

Degradación anaeróbica de desechos agrícolas por consorcios microbianos para la producción de polihidroxicanoatos

Anaerobic digestion of agricultural waste by microbial consortia for the polyhydroxyalkanoates production

Ricardo Grados Torrez ¹, María Teresa Álvarez Aliaga ¹, Alberto Gimenez Turba ¹, Bo Mattiasson ².

¹Área de Biotecnología, Instituto de Investigaciones Fármaco Bioquímicas, Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímicas, Universidad Mayor de San Andrés. La Paz, Bolivia.

²Department of Biotechnology, Lund University. SE-221 00 Lund, Sweden.

Dirección para correspondencia: Ricardo Grados Torrez. Instituto de Investigaciones Fármaco Bioquímicas, Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímicas, Universidad Mayor de San Andrés. Av. Saavedra 2224. La Paz, Bolivia.
E mail: ricnk@hotmail.com

RESUMEN

Los Polihidroxicanoatos (PHAs) surgieron como una respuesta a la problemática medioambiental ocasionada por la acumulación del polietileno, así en este trabajo se realizó la producción de PHAs en dos etapas: 1) la producción de ácidos grasos volátiles (AGVs) por los consorcios TACANA, ISA y OSCAR a partir de desechos agrícolas: cebada (*Hordeum vulgare*), quinua (*Chenopodium quinoa*), soya (*Glycine max*), avena (*Avena sativa*), trigo (*Triticum sativum*), alfa (*Medicago sativa*) y cascarilla de arroz (*Oryza sativa*). Se demostró que en la digestión anaeróbica de la paja de cebada por el consorcio TACANA se produjo una mayor cantidad de AGVs (6.85 g/L), al optimizar las condiciones. La producción de AGVs fue incrementada en más de un 60% (10.62g/L), además la actividad enzimática de cultivos en batch mostró que existe una mayor actividad exocelulolítica y exoxilanolítica a comparación con las actividades endocelulolíticas y endoxilanolíticas, relacionado con la alta producción de AGVs. 2) En la segunda etapa los consorcios fueron sometidos a periodos de hambre de 4, 8 y 12 hrs, teniendo como fuente de carbono los AGVs. En esta prueba, por tinción con Negro Sudán se evidenció que el consorcio TACANA presentó una mayor cantidad de microorganismos capaces de acumular PHAs

De esta manera, la producción de PHAs a partir de cultivos mixtos en lugar de la utilización de cepas puras es una buena alternativa para el aprovechamiento en la escala industrial.

Palabras Clave: Polihidroxicanoatos, digestión anaeróbica, ácidos grasos volátiles.

ABSTRACT

Polyhydroxyalkanoates (PHAs) have been used as an alternative response to the environmental problems caused by polyethylene accumulation. Thus, the present work has been performed in two stages: (1) the volatile fatty acids (VFAs) production by TACANA, ISA and OSCAR consortia from agricultural waste, such as: barley (*Hordeum vulgare*), quinoa (*Chenopodium quinoa*), soybean (*Glycine max*), oats (*Avena sativa*), wheat (*Triticum sativum*), alfa (*Medicago sativa*) and rice husk (*Oryza sativa*), from these, the highest concentration of VFAs (6.85g/L) was obtained from anaerobic digestion of barley straw with TACANA consortia. The optimization of the conditions gave an increase of VFAs production in more than a 60% (10.62g/L). What's more, the enzyme activity from batch cultivation showed a clear increase in the exocellulolytic activity (6.85g/L), which is related to the high VFAs production. (2) In the second stage, the consortia were subjected to 4, 8 and 12 hrs of feast/famine periods with VFAs as carbon source. This evaluation was performed through a Sudan Black staining test, showing that TACANA consortia had the highest number of microorganisms able to accumulate PHAs.

It is in this way that it was proved that the PHAs production from mixed cultures is a good alternative to be used in industrial scale, instead of using pure strains.

Key Words: Polyhydroxyalkanoates, anaerobic digestion, volatile fatty acids.

INTRODUCCIÓN

El plástico es un polímero al que se le ha dado variados usos en la industria, la farmacéutica y el transporte entre otros, convirtiéndose en la base de la mayoría de los productos de consumo habituales. Este polímero se produce mayormente a partir de productos petroquímicos, perdura en la naturaleza por largos periodos de tiempo, no es biodegradable y se acumula, produciendo grandes cantidades de sustancias tóxicas que afectan notablemente el medio ambiente¹.

El plástico biodegradable surgió como alternativa a esta problemática medioambiental y en contraste con el plástico no biodegradable, éste se puede producir a partir de fuentes renovables de energía y puede ser biodegradado produciendo agua y dióxido de carbono. Existe una gran variedad de plásticos biodegradables: los plásticos naturales como el almidón y la celulosa, los plásticos producidos por microorganismos como los PHAs y los plásticos sintéticos como los polilactatos (PLAs), ambos por sus altas tasas de biodegradabilidad y sus excelentes propiedades físico-mecánicas han resultado ser los de más amplia aplicación en la actualidad².

Los PHAs son un grupo de poli-ésteres con características similares del plástico no biodegradable, debido a que los PHAs son biodegradables y a su capacidad de ser producidos a partir de fuentes renovables como los desechos agrícolas, estos PHAs son la materia prima para la producción de plástico biodegradable³.

Los ácidos grasos volátiles producidos en la digestión anaeróbica de desechos agrícolas son los sustratos preferidos para la producción de PHAs, ya que muchos microorganismos tienen la capacidad de transformar los AGVs en PHAs. Los PHAs forman gránulos en el citoplasma bacteriano, actuando como reserva de carbono y pueden ser extraídos para la producción de plástico biodegradable. Por otro lado la composición de estos AGVs puede influenciar en la producción de PHAs alterando las propiedades físicas y mecánicas del producto final. La producción de PHAs por cultivos mixtos es favorable económicamente debido a que las condiciones de esterilización y manipuleo son más simples que con un cultivo puro⁴.

Por los motivos anteriormente mencionados es que en el presente trabajo se realizó dos etapas: la primera etapa fue la selección del consorcio hidrolítico (TACANA, ISA u OSCAR) con la capacidad de producir la mayor cantidad de AGVs a partir de diferentes sustratos orgánicos provenientes de los desechos agroindustriales como la cebada (*Hordeum*

vulgare), quinua (*Chenopodium quinoa*), soya (*Glycine max*), avena (*Avena sativa*), trigo (*Triticum sativum*), alfa (*Medicago sativa*) y cascarilla de arroz (*Oryza sativa*). La segunda etapa fue la utilización de los AGVs obtenidos, para la producción de PHAs por diferentes cultivos mixtos.

MATERIAL Y MÉTODOS

Obtención de consorcios. Los consorcios TACANA, ISA y OSCAR fueron recolectados de Santa Rosa de Maravilla, Caranavi y Palos Blancos respectivamente.

Activación de los consorcios. Los consorcios fueron activados en medio anaeróbico fluido (Scharlaw) bajo condiciones de cultivo estacionarias (cultivo Batch)⁴ por un periodo de 7 días a 37°C de temperatura. A partir de este punto todas las pruebas se realizaron por triplicado.

Selección del consorcio productor de ácidos grasos volátiles. Botellas de 100 mL de capacidad se empacaron con 4g de cada uno de los siguientes desechos agrícolas: paja de cebada, paja de quinua, paja de soya, paja de avena, paja de trigo, paja de alfa y cascarilla de arroz. Se agregó 80 mL de Medio 11 (NH₄Cl 100 g/L, NaCl 10 g/L, MgCl₂.6H₂O 10 g/L, CaCl₂.2H₂O 5 g/L, K₂HPO₄.3H₂O 200 g/L, FeCl₃.4H₂O 1.5 g/L, H₃B₃O₃ 60 mg/L, HCl 25% 6.5 mL, CoCl₂.6H₂O 200 mg/L, MnCl₂.4H₂O 100 mg/L, NaMoO₄.2H₂O 25 mg/L, ZnCl₂ 70 mg/L, NiCl₂.6H₂O 25 mg/L, CuCl₂.2H₂O 15 mg/L, NaSeO₃ 3 mg/L, NaOH 0.5 g/L, NaHCO₃ 8.5 g/L) saturado con nitrógeno. Las botellas fueron selladas con anillas metálicas para su posterior autoclavado. Se inoculó cada botella con 5 mL de cada uno de los consorcios. Las condiciones de cultivo fueron de 37°C por 30 días, monitoreando la producción de AGVs totales, según el método que se describirá más adelante.

Diseño Factorial. Una vez seleccionado tanto el consorcio como el desecho agrícola que obtuvieron mejor producción de AGVs totales, se optimizaron las condiciones de cultivo tomando en cuenta la temperatura y la concentración de sustrato (desecho agrícola). (Tabla1).

Tabla 1. Categorización de las variables.

Variables	
Concentración de sustrato %	Temperatura
p/v	°C
5	4
7	Ambiente(8-18)
9	37

Cultivo Batch. Con los datos obtenidos de la optimización, se observó que en la hidrólisis de la paja de la cebada 9 % (p/v) con el consorcio TACANA se produjo una mayor cantidad de AGVs, por tanto se realizaron cultivos en Batch usando matraces erlenmeyer de 1L con 600mL de Medio 11 nitrogenado y 54 g de cebada. Después del autoclavado, se adicionó 40mL de tioglicolato al 2.5% y el pH fue regulado a 7.2 con NaOH 1N; se utilizaron tubos tygon autoclavados y todas las posibles entradas de aire fueron selladas con silicona para asegurar las condiciones anaeróbicas. La determinación de las actividades enzimáticas endo/exo celulolítica y endo/exo xilanolítica fue monitoreada diariamente durante 30 días, según el método que se describirá más adelante.

Selección de microorganismos capaces de producir PHAs. Los consorcios TACANA, ISA y OSCAR fueron cultivados en Medio 11 con glucosa al 10% a 37°C previa nitrogenación y adición de tioglicolato al 2.5% por un periodo de 1 semana hasta que los microorganismos entraron en fase de crecimiento estacionaria. Se realizaron ciclos de hambre de 4, 8 y 12 horas⁵ por un periodo de 30 días, utilizando los AGVs centrifugados y filtrados producidos anteriormente como fuente de carbono, de esta manera los microorganismos capaces de acumular PHAs sobrevivieron al periodo de hambre.

Determinaciones Analíticas. Determinación de AGVs totales. La cantidad de AGVs totales se determinó a través del método de titulación⁶. Este método se basa en la titulación de la muestra previamente centrifugada y filtrada (20 µm) con ácido sulfúrico 0.1 N desde un pH de 5 a 4, el volumen gastado es proporcional a la cantidad de AGVs totales presentes en la muestra.

Determinación del COD. Para determinar la demanda química de oxígeno (COD)⁷. La muestra fue filtrada (20 µm). Se realizó una dilución 1/200 con H₂O d, a 2.5 mL de esta dilución se añadió 1.5 mL de solución de digestión (4.913 g de K₂Cr₂O₇, 167 mL

H₂SO₄c, 3.33 g de HgSO₄ y H₂O d csp 1000 mL) y 3.5 mL de H₂SO₄(c), se incubó por 2 hrs a 150 °C en termobloque (Kleinfeld MBT 250). Finalmente la titulación se realizó con solución de sulfato de amonio ferroso usando ferroina como indicador.

Determinación de la actividad enzimática. La actividad enzimática de los consorcios bacterianos se determinó por el método modificado del ácido dinitrosalicílico (DNS) según Miller (1959) descrito por Alvarez⁷. A cuatro tubos con 50 µL de la muestra centrifugada 10 min a 2500 rpm en una microcentrífuga Eppendorf AG y filtrada (20 µm), se añadió 450 µL de Carboximetil celulosa 0.5 % , paranitrofenil glucopiranosido 0.5 % , xilano 0.2 % y paranitrofenil xilanopiranosido 0.2 % respectivamente uno en cada tubo, se incubó por 1 hr a 50 °C, se añadió 750 µL de DNS, se llevó a un baño en ebullición por 5 min y se midió la absorbancia a 540 nm contra un blanco en un lector de ELISA (Biotek ELx800).

Tinción de PHAs. La tinción se realizó con Negro Sudan⁴ para observar los gránulos intracitoplasmáticos de PHAs formados en los microorganismos después del periodo de hambre. Los microorganismos fueron fijados por calor al portaobjetos, la solución de tinción (3 g de Negro Sudan en 100 mL de etanol 70%) se dejó actuar por 15 min, la decoloración fue realizada con Xilol por 1 min, fucsina básica fue añadida como colorante de contraste por 1min, se lavó y se observó al microscopio (Carl Zeiss Standard 25 ICS) con un aumento de 100X.

RESULTADOS

La producción de AGVs totales a partir de la hidrólisis de los desechos agrícolas: paja de cebada, quinua, soya, avena, trigo, alfa y cascarilla de arroz, con los consorcios TACANA, ISA y OSCAR se observa en la Figura 1.

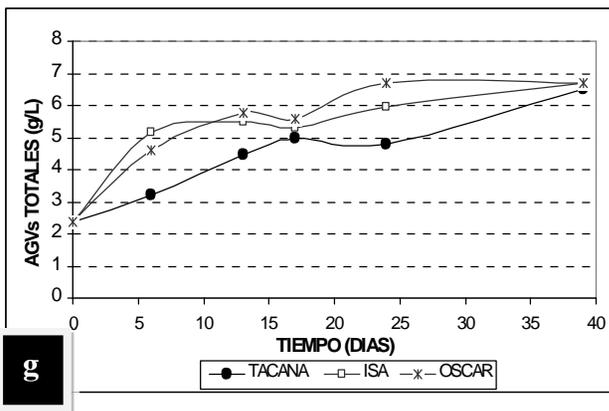
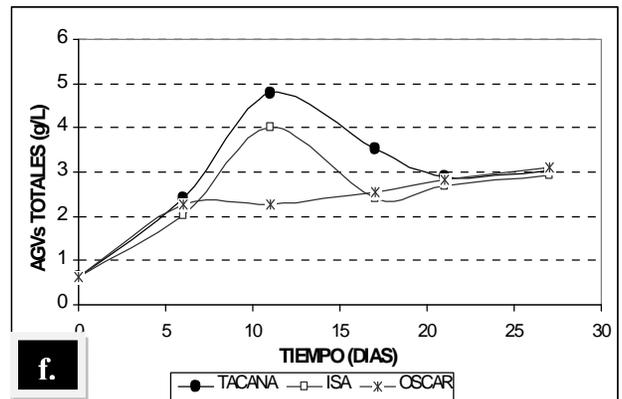
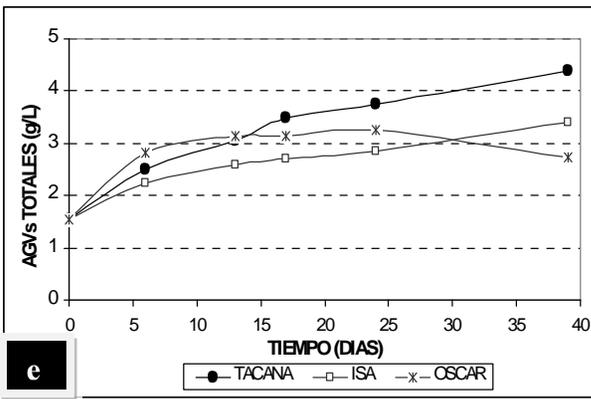
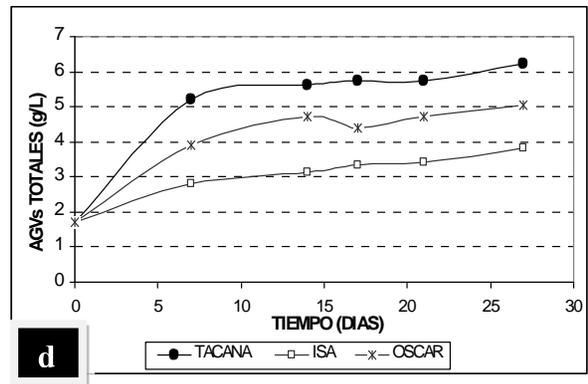
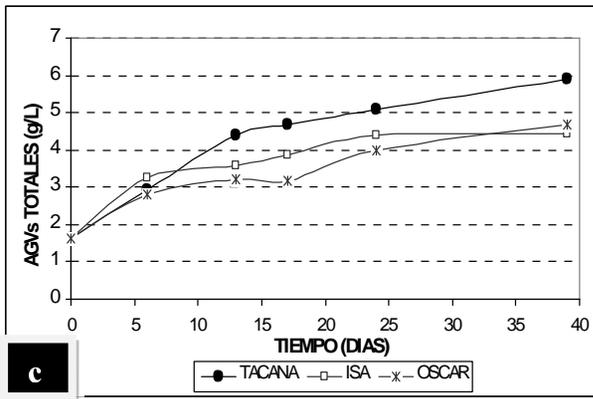
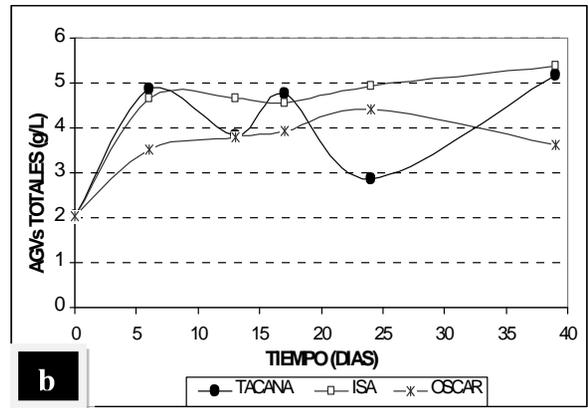
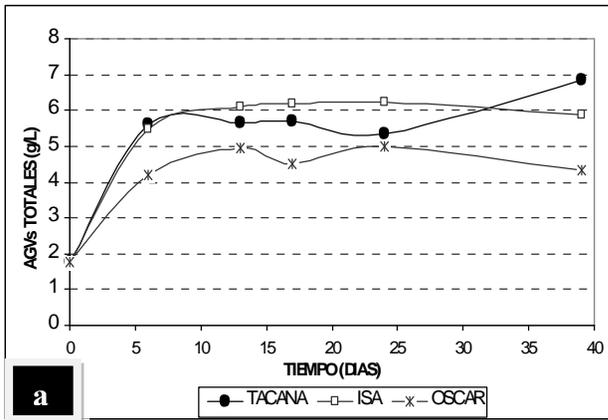
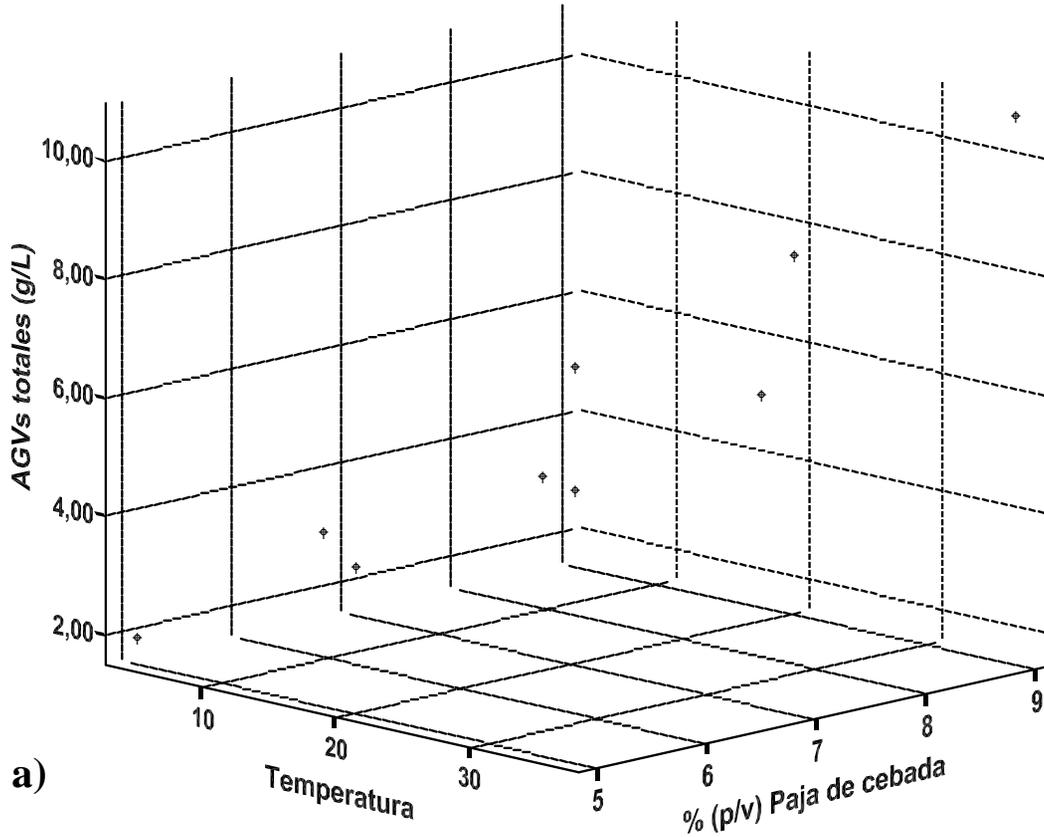


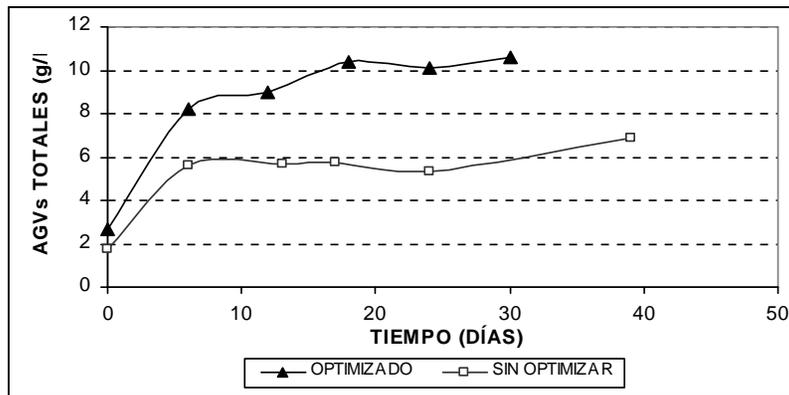
Figura 1. Producción de AGVs totales por los consorcios TACANA, ISA y OSCAR en un periodo de 30 días utilizando diferentes desechos agrícolas: pajas de a)Cebada b)Avena c)Trigo d) Quinua e) Alfa f)Cascarilla de arroz g) Soya.

En la optimización de las condiciones de cultivo se observó como resultado el incremento de la producción de AGVs de más del 60% alcanzando

10.62 g/L utilizando cebada al 9 % (p/v) a 37 °C (Figura 2).



a)



b)

Figura 2. a) Influencia de la temperatura y la concentración de sustrato en la producción de AGVs a partir de la hidrólisis de la paja de cebada por el consorcio TACANA. b) Incremento en la producción de AGVs totales por el consorcio TACANA en un periodo de 35 días.

La figura 3 muestra la actividad endo y exocelulolítica del consorcio TACANA y se observa que existe una mayor actividad exocelulolítica (1,661

UI/mL) comparada con la actividad endocelulolítica (0,517 UI/mL).

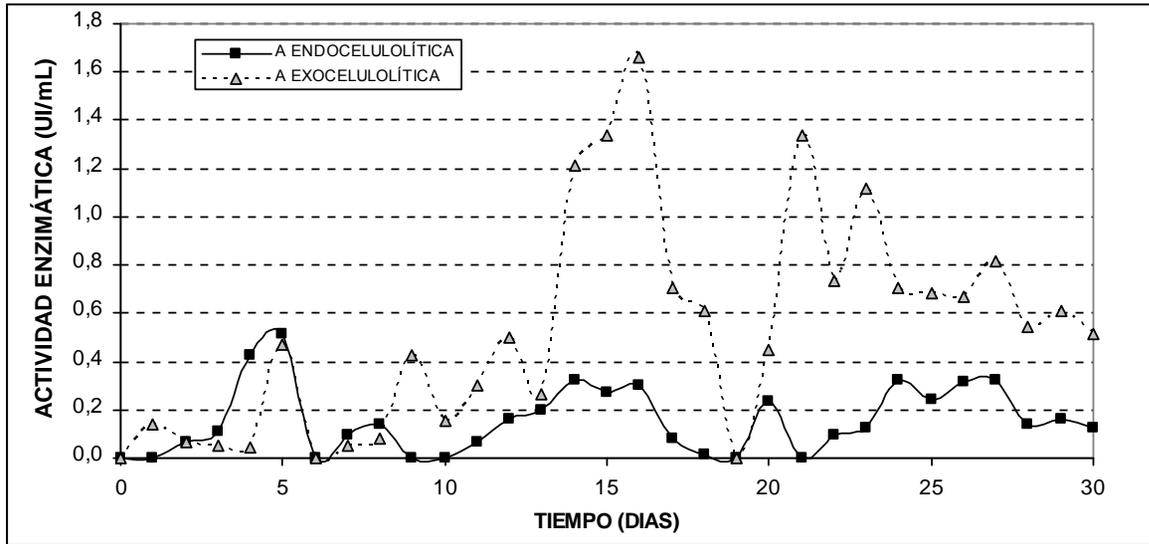


Figura 3. Actividad endo/exo celulolítica de la hidrólisis anaeróbica de la cebada al 9% (p/v) por el consorcio TACANA a 37°C.

La Figura 4, muestra la actividad endo y exoxilanolítica del consorcio TACANA y se observa que existe una mayor actividad exoxilanolítica (0,491

UI/mL) comparada con la actividad endoxilanolítica (0,042 UI/mL).

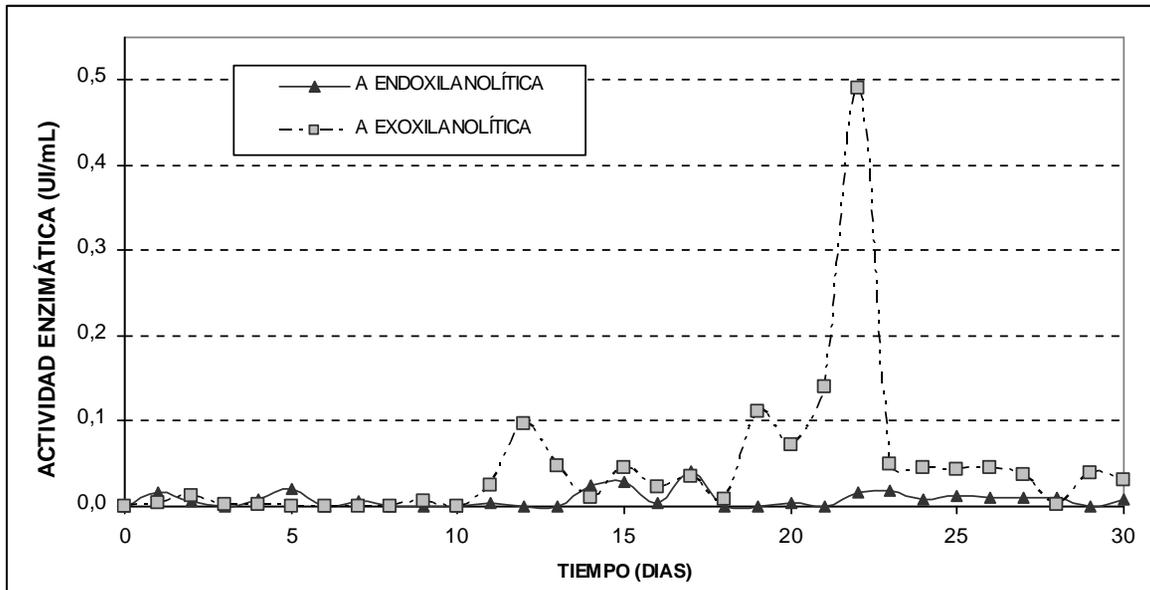


Figura 4. Actividad endo/exo xilanolítica de la hidrólisis anaeróbica de la cebada al 9% (p/v) por el consorcio TACANA a 37°C.

Los ciclos de hambreado dieron como resultado la acumulación de PHAs por los microorganismos

pertenecientes al consorcio TACANA en un ciclo de hambreado de 12hrs (Figura 5).

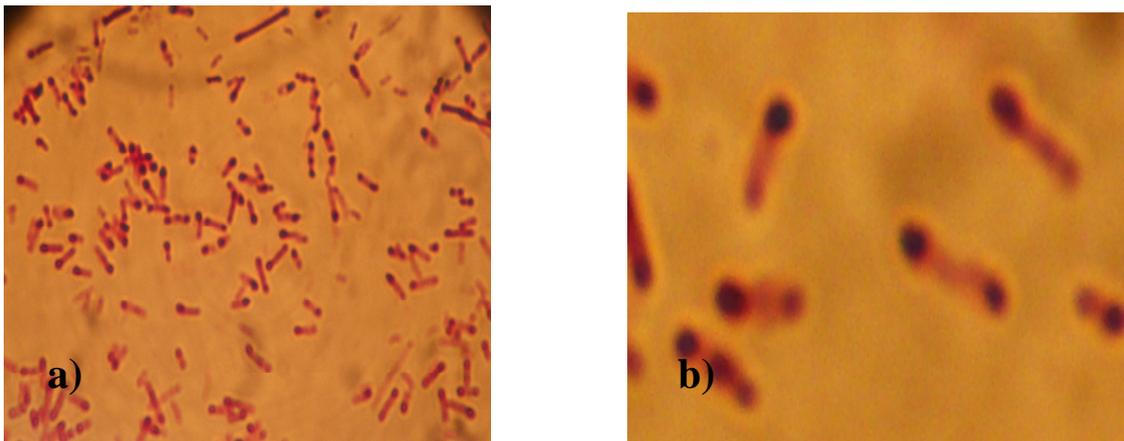


Figura 5. Gránulos de PHAs presentes en el consorcio TACANA a) 100x b) 700x.

DISCUSIÓN

La matriz orgánica de los residuos agrícolas está constituida principalmente por celulosa, hemicelulosa y lignina en proporciones variables de acuerdo a la especie vegetal⁸. Debido a que los microorganismos con la capacidad de acumular PHAs requieren moléculas simples como fuente de carbono, energía y material para acumular los PHAs en determinadas condiciones, la degradación o hidrólisis de la matriz orgánica es esencial para brindar moléculas fácilmente asimilables por estos microorganismos⁹.

En una primera etapa se demostró que todos los desechos agrícolas aquí señalados son hidrolizables unos más que otros, esto se puede verificar por las diferentes cantidades de AGVs producidos por los consorcios. La mayor cantidad de AGVs (6.85 g/L) fue producido por el consorcio TACANA utilizando 9% (p/v) de paja de cebada como sustrato a 37°C de temperatura de incubación (Figura 1a).

Posteriormente se determinó que tanto la temperatura como la concentración de paja de cebada influyen en la producción de AGVs totales por el consorcio TACANA (Figura 2a). Se observó un incremento en un 60 % de la concentración de AGVs totales, alcanzando un valor de 10.62 g/L, mucho mayor que los datos reportados por Chambi¹⁰. Estos datos también son corroborados por la actividad enzimática, cuya máxima actividad exocelulolítica (1,661 UI/mL) y máxima actividad exoxilanolítica (0.491 UI/mL), apoyan la relación directa que existe entre la actividad enzimática y la producción de AGVs⁸.

Debido a la diversidad de los microorganismos pertenecientes a un consorcio y a la posibilidad de seleccionar a determinados microorganismos en distintas condiciones de cultivo, se establecieron sistemas de cultivo batch para los tres consorcios y se sometieron a periodos de hambreado con la finalidad de encontrar microorganismos capaces de acumular PHAs en estas condiciones⁹. Se encontró de forma cualitativa que el consorcio TACANA presentó una mayor cantidad de estos microorganismos acumuladores, debido a que los microorganismos se adaptaron mejor a las condiciones de hambreado, lo que convierte a este consorcio en un candidato potencial para realizar el escalado del proceso.

Como perspectivas futuras se pretende determinar cuantitativamente la producción de PHAs¹. Determinar la cantidad de AGVs individuales (ácido acético, propiónico, butírico, valérico) producidos en la digestión anaeróbica¹¹. Determinar la influencia de la concentración de cada uno de estos AGVs individuales sobre la producción de PHAs⁹.

AGRADECIMIENTOS

A la Cooperación UMSA-ASDI-SAREC, que a través del proyecto Biodiversidad Microbiana financió el presente trabajo, al programa de Internado Rotatorio de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímicas, al C.I.P.T.A. por la colecta de consorcios microbianos en Santa Rosa de Maravilla, Caranavi y Palos Blancos

REFERENCIAS

1. Wendlandt D, Geyer W, Mirschel G. Possibilities for controlling a PHB accumulation process using various analytical methods. *J Biotechnol.* 2005; 117: 119-129.
2. Salehizadeh H, Van Loosdrecht M. Production of polyhydroxyalkanoates by mixed culture: recent trends and biotechnological importance. *Biotechnol adva.* 2004; 22: 261-279.
3. Reddy C, Ghai R, Rashmi, Kalia V. Polyhydroxyalkanoates: an overview. *Bioresour Technol.* 2003; 87: 137-146.
4. Bengtsson S, Werker A, Christensson M, Welander T. Production of polyhydroxyalkanoates by activated sludge treating a paper mill wastewater. *Bioresour Technol.* 2007; 99: 509-516.
5. Eiora M, Torrez C, Nunes BR, Reis M. Strategies for the development of a side stream process for polyhydroxyalkanoate (PHA) production from sugar cane molasses. *J Biotechnol.* 2007; 130: 411 – 421.
6. Buchauer K. A comparison of two simple titration procedures to determine volatile fatty acids in influents to wastewater and sludge treatment. *Processes. Water S.A.* 1998; 24: 49-56.
7. Alvarez M, Terrazas E. Manual para la producción y valoración de enzimas microbianas con interés biotecnológico. Instituto de Investigaciones Fármaco Bioquímicas, Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímicas, Universidad Mayor de San Andrés, La Paz; 2005.
8. Chávez G, Alvarez M, Giménez A. Precipitación de metales pesados con sulfuro de hidrógeno biogénico producido a partir de la degradación anaeróbica de material celulósico y xilanósico. [Tesis de maestría]. La Paz: Instituto de Investigaciones Fármaco Bioquímicas, Universidad Mayor de San Andrés; 2006.
9. Braunegg G, Lefebvre G, Genser K. Polyhydroxyalkanoates, biopolyesters from renewable resources: Physiological and engineering aspects. *J Biotechnol.* 1998; 65: 127 – 161.
10. Chambi E, Alvarez M, Giménez A. Optimización de las condiciones más favorables para la producción de biogas mediante digestión anaerobia de la paja de quinua (*Chenopodium quinua willdenow*) y cascarilla de arroz (*Oryza sativa*). [Tesis de Licenciatura]. La Paz: Instituto de Investigaciones Fármaco Bioquímicas, Universidad Mayor de San Andrés; 2007.
11. Abalos M, Bayona JM, Pawliszyn J. Development of a headspace solid-phase microextraction procedure for the determination of free volatile fatty acids in waste waters. *J Chromatogr A.* 2000; 873: 107 – 115.