microbial populations for bench-scale alkaline protease production. *Biochem. Eng. J.* 74, 15–19.
- Barrena, R., Vázquez, F., Gordillo, M.A., Gea, T., Sánchez, A., 2005. Respirometric assays at fixed and process temperatures to monitor composting process. *Biores Technol.* 96, 1153–1159.
- Brar, S.K., Verma, M., Tyagi, M.D., Surampalli, R.Y., Barnabé, S., Valéro, J.R., 2007. *Bacillus thuringiensis* proteases: production and role in growth, sporulation and synergism. *Process Biochem.* 42, 773–790.
- Brock, T.D., Smith, D.W., Madigan, M.T., 1984. *Biology of Microorganisms*, fourth ed. Prentice-Hall, Inc., Englewood Cliffs, NJ.
- Chandler, D., Bailey, A.S., Tatchel, G.M., Davidson, G., Greaves, J., Grant, W.P., 2011. The development, regulation and use of biopesticides for integrated pest management. *Philos. T Roy. Soc. B* 366, 1987–1998.
- Chiew, Y.L., Spångberg, J., Baky, A., Hansson, P.A., Jönsson, H., 2015. Environmental impact of recycling digested food waste as a fertilizer in agriculture—A case study. *Resour. Conserv. Recy* 95, 1–14.
- Devi, P.S.V., Ravinder, T., Jaidev, C., 2005. Cost-effective production of *Bacillus thuringiensis* by solid-state fermentation. *J. Invertebr. Pathol.* 88, 163–168.
- Forster-Carneiro, T., Bernib, M.D., Dorileoc, I.L., Rostagno, M.A., 2013. Biorefinery study of availability of agriculture residues and wastes for integrated bio-refineries in Brazil. *Resour. Conserv. Recy* 77, 78–88.
- Hiesh, C., Yang, F.C., 2004. Reusing soy residue for the solid-state fermentation of *Ganoderma lucidum*. *Biores Technol.* 91, 105–109.
- Karki, B., Maurer, D., Kim, T.H., Jung, S., 2011. Comparison and optimization of enzymatic saccharification of soybean fibers recovered from aqueous extractions. *Biores Technol.* 102, 1228–1233.
- Khare, S.K., Jha, K., Gandhi, A.P., 1995. Citric acid production from okara (soy-residue) by solid-state fermentation. *Biores Technol.* 54, 323–325.
- Komilis, D.P., Tziouvaras, I.S., 2009. A statistical analysis to assess the maturity and stability of six composts. *Waste Manage.* 29, 1504–1513.
- Murthy, P.N., Naidu, M.M., 2012. Sustainable management of coffee industry by-products and value addition—A review. *Resour. Conserv. Recy* 66, 45–58.
- Pandey, A., 2003. Solid-state fermentation. *Biochem. Eng. J.* 13, 81–84.
- Pham, T.T.H., Brar, S.K., Tyagi, R.D., Surampalli, R.Y., 2010. Optimization of Fenton oxidation pre-treatment for *B. thuringiensis* – based production of value added products from wastewater sludge. *J. Environ. Manage.* 91, 1657–1664.
- Paradelo, R., Moldes, A.B., Barral, M.T., 2013. Evolution of organic matter during the mesophilic composting of lignocellulosic winery wastes. *J. Environ. Manage.* 116, 18–26.
- Ponsá, S., Gea, T., Sánchez, A., 2010. Different indices to express biodegradability in organic solid wastes. *J. Environ. Qual.* 39, 706–712.
- Puyuelo, B., Gea, T., Sánchez, A., 2010. A new control strategy for composting process based on the oxygen uptake rate. *Chem. Eng. J.* 165, 161–169.
- Singhania, R.R., Patel, A.K., Soccol, C.R., Pandey, A., 2009. Recent advances in solid-state fermentation. *Biochem. Eng. J.* 44, 13–18.
- Smitha, R.B., Jisha, V.N., Pradeep, S., Josh, M.S., Benjamin, S., 2013. Potato flour mediated solid-state fermentation for the enhanced production of *Bacillus thuringiensis*-toxin. *J. Biosci. Bioeng.* 116, 595–601.
- Swiecicka, I., Bideshi, D.K., Federici, B.A., 2008. Novel isolate of *Bacillus thuringiensis* subsp. *thuringiensis* that produces a quasicuboidal crystal of Cry1Ab21 toxic to larvae of *Trichoplusia ni*. *Appl. Environ. Microb.* 74, 923–930.
- Test Methods for the Examination of Composting and Compost, 2001. The US Department of Agriculture and the US Composting Council, Edaphos International, Houston, USA.
- Yezza, A., Tyagi, R.D., Valéro, J.R., Surampalli, R.Y., 2006. Bioconversion of industrial wastewater and wastewater sludge into *Bacillus thuringiensis* based bio-pesticides in pilot fermentor. *Biores Technol.* 97, 1850–1857.
- Zhang, W., Qiu, L., Gong, A., Cao, Y., Wang, B., 2013. Solid-state fermentation of kitchen waste for production of *Bacillus thuringiensis*-based bio-pesticide. *BioResources* 8, 1124–1135.
- Zhuang, L., Zhou, S., Wang, Y., Liu, Z., 2011. Cost-effective production of *Bacillus thuringiensis* biopesticides by solid-state fermentation using wastewater sludge: effects of heavy metals. *Biores Technol.* 102, 4820–4826.