



Universitat Autònoma de Barcelona

ADVERTIMENT. L'accés als continguts d'aquesta tesi queda condicionat a l'acceptació de les condicions d'ús establertes per la següent llicència Creative Commons:  http://cat.creativecommons.org/?page_id=184

ADVERTENCIA. El acceso a los contenidos de esta tesis queda condicionado a la aceptación de las condiciones de uso establecidas por la siguiente licencia Creative Commons:  <http://es.creativecommons.org/blog/licencias/>

WARNING. The access to the contents of this doctoral thesis it is limited to the acceptance of the use conditions set by the following Creative Commons license:  <https://creativecommons.org/licenses/?lang=en>



**Universitat Autònoma
de Barcelona**

Escola d'Enginyeria

Departament d'Enginyeria Química, Biològica i Ambiental

GICOM (Grupo de Investigación en Compostaje)

Programa de Doctorado en Ciencia y Tecnología Ambiental

**Valorización de digestato como sustrato para la producción
de biopesticidas con *Bacillus thuringiensis* mediante
fermentación en estado sólido**

Tesis doctoral

Paula Rodríguez Serrano

Directores:

Dr. Antoni Sánchez Ferrer

Dr. Xavier Font Segura

2019



**Universitat Autònoma
de Barcelona**

Antoni Sánchez Ferrer, profesor titular, y **Xavier Font Segura**, profesor agregado, del Departament d'Enginyeria Química, Biològica i Ambiental de la Universitat Autònoma de Barcelona.

Certifican:

que, la Ingeniera técnica de Obras Públicas, especialidad transportes y servicios urbanos y máster en Ingeniería Ambiental **Paula Rodríguez Serrano** ha realizado bajo nuestra dirección el trabajo con el título “Valorización de digestato como sustrato para la producción de biopesticidas con *Bacillus thuringiensis* mediante fermentación en estado sólido” que se presenta en esta memoria, la cual constituye su tesis para optar al Grado de Doctor en Ciencia y Tecnología Ambiental por la Universitat Autònoma de Barcelona.

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

Dra. Antoni Sánchez Ferrer

Dr. Xavier Font Segura

Bellaterra, Septiembre 2019

A mi FAMILIA

“Si una persona quiere aprender y te pregunta algo, explícaselo, porque hace tiempo tú tampoco lo sabías” - Anónimo.

Agradecimientos

A la Unión Europea por la financiación del programa de investigación e innovación Horizon 2020 en virtud del acuerdo de subvención no 689229 por el que se desarrolla el proyecto DECISIVE (A Decentralised management Scheme for Innovative Valorization of urban biowastE) marco de esta tesis y por la financiación económica del doctorado.

A mis directores de tesis Antoni Sánchez y Xavier Font, y en especial a Adriana Artola y al resto de miembros del grupo de investigación en compostaje (GICOM).

A todos los miembros del grupo GICOM que han colaborado en esta tesis (Laura Mejías, Alejandra Rodríguez y Alejandra Cerda).

Al Departament d'Enginyeria Química Biològica i Ambiental (doctorandos, profesores, técnicos, secretaría, y personal de limpieza).

A la Planta de tratamiento de la FORM del *Consorci per a la Gestió de Residus del Vallès Oriental* (Granollers, España) que nos han facilitado el digestato para la realización de los experimentos, en especial a Vanesa Abad y Germán García.

Agradecimientos extraoficiales

En primer lugar, agradecer esta oportunidad a mis directores de tesis Toni y Xavi por su inmensa paciencia y recomendaciones a lo largo de toda la tesis. Aprender que cuando un experimento no sale como queremos, no ha salido mal, sino que tenemos resultados diferentes. Y a Adriana que ha sido como una madre asesorando y corrigiéndome a lo largo de toda la tesis.

Gracias a todo el grupo de investigación de GICOM, Tere, Raquel, Alejandra, Eva, Dani, Laura, Ale, Arnau y Esther. Y a los que acabaron antes que yo, como Óscar, Pedro y María. Porque ellos me dejaron parte de la sabiduría del laboratorio como, por ejemplo, “todos los equipos dejaran de funcionar el fin de semana cuando no haya nadie para revisarlos” o “si no coge datos el sistema o no marca lo que toca, lo más seguro que sea por una gota de agua” y “el acuérdate de poner la sonda en los reactores de 10-L que por eso se escapa el aire”.

Y como muchos me estáis preguntando, gracias en especial a mi Despacho latino porque me han aguantado todos mis dramas durante todo el doctorado y eso ya es todo un mérito.

A Laura porque siendo nuestra pequeña, es la más madura, la que más sabe de fermentación en estado sólido y la que ha sido mi compañera de batallas con el *Bt*, que, si crece, que, si ahora no crece, ¿qué le pasará hoy al *Bt*? Menos mal que siempre podíamos preguntar al horóscopo como nos iría la semana. Pero también, no solo por compartir despacho y batallas de laboratorio, sino por ese viaje a Olot y a la Fageda, donde Ale y yo no fuimos vestidas con el traje oficial de Decathlon para subir a los volcanes de la zona y se nos notaba que éramos forasteras. Y por todas las cenas, despedidas, bienvenidas, y por ese viaje a México donde los mosquitos no pudieron con nosotras.

A Ale, mi profesora mexicana de pronunciación de inglés y castellano con palabras como “crash”, “picsa” o “susi”, también serás la eterna novia, porque creo que en este último año he aprendido casi tanto o más sobre lo que necesita alguien para casarse en México como del *Bt*. Por los mensajes de primera hora de la mañana con un Paula... seguidos de ¿estás ya en la uni? o espera que pongo el autoclave que son cinco minutos (cinco minutos

mexicanos es media hora española) y ya estoy para comer. Porque gracias a ti, parece que sé más de las costumbres mexicanas que catalanas.

A Pia, la alegría personificada, por nuestra sutil salida a diario del despacho, porque todo el pasillo sabe cuando llegamos y cuando nos vamos de la universidad, por las investigaciones FBI en el recorrido del ferrocarril, por ser mi compañera fiel de las claritaterapias y clases de zumba en los momentos caóticos de la tesis, por compartir toda tu sabiduría de microbiología conmigo y por ser capaz de leerte la tesis antes y después de volver de México. Por ser juntas, Pituka y Petaka para bien y para mal para el resto de la gente, por compartir habitación, furgoneta y muchas, muchas risas en estos años.

A Pili, mi retoralimentación para todo, para ir a un programa de la tele, para fundar nuestro propio grupo de investigación llamado GIST (Grupo de Supervivencia a la Tesis), ¿qué fue antes la celda o el *Bt*? Por ser la radiopatio del despacho, por encontrar los mejores descuentos para unas becarias como nosotras y por poder compartir todos mis dramas diarios de la tesis y de la vida.

A Arnau que gràcies a tu ja parle més català o valencià segons el teu criteri, i tu ja has après més d'un refrà castellà perquè les hores a la càmera de microorganismes donaven per a molt.

A Esther simplemente suerte, porque el *Bt* tiene sus cositas, pero si le cuidas y lo tratas con cariño la FES le va a encantar para crecer y esporularse, solo te digo que cuando entres en crisis, esporulate y canta.

Y como no, a mi pequeña familia de Barcelona, mis vascas y mis compañeras de piso porque sin ellas estos tres años de doctorado hubiesen sido mucho más difíciles. Gracias por esas charlas en el sofá, por suministrarme una parte del material orgánico para mis experimentos y por estos últimos meses de apoyo con sushi, helados en la Crem y las tortitas “healthy” de los domingos por la tarde, cualquier tipo de comida es buena para acabar una tesis.

A todos aquellos que en algún momento pasaron por mi vida durante el doctorado, porque gracias a todos no soy la misma que hace tres años, sé que existe una fermentación en estado sólido y un microorganismo llamado *Bt*. Estos tres años, me han enseñado que

Barcelona como cualquier otra ciudad es *gente que viene y bah*, y hay que aprender a evolucionar con ella.

Pero sobretodo, gracias a mi familia, por estar siempre ahí. A mi padre por ser tan práctico y sincero conmigo. A mi madre porque es la que siempre me decía deja de pintar y hacer esas tonterías y cógete un libro y lee, nunca le hice caso. Y como no, a ella, mi hermana y mi mejor amiga, la única que en mis momentos de agobio es capaz de calmarme y hacerme reír. Así que, a vosotros familia por ser ese apoyo y cariño incondicional, aun sabiendo que os vuelvo un poco locos con mis nervios y mis cambios de planes.

Resumen

Resumen

Esta tesis es parte del proyecto DECISIVE, financiado por el programa europeo H2020 (acuerdo de subvención N ° 689229), que tiene como objetivo proponer y probar un esquema de gestión descentralizada para la valorización de los residuos sólidos orgánicos urbanos. El objetivo general de esta investigación es la producción de bioproductos de valor añadido a partir del digestato de fracción orgánica de residuos sólidos municipales como sustrato mediante el uso de la Fermentación en Estado Sólido (FES). El principal producto a explorar es un biopesticida a obtener inoculando el residuo con *Bacillus thuringiensis* (*Bt*), que produce un cristal proteico con propiedades biopesticidas.

En primer lugar, se realizaron pruebas a escala laboratorio para comprobar la idoneidad del digestato para la obtención de diferentes bioproductos (celulasas, soforolípidos, proteasas y biopesticidas), alcanzando los mejores resultados de producción para el biopesticida producido por *Bt*. Estos experimentos se realizaron con digestato estéril y digestato higienizado, observando que este microorganismo era capaz de crecer y esporular usando digestato higienizado. Posteriormente, se probaron una serie de estrategias de producción en reactores aislados térmicamente de 10-L con digestato higienizado donde se observó que los mejores resultados se obtenían con una cantidad de material de 3.5 kg y una ratio de inóculo de 0.0030 g *Bt* g⁻¹ digestato inoculado al comienzo del proceso para que el microorganismo se aclimate y sobreviva durante todo el proceso. La estrategia de producción por lotes secuenciales funcionó a escala laboratorio (0.5-L), pero no en los reactores de 10-L debido a los gradientes de temperatura y la heterogeneidad del digestato. Con la mejor estrategia de operación se realizó un escalado comparando reactores aislados térmicamente (10-L) y reactores no aislados térmicamente (22-L). En ambos casos, *Bt* pudo colonizar y esporular, obteniendo un producto final a partir de digestato con valores de células viables superior a 10⁹ UFC g⁻¹ MS. El proceso se escaló a un reactor de 100-L de lecho empacado sin aislamiento y con agitación observando una esporulación del 89% con un crecimiento de esporas 3 veces mayor que el inicial.

Posteriormente, se realizó una comparación entre dos cepas de *Bt*, *Bacillus thuringiensis* subespecie *kurstaki* (*Btk*), cuyos efectos se han descrito principalmente en lepidópteros, y *Bacillus thuringiensis* subespecie *israelensis* (*Bti*), que tiene efecto en dípteros. Se

evaluó la diferencia en el crecimiento y esporulación de ambas cepas a escala laboratorio (0.5-L) observando los efectos de la esterilización, la higienización y la congelación del digestato en la producción de células viables y esporas por *Btk* y *Bti*. Después de evaluar los efectos a escala laboratorio y en relación con los experimentos realizados con reactores aislados de 10-L, se estudia el crecimiento de ambas cepas en estos reactores con 1.5 kg de residuo para evitar los incrementos de temperatura, comparándolos con dos tipos de sustrato: digestato y digestato con fracción orgánica de residuos municipales (FORM) (50:50). Se observó que *Bti* crece más rápido que *Btk* en las mismas condiciones, siendo el valor final de células viables de 10^9 UFC g^{-1} MS en ambas cepas, y de esporas de 10^8 y 10^9 esporas g^{-1} MS, respectivamente para las cepas *Btk* y *Bti* utilizando la mezcla de digestato y FORM.

Paralelamente, se realizaron pruebas de conservación, análisis microbiológico y bioensayos del bioproducto. Se observó que éste puede almacenarse hasta 30 días tanto en forma sólida como líquida, pero siempre a una temperatura alrededor de los 4°C, que todo el digestato no contiene *Bt* al inicio y que, según la dosis aplicada y el tipo de plaga, el biopesticida producido a partir de FES puede tener efecto biopesticida.

Con todos los resultados anteriores, las últimas pruebas realizadas en esta tesis fueron la optimización de la extracción y caracterización de la toxina producida por *Bt* a partir del cristal proteico, concentrado y conservado a partir de técnicas como: la disrupción, donde se disminuyeron las células viables e incrementaron la producción de esporas, desprendiendo el cristal proteico y la liofilización, para conservar el material, donde se observó un 86 y 89% de recuperación de las esporas para *Btk* y *Bti*. Se realizó también una purificación del sustrato, para la determinación de las proteínas con efecto biopesticida características de *Bt* a partir de una electroforesis.

Esta tesis es un paso adelante para comprobar las posibilidades de obtención del cristal proteico de *Bt* con efecto biopesticida a partir de FES y poder utilizarlo valorizando los residuos del tratamiento de la fracción orgánica de residuos municipales.

Abstract

This thesis is part of the DECISIVE project, funded by the European program H2020 (grant agreement No. 689229), which aims to propose and test a decentralized management scheme for the recovery of municipal organic waste. The general objective of this research is the production of value-added bioproducts using digestate of the organic fraction of municipal solid waste as a substrate through solid-state fermentation (SSF). The main bioproduct to explore is a biopesticide inoculating the digestate with *Bacillus thuringiensis* (*Bt*), which is known to produce a protein with biopesticidal properties.

Firstly, laboratory scale tests were performed to verify the suitability of the digestate to obtain different bioproducts (cellulases, sophorolipids, proteases and biopesticides), achieving the best production results for the biopesticide produced by *Bt*. These experiments were performed with sterile digestate and hygienized digestate, observing that *Bt* was able to grow and sporulate using hygienized digestate. Subsequently, a series of operational strategies were studied in thermally insulated 10-L reactors using hygienized digestate. The most appropriate option was the use of 3.5 kg of initial solid mixture and an inoculum ratio of 0.0030 g *Bt* g⁻¹ digestate inoculated at the beginning of the process to allow *Bt* acclimatize and survive throughout the process. The sequential batch operation strategy worked successfully at laboratory scale (0.5-L), but not with 10-L reactors due to temperature gradients and digestate heterogeneity. Using the best operational strategy, scaling was performed comparing thermally insulated reactors (10-L) and non-thermally insulated reactors (22-L). In both cases, *Bt* was able to colonize and sporulate, obtaining a final product from digestate with viable cell values greater than 10⁹ CFU g⁻¹ DM. The same process was scaled to a 100-L stirred packed bed reactor without thermal insulation observing a sporulation of 89% with a spore growth 3 times greater than the initial value.

Subsequently, a comparison was made between two strains of *Bt*, *Bacillus thuringiensis* subspecies *kurstaki* (*Btk*) with known effects against lepidoptera and *Bacillus thuringiensis* subspecies *israelensis* (*Bti*), which has effect on diptera. The difference among both strains at laboratory scale 0.5-L was evaluated observing the effects of sterilization, sanitation and freezing of digestate in the production of viable cells and

spores by *Btk* and *Bti*. After evaluating the effects on a laboratory scale and in relation to the experiments performed in Chapter 5 with insulated 10-L reactors, the growth of both strains in these reactors was studied also comparing two types of substrate: digestate and digestate with organic fraction of municipal wastes (OFMSW) (50:50). The amount of initial solid mixture used in these experiments was 1.5 kg to avoid temperature increment. *Bti* grows faster than *Btk* under the same conditions, the value of viable cells being 10^9 CFU g⁻¹ MS in both strains, and spores of 10^8 and 10^9 spores g⁻¹ MS, respectively for *Btk* and *Bti* growing on digestate and OFMSW mixture.

At the same time, conservation tests, microbiological analysis and digestate bioassays were performed. It was observed that the bioproduct can be stored up to 30 days in both solid and liquid form, but always at a temperature around 4°C; that the entire digestate does not contain *Bt* at the beginning of the tests and that, depending on the dose applied and the type of pest, the biopesticide produced from SSF can have biopesticide effect.

With all the previous results, the last analysis carried out in this thesis was the optimization of the extraction and characterization of the toxin produced by *Bt* from the protein crystal. Different techniques were applied to concentrate and preserve the protein crystal. The first one was a disruption where viable cells were decreased and spore production increased, releasing the protein crystal. The second one was a lyophilization to conserve the material, where 86 and 89% recovery of spores was observed for *Btk* and *Bti*.

This thesis is a step forward to verify the characteristics of the *Bt* protein crystal with biopesticidal effect obtained through SSF and to be able to use the final product valorising the residues of the treatment of the organic fraction of municipal solid waste.

Resum

Aquesta tesi és part del projecte DECISIVE, finançat pel programa europeu H2020 (acord de subvenció N° 689.229), que té com a objectiu proposar i provar un esquema de gestió descentralitzada per a la valorització dels residus sòlids orgànics municipals. L'objectiu general d'aquesta investigació és la producció de bioproductes de valor afegit a partir del digestat de fracció orgànica de residus sòlids municipals com a substrat mitjançant l'ús de la fermentació en estat sòlid (FES). El principal bioproducte a explorar és un biopesticida inoculant el digestat amb *Bacillus thuringiensis* (*Bt*), conegut per les seves propietats biopesticides.

En primer lloc, es van realitzar proves a escala laboratori per comprovar la idoneïtat del digestat per a l'obtenció de diferents bioproductes (cel·lulases, soforolípid, proteases i biopesticides), aconseguint els millors resultats de producció per al biopesticida produït per *Bt*. Aquests experiments es van realitzar amb digestat estèril i digestat higienitzat, observant que aquest microorganisme era capaç de créixer i esporular utilitzant digestat higienitzat. Posteriorment, es van estudiar un seguit d'estratègies d'operació en reactors aïllats tèrmicament de 10-L amb digestat higienitzat, on es va observar que l'opció més adequada era treballar amb una quantitat inicial de substrat sòlid de 3.5 kg i una ràtio d'inòcul de 0.0030 g *Bt* g⁻¹ de digestat, inoculant *Bt* al començament del procés perquè pugui aclimatar-se i sobreviure durant tot el procés. L'estratègia d'operació per lots seqüencials va funcionar a escala laboratori (0.5-L), però no en els reactors aïllats de 10-L, a causa dels gradients de temperatura i l'heterogeneïtat del digestat. Amb la millor estratègia es va realitzar un escalat del procés comparant reactors aïllats tèrmicament (10-L) i reactors no aïllats tèrmicament (22-L). En ambdós casos, el *Bt* va poder colonitzar i esporular, obtenint un producte final a partir del digestat amb valors de cèl·lules viables superiors a 10⁹ UFC g⁻¹ MS. El procés es va escalar a un reactor de 100-L de llit empaquetat sense aïllament i amb agitació, observant una esporulació del 89% amb un creixement d'esores 3 vegades més gran que l'inicial, mostrant produccions de biopesticida a partir de *Bt*.

Posteriorment, es va realitzar una comparació entre dues soques de *Bt*, *Bacillus thuringiensis* subespècie *kurstaki* (*Btk*), amb efectes sobre plagues de lepidòpters i *Bacillus thuringiensis* subespècie *israelensis* (*Bti*), que té efecte en dípters. Es va avaluar

la diferència de les dues soques a escala laboratori 0.5-L observant els efectes d'esterilització, la higienització i la congelació del digestat en la producció de cèl·lules viables i espores per *Btk* i *Bti*. Després d'avaluar els efectes a escala de laboratori i en relació amb els experiments realitzats al Capítol 5, s'estudia el creixement de les dues soques en els reactors aïllats de 10-L amb 1.5 kg de sòlid inicials per evitar els increments de temperatura, comparant-los amb dos tipus de substrat: digestat i digestat amb fracció orgànica de residus municipals sòlids (FORM) (50:50). Es va comprovar que *Bti* creix més ràpid que *Btk* en les mateixes condicions, arribant a un valor de cèl·lules viables de 10^9 UFC g⁻¹ MS amb totes dues soques, i de 10^8 i 10^9 espores g⁻¹ MS, respectivament per a *Btk* i *Bti* amb digestat i FORM.

Paral·lelament, es van realitzar proves de conservació, anàlisi microbiològic i bioassaigs del digestat. Es va observar que el bioproducte es pot emmagatzemar fins a 30 dies tant en forma sòlida com líquida, però sempre a una temperatura al voltant dels 4°C, que tot el digestat no conté *Bt* a l'inici i que, segons la dosi aplicada i el tipus de plaga, el biopesticida produït a partir de FES pot tenir efecte biopesticida.

Amb tots els resultats anteriors, els últims anàlisis realitzats en aquesta tesi van ser l'optimització de l'extracció i caracterització de la toxina produïda per *Bt* a partir del cristall proteic, concentrat i conservat a través de tècniques com: la disruptió, on es van disminuir les cèl·lules viables i es va incrementar la producció d'espores, desprenent el cristall proteic i la liofilització per conservar el material, on es va observar un 86 i 89% de recuperació de les espores per *Btk* i *Bti*. Es va realitzar una purificació del substrat, determinant les proteïnes característiques de *Bt* amb efecte biopesticida a partir d'una electroforesi.

Aquesta tesi és un pas endavant per comprovar les característiques del cristall proteic de *Bt* amb efecte biopesticida a partir de FES i poder utilitzar el producte final valoritzant així el residu del tractament de la fracció orgànica de residus municipals.

Índice

Índice de Contenido

Capítulo 1

Introducción	1
1.1. <i>Introducción</i>	3
1.2. <i>Residuos</i>	4
1.3. <i>Fracción orgánica de residuos municipales y digestato</i>	5
1.4. <i>Fermentación en Estado Sólido</i>	8
1.4.1. <i>Definición de Fermentación en Estado Sólido</i>	8
1.4.2. <i>Aspectos generales de la Fermentación en Estado Sólido</i>	10
1.4.3. <i>Bioproductos a partir de la Fermentación en Estado Sólido</i>	12
1.4.4. <i>Fermentación en Estado Sólido a partir de digestato</i>	13
1.5. <i>Proyecto DECISIVE</i>	13
1.6. <i>Biopesticidas</i>	15
1.7. <i>Cepa de Bacillus thuringiensis</i>	16
1.7.1. <i>Biología de Bacillus thuringiensis</i>	17
1.7.2. <i>Modo de acción de las proteínas tóxicas de Bacillus thuringiensis</i>	19
1.7.3. <i>Factores que afectan al crecimiento, esporulación y formación de la proteína tóxica de Bacillus thuringiensis</i>	19
1.7.4. <i>Persistencia y seguridad del efecto biopesticida del Bacillus thuringiensis</i>	20
1.7.5. <i>Descripción de las subespecies de Bacillus thuringiensis</i>	20
1.8. <i>Biopesticidas a partir de Bacillus thuringiensis</i>	24
1.8.1. <i>Producción de biopesticidas a partir de Bacillus thuringiensis utilizando residuos como sustratos</i>	25
1.8.1.1. <i>Fermentación sumergida</i>	25
1.8.1.2. <i>Fermentación en Estado Sólido</i>	29
1.8.1.3. <i>Comparación entre Fermentación Sumergida y Fermentación en Estado Sólido</i>	33
1.8.2. <i>Recuperación de las toxinas</i>	34
1.8.3. <i>Coste de la producción de biopesticida a partir de Bacillus thuringiensis</i>	35
1.8.4. <i>Ensayos de biopesticida a partir de Bacillus thuringiensis a escala de laboratorio y de campo</i>	36

Capítulo 2

Objetivos	39
------------------------	-----------

Capítulo 3

Materiales y métodos.....	43
3.1. <i>Materiales.....</i>	45
3.1.1. Sustratos y acondicionamiento	45
3.1.2. Microorganismos	48
3.1.2.1. Ceba de <i>Bacillus thuringiensis</i>	48
3.1.2.2. Preparación del inóculo: reactores de 0.5-L (escala laboratorio).....	48
3.1.2.3. Preparación del inóculo: reactores desde 4.5-L hasta 100-L.....	51
3.1.2.4. Evaluación del inóculo.....	52
3.1.2.5. Ratio de inóculo (Ri).....	53
3.2. <i>Sistemas de Fermentación.....</i>	54
3.2.1. Sistema de Fermentación I: reactores de 0.5-L.....	56
3.2.2. Sistema de fermentación II: reactores aislados térmicamente de 4.5-10-L	57
3.2.3. Sistema de fermentación III: reactor no aislado térmicamente de 22-L.....	59
3.2.4. Sistema de fermentación IV: reactor no aislado térmicamente de 100-L.....	61
3.3. <i>Parámetros de seguimiento de la actividad biológica del proceso.....</i>	63
3.3.1. Velocidad de consumo de oxígeno.....	63
3.3.2. Consumo de oxígeno acumulado	64
3.4. <i>Métodos analíticos</i>	64
3.4.1. Estabilidad/Biodegradabilidad de los sustratos.....	64
3.4.1.1. Índice Respirométrico Dinámico (IRD)	64
3.4.1.2. Consumo de oxígeno acumulado a los 4 días	65
3.4.2. Análisis rutinarios	65
3.4.2.1. Humedad y materia seca	66
3.4.2.2. Materia orgánica	66
3.4.2.3. pH y conductividad eléctrica	66
3.4.3. Análisis elemental	67
3.4.4. Análisis de metales.....	67
3.4.5. Contenido en fibra.....	67
3.5. <i>Determinación de la actividad enzimática de proteasas.....</i>	67
3.6. <i>Métodos específicos para la caracterización del biopesticida</i>	71
3.6.1. Método de muestreo	71
3.6.2. Estimación de colonias y esporas.....	71
3.6.3. Estimación de la toxina, con efecto biopesticida producida por <i>Bacillus thuringiensis</i>	73
3.6.4. Imágenes de microscopía electrónica de barrido (SEM).....	75

3.6.5. Electroforesis	76
3.7. Extracción del biopesticida	78
3.8. Técnicas de procesado de la toxina de <i>Bacillus thuringiensis</i>	80
3.8.1. Disrupción	80
3.8.2. Purificación de la muestra	81
3.8.3. Liofilización.....	81

Capítulo 4

Obtención de bioproductos a partir de digestato.....	83
4.1. Introducción.....	85
4.2. Metodología.....	86
4.2.1. Microorganismos	86
4.2.2. Fracción sólida del digestato: producción de proteasas.....	86
4.2.3. Fracción sólida del digestato: producción de biopesticidas y proteasas con inóculo de <i>Bt</i>	86
4.2.4. Fracción líquida del digestato: producción de biopesticidas	87
4.2.5. Análisis estadístico.....	89
4.3. Resultados y discusión.....	89
4.3.1. Fracción sólida del digestato: producción de proteasas.....	89
4.3.2. Fracción sólida del digestato: producción de biopesticidas a partir de <i>Bacillus thuringiensis</i>	92
4.3.3. Fracción sólida del digestato: producción de proteasas a partir de <i>Bacillus thuringiensis</i>	96
4.3.4. Fracción sólida del digestato: producción de otros bioproductos	99
4.3.4.1. Celulasas	99
4.3.4.2. Soforolípidos.....	100
4.3.5. Fracción líquida del digestato: sustitución de medio sintético por digestato líquido para producir inóculo de <i>Bacillus thuringiensis</i> para la FES.....	101
4.3.6. Fracción líquida del digestato: producción de biopesticidas a partir de <i>Bacillus thuringiensis</i> a través de FmS	103
4.4. Conclusiones.....	106

Capítulo 5

<i>Estrategias de operación en FES para la producción de biopesticidas con <i>Bacillus thuringiensis</i></i>	107
5.1. <i>Introducción</i>	109
5.2. <i>Metodología</i>	110
5.2.1. Microorganismo.....	110
5.2.2. Sistema de fermentación II: reactores aislados térmicamente de 4.5-L	110
5.2.3. Estrategias de operación en Sistema de fermentación II: reactores aislados térmicamente de 10-L	111
5.2.4. Estrategia 5: operación secuencial por lotes (SBR)	112
5.2.4.1. <i>Sistema de Fermentación I: reactores de 0.5-L (escala laboratorio)</i>	112
5.2.4.2. <i>Sistema de fermentación II: reactores aislados térmicamente de 10-L</i>	113
5.2.5. Microorganismos presentes en el proceso de FES con digestato.....	114
5.2.6. Bioensayos.....	114
5.2.7. Análisis estadístico.....	115
5.3. <i>Resultados y discusión</i>	115
5.3.1. Crecimiento de <i>Btk</i> en reactores aislados térmicamente de 4.5-L.....	115
5.3.2. Estrategias de operación en reactores aislados térmicamente de 10-L para el crecimiento de <i>Btk</i>	118
5.3.2.1. <i>Estrategia 1: Inoculación al comienzo del proceso de FES</i>	118
5.3.2.2. <i>Estrategia 2: Inoculación a las 48 horas del proceso de FES</i>	120
5.3.2.3. <i>Estrategia 3: Variación de la cantidad de inóculo en el proceso de FES</i>	123
5.3.2.4. <i>Estrategia 4: Variación de la cantidad de sustrato en el proceso de FES</i>	125
5.3.2.5. <i>Comparación de estrategias</i>	127
5.3.3. Estrategia 5: Operación secuencial por lotes en reactores de 0.5-L y 10-L.....	131
5.3.3.1. <i>Reactores de 0.5-L (escala laboratorio)</i>	131
5.3.3.2. <i>Reactores aislados térmicamente de 10-L: Operación por lotes secuenciales</i>	133
5.3.8. Análisis microbiológico del digestato durante el proceso de FES	137
5.3.5. Bioensayos.....	140
5.4. <i>Conclusiones</i>	141

Capítulo 6

<i>Escalado del proceso de FES para la producción de biopesticida con <i>Bacillus thuringiensis</i></i>	143
6.1. <i>Introducción</i>	145

6.2. Metodología.....	146
6.2.1. Microorganismos	146
6.2.2. Reactores aislados térmicamente	146
6.2.3. Reactores no aislados térmicamente.....	146
6.2.4. Reactor escala piloto	147
6.2.5. Almacenamiento y conservación	147
6.2.6. Análisis estadístico.....	148
6.3. Resultados y discusión.....	148
6.3.1. Reactores aislados térmicamente	148
6.3.2. Reactores no aislados térmicamente y agitados.....	152
6.3.3. Comparación de los reactores aislados y no aislados	155
6.3.4. Escalado (100-L).....	156
6.3.5. Comprobación de la presencia de cristales proteicos de <i>Bacillus thuringiensis</i> variedad <i>kurstaki</i>	159
6.3.6. Almacenamiento y conservación del biopesticida	160
6.4. Conclusiones.....	162

Capítulo 7

Comparación de la producción de biopesticidas entre dos cepas de *Bacillus*

<i>thuringiensis</i>.....	165
7.1. Introducción.....	167
7.2. Metodología.....	168
7.2.1. Microorganismos	168
7.2.2. FES en reactores de 0.5-L.....	168
7.2.3. FES en reactores de 10-L.....	169
7.2.4. Caracterización del cristal proteico	169
7.2.5. Análisis estadístico.....	170
7.3. Resultados y discusión.....	170
7.3.1. FES en reactores de 0.5-L: influencia de higienización, esterilización y congelado del sustrato en el proceso.....	170
7.3.1.1. Efecto de esterilización del digestato en FES.....	171
7.3.1.2. Efecto de higienización del digestato en la FES.....	175
7.3.1.3. Efecto de congelación del digestato en la FES.....	177
7.3.1.4. Comparación entre tratamientos	179

7.3.2. Sistema de Fermentación II: reactores aislados térmicamente de 10-L	181
7.3.2.1. <i>Bacillus thuringiensis</i> variedad <i>kurstaki</i>	182
7.3.3. Caracterización del cristal proteico	189
7.4. Conclusiones.....	194

Capítulo 8

<i>Extracción y caracterización de la toxina de <i>Bacillus thuringiensis</i></i>	197
8.1. Introducción.....	199
8.2. Metodología.....	200
8.2.1. Microorganismos	200
8.2.2. Materiales	200
8.2.3. Extracción de biopesticida.....	200
8.2.4. Obtención del cristal.....	201
8.2.5. Determinación de la proteína con efecto tóxico de <i>Bacillus thuringiensis</i>	202
8.2.6. Análisis estadístico.....	202
8.3. Resultados y discusión.....	203
8.3.1. Extracción de biopesticida: cepa de <i>Bacillus thuringiensis</i> variedad <i>kurstaki</i>	203
8.3.2. Extracción de biopesticida: cepa de <i>Bacillus thuringiensis</i> variedad <i>israelensis</i>	206
8.3.3. Obtención del cristal proteico	209
8.3.3.1. Efecto de disrupción y purificación con hexano	209
8.3.3.2. Efecto de liofilización.....	212
8.3.4. Purificación del cristal proteico: determinación de la concentración de la toxina	214
8.3.5. Determinación de proteína producida por <i>Bt</i> mediante electroforesis.....	215
8.4. Conclusiones.....	219

Capítulo 9

<i>Conclusiones generales</i>	221
<i>Referencias</i>	225
<i>Anexos</i>	245
Anexo I.....	247
Anexo II.....	251
Anexo III.....	259

Índice de Tablas

Tabla 1.1. Comparación de las principales características de FES y SmF. El-Bakry et al. (2015).....	10
Tabla 1.2. Variedades de <i>Bt</i> relacionando su proteína insecticida, plaga y cultivo al que afecta.....	22
Tabla 1.3a. Producción de biopesticida a partir de <i>Bacillus thuringiensis</i> (<i>Bt</i>): principales parámetros de FmS.....	27
Tabla 1.3b. Producción de biopesticida a partir de <i>Bacillus thuringiensis</i> (<i>Bt</i>) principales resultados de FmS.....	28
Tabla 1.4a. Producción de biopesticida a partir de <i>Bacillus thuringiensis</i> (<i>Bt</i>): principales parámetros de FES.....	31
Tabla 1.4b. Producción de biopesticida a partir de <i>Bacillus thuringiensis</i> (<i>Bt</i>): principales resultados de FES.....	32
Tabla 1.5. Coste de biopesticidas de <i>Bacillus thuringiensis</i> (<i>Bt</i>) a partir de residuos.....	35
Tabla 3.1. Características de los sustratos y agente estructurante utilizado en los procesos de fermentación. (Media±desviación estándar n=10a).....	47
Tabla 3.2. Valores de los parámetros del inóculo de <i>Bt</i> crecido en medio líquido Broth.....	54
Tabla 4.1. Caracterización del digestato líquido. (Media±desviación estándar, n=3 ^a).....	87
Tabla 4.2. Principales parámetros en el crecimiento de <i>Btk</i> en fracción líquida del digestato durante 48 h.....	102
Tabla 4.3. Principales parámetros del proceso de FmS de digestato líquido con <i>Btk</i>	104
Tabla 5.1. Condiciones de operación para cada una de las estrategias analizadas en los reactores de 10-L.....	111
Tabla 5.2. Principales parámetros del proceso de FES para cada una de las estrategias estudiadas (valores finales a las 96h).....	130
Tabla 5.3. Resultados finales de la estrategia SBR en reactores de 0.5-L (escala laboratorio) y reactores aislados térmicamente de 10-L a los 12 días del proceso de FES (4 lotes secuenciales).....	137
Tabla 5.4. Evaluación de las muestras de digestato en diferentes condiciones determinando bacterias, hongos y diferentes cepas del género <i>Bacillus</i>	138

Tabla 6.1. Valores iniciales y finales para los principales parámetros en la FES de digestato inoculado con <i>Btk</i> en los diferentes reactores estudiados.....	151
Tabla 6.2. Porcentaje de supervivencia de las células viables y esporas después de conservar el biopesticida en estado líquido y sólido. CF: Cámara fría (4°C) y TA: Temperatura ambiente (22°C).....	161
Tabla 7.1. Principales parámetros de la FES en el Sistema de Fermentación I con digestato estéril, higienizado y congelado, inoculados con <i>Btk</i> y <i>Bti</i>	174
Tabla 7.2. Principales parámetros de la FES en reactores aislados térmicamente de 10-L usando como sustratos digestato y digestato con FORM inoculando <i>Btk</i> y <i>Bti</i>	184
Tabla 8.1. Valores de células viables y esporas después de la disrupción para cada extracto de <i>Btk</i>	210
Tabla 8.2. Valores de células viables, esporas y porcentaje de recuperación después de la disrupción para cada extracto de <i>Bti</i>	211
Tabla 8.3. Valores de células viables, esporas y porcentaje de recuperación después de la liofilización para cada extracto de <i>Btk</i>	212
Tabla 8.4. Valores de células viables, esporas y porcentaje de recuperación después de la liofilización para cada extracto de <i>Bti</i>	213
Tabla 8.5. Valores de proteína total de los liofilizados de producto comercial Bactur®, inóculos de <i>Btk</i> y <i>Bti</i> y los fermentados de digestato y FORM de <i>Btk</i> y <i>Bti</i>	215
Tabla 8.6. Proteína característica de cada muestra liofilizada analizada.....	218

Índice de Figuras

Figura 1.1. Esquema economía circular. (Fuente: Plan Estatal Marco de gestión de residuos (PEMAR) 2016-2022).....	3
Figura 1.2. Fases del sistema FES involucradas.....	9
Figura 1.3. Ciclo cerrado de recursos en la gestión de residuos biológicos mediante el proyecto DECISIVE. (Fuente: Proyecto DECISIVE).....	14
Figura 1.4. Micrografía electrónica de esporas de <i>B. thuringiensis</i> (a) y de proteínas Cry purificadas (b y c). Fuente: Swiecicka <i>et al.</i> (2007).....	17
Figura 1.5. Ciclo biológico de <i>Bacillus thuringiensis</i> , esporulación y ciclo de germinación. (Fuente: Adaptado de McKenney, Peter, Driks y Eichenberger, 2012).....	18
Figura 3.1. Digestato estructurado con Spontex. a) Spontex®, b) Digestato, c) Mezcla digestato y Spontex® para FES utilizada en el Capítulo 4.....	46
Figura 3.2. Digestato estructurado con astillas de madera. a) Astillas de madera, b) Digestato, c) Mezcla digestato y astillas de madera para FES.....	46
Figura 3.3. Mezcla de digestato y FORM estructurada con astillas de madera. a) Astillas de madera, b) Digestato, c) FORM, d) Mezcla digestato, FORM y astillas de madera para FES. Utilizada en los capítulos 7 y 8.....	47
Figura 3.4. Cinética de crecimiento de <i>B. thuringiensis</i> variedad <i>kurstaski</i> (<i>Btk</i>) en medio líquido. a) Curva de crecimiento durante 48 horas a 30°C, observando densidad óptica (DO) (600nm), peso seco y células viables. b) Recta de calibrado densidad óptica y peso seco.....	49
Figura 3.5. Cinética de crecimiento de <i>B. thuringiensis</i> variedad <i>israelensis</i> (<i>Bti</i>) en medio líquido. a) Curva de crecimiento durante 48 horas a 30°C, observando densidad óptica (DO) (600nm), peso seco y células viables. b) Recta de calibrado densidad óptica y peso seco.....	50
Figura 3.6. Esquema de crecimiento del inóculo <i>Bacillus thuringiensis</i>	51
Figura 3.7. Imágenes del inóculo de <i>Bacillus thuringiensis</i> con microscopio óptico. a) <i>Btk</i> . b) <i>Bti</i>	52
Figura 3.8. Captura de pantalla del software para el monitoreo en línea de diferentes parámetros operativos. a) Pantalla general del software. b) Detalle de los datos de un reactor con los parámetros de adquisición de datos de oxígeno, temperatura y caudal.....	55
Figura 3.9. Esquema del montaje experimental del Sistema de Fermentación I.....	56
Figura 3.10. Imágenes del Sistema de Fermentación I. a) Sistema completo con baño termostático, reactores, trampas de agua y caudalímetros. b) Reactor de polipropileno cilíndrico.....	57

Figura 3.11. Montaje experimental del Sistema de Fermentación II.....	58
Figura 3.12. Imágenes del Sistema de Fermentación II. a) Tapa reactor de 4.5-L b) Montaje del sistema con el reactor de 4.5-L. c) Tapa reactor de 10-L. d) Montaje del sistema con el reactor de 10-L. e) Malla para distribuir el aire por la matriz sólida y tubo para la entrada de aire. d) Interior de los reactores, vaso Dewar.....	59
Figura 3.13. Montaje experimental del Sistema de Fermentación III.....	60
Figura 3.14. Imágenes del Sistema de Fermentación III. a) Reactor de 22-L b) Tapa reactor de 22-L. c) Variador de frecuencia d) Interior con el agitador helicoidal e) Cesta interior.....	61
Figura 3.15. Montaje experimental del Sistema de Fermentación IV.....	62
Figura 3.16. Imágenes del Sistema de Fermentación IV. a) Reactor de 100-L b) Agitador helicoidal c) Tolva para la carga de material. d) Motor del agitador e) Variador de frecuencia.....	62
Figura 3.17. Recta de calibrado para la determinación de la Actividad de la proteasa en base a la concentración de L-Tirosina.....	70
Figura 3.18. Apariencia de las colonias de <i>Bt</i> crecidas en placa Petri con el medio Agar. a) Imagen de Realpe 2002. b) Placa Petri de inóculo de <i>Bt</i>	72
Figura 3.19. Recta de calibrado para el método de Lowry (determinación de proteína total).....	75
Figura 3.20. Equipo de electroforesis.....	77
Figura 3.21. Programa Image Lab de BioRad ®.....	78
Figura 3.22. Equipo de ultrasonidos VIBRACELL.....	80
Figura 3.23. Equipo de liofilización.....	82
Figura 4.1. Esquema de las diferentes pruebas planteadas seguidas para la obtención de biopesticida a partir de digestato líquido.....	88
Figura 4.2. Perfiles operacionales de FES realizados por triplicado utilizando digestato como sustrato en un reactor de 0.5 L para la producción de enzimas hidrolíticas. Se presentan la producción de proteasa y los perfiles sOUR (hasta <10%). Los puntos experimentales con un asterisco indican una desviación alta ($p > 0.05$).....	90
Figura 4.3. Perfiles de sOUR y células viables y esporas obtenidos en reactores FES de 0.5 L utilizando digestato estéril como sustrato para la producción de biopesticidas. Los valores representados corresponden a la media de 3 fermentaciones idénticas. Los puntos experimentales con un asterisco indican una desviación alta ($p > 0.05$).....	93

Figura 4.4. Perfiles de sOUR y células viables y esporas obtenidos en reactores FES de 0.5 L utilizando digestato higienizado no estéril como sustrato para la producción de biopesticidas. Los valores representados corresponden a la media de 3 fermentaciones idéntica.....	95
Figura 4.5. Perfiles operacionales de FES realizados por triplicado utilizando digestato estéril como sustrato en un reactor de 0.5 L para la producción de enzimas hidrolíticas. Se presentan la producción de proteasa del control (negro) y de proteasa del digestato inoculado con <i>Btk</i> (blanco)	97
Figura 4.6. Perfiles operacionales de FES realizados por triplicado utilizando digestato no estéril como sustrato en un reactor de 0.5 L para la producción de enzimas hidrolíticas. Se presentan la producción de proteasa de control y proteasas de digestato inoculado con <i>Btk</i> . Los puntos experimentales con un asterisco indican una desviación alta ($p > 0.05$).....	98
Figura 5.1. Perfil de sOUR, temperatura, células viables y esporas en el proceso de FES de digestato higienizado en un reactor aislado térmicamente de 4.5-L. Los puntos experimentales con un asterisco indican desviación alta ($p > 0.05$). Los valores representados corresponden a la media de 2 fermentaciones independientes. a) Reactor control. b) Reactor inoculado a las 0 h con <i>Btk</i>	117
Figura 5.2. Estrategia 1: perfil de sOUR, temperatura, células viables y esporas en FES de digestato higienizado e inoculado a las 0 h con <i>Btk</i> en un reactor aislado térmicamente de 10-L. Los valores representados corresponden a la media de 2 fermentaciones independientes. a) Reactor control. b) Reactor inoculado a las 0 h con <i>Btk</i>	119
Figura 5.3. Estrategia 2: perfil de sOUR, temperatura, células viables y esporas en FES de digestato higienizado e inoculado a las 48 horas con <i>Btk</i> en un reactor aislado térmicamente de 10-L. Los valores representados corresponden a la media de 2 fermentaciones independientes.	121
Figura 5.4. Placas petri para determinación de células viables y esporas del proceso de FES inoculando <i>Btk</i> a las 48 horas del proceso. a) Placas petri de células viables en el momento que se inocula <i>Btk</i> en el digestato. b) Placas petri de esporas en el momento que se inocula <i>Btk</i> en el digestato. c) Placas Petri de células viables a las 24 horas de inocular <i>Btk</i> (72 horas del proceso de FES). d) Placas Petri de esporas a las 24 horas de inocular <i>Btk</i> (72 horas del proceso de FES).....	123
Figura 5.5. Estrategia 3: perfil de sOUR, temperatura, células viables y esporas en FES de digestato inoculado con $0.0015 \text{ g } Bt \text{ g}^{-1}$ digestato higienizado a las 0 h en un reactor aislado térmicamente de 10-L. Los valores representados corresponden a la media de 2 fermentaciones independientes.....	124
Figura 5.6. Estrategia 4: perfil de sOUR, temperatura, células viables y esporas en FES de digestato higienizado en reactores aislados térmicamente de 10-L con 1.5 kg de	

sustrato. Los valores representados corresponden a la media de 2 fermentaciones independientes. a) Reactor control. b) Reactor inoculado a las 0 h con <i>Btk</i>	126
Figura 5.7. Incremento de células viables y esporas de las diferentes estrategias estudiadas en los reactores aislados térmicamente de 10-L.....	128
Figura 5.8. Perfil de sOUR, células viables y esporas de la estrategia SBR para la producción de biopesticida a partir de <i>Btk</i> como inóculo y digestato como el sustrato en el proceso de FES en reactores de 0.5-L (escala de laboratorio). Los valores representados corresponden a la media de 2 fermentaciones independientes.....	132
Figura 5.9. Promedio de células viables y esporas finales de cada lote observados durante la estrategia SBR para la producción de biopesticida a partir de <i>Btk</i> como inóculo y digestato como el sustrato en el proceso de FES en los reactores de 0.5-L (escala laboratorio).....	133
Figura 5.10. Perfil de sOUR, células viables y esporas de la estrategia SBR al para la producción de biopesticida a partir de <i>Btk</i> como inóculo y digestato como el sustrato en el proceso de FES en los reactores aislados térmicamente de 10-L. Los valores representados corresponden a la media de 2 fermentaciones independientes.....	135
Figura 5.11. Promedio de células viables y esporas observados durante la estrategia SBR para la producción de biopesticida a partir de <i>Btk</i> como inóculo y digestato como sustrato en el proceso de FES en los reactores aislados térmicamente de 10-L.....	136
Figura 6.1. Diseño experimental de la configuración de conservación del biopesticida..	148
Figura 6.2. Evolución media de sOUR, temperatura, células viables y esporas en FES de digestato higienizado en condiciones no estériles en un reactor aislado térmicamente de 10-L. a) Reactor control. b) Reactor inoculado con <i>Btk</i>	150
Figura 6.3. Evolución media de sOUR, temperatura, células viables y esporas en FES de digestato higienizado en condiciones no estériles en un reactor no aislado con agitación diaria de 22-L. Las flechas muestran los momentos de agitación. a) Reactor control. b) Reactor inoculado con <i>Btk</i>	153
Figura 6.4. Evolución media de sOUR, temperatura, células viables y esporas en FES de digestato higienizado en condiciones no estériles en un reactor no aislado con agitación diaria de 100-L. Las flechas muestran los momentos de agitación. a) Reactor control. b) Reactor inoculado con <i>Btk</i>	157
Figura 6.5. Incremento de células viables y esporas al final del proceso FES en los diferentes reactores respecto a los valores iniciales. Diferentes letras mayúsculas indican diferencias significativas entre los valores obtenidos ($p < 0.05$).....	158
Figura 6.6. Imágenes de SEM de células viables, esporas y cristal de Btk en digestato al final del proceso FES. a) Células viables y esporas b) Esporas c) Cristal proteico de <i>Btk</i>	160

Figura 7.1. Esquema para las fermentaciones a escala de laboratorio con <i>Btk</i> y <i>Bti</i>	168
Figura 7.2. Evolución media de sOUR en FES de digestato en reactor de 0.5-L. Comparación entre digestato, digestato estéril, digestato higienizado y digestato congelado.....	170
Figura 7.3. Perfiles de sOUR, células viables y esporas obtenidos en reactores de FES de 0.5-L con digestato estéril como sustrato para la producción de biopesticidas. Los valores representados corresponden a la media de tres fermentaciones independientes. Los puntos experimentales con un asterisco indican una desviación alta ($p > 0.05$). a) Inoculado con <i>Btk</i> . b) Inoculado con <i>Bti</i>	172
Figura 7.4. Perfiles de sOUR, células viables y esporas obtenidos en reactores de FES de 0.5-L con digestato higienizado como sustrato para la producción de biopesticidas. Los valores representados corresponden a la media de tres fermentaciones independientes. a) Inoculado con <i>Btk</i> . b) Inoculado con <i>Bti</i>	176
Figura 7.5. Perfiles de sOUR, células viables y esporas obtenidos en reactores de FES de 0.5-L con digestato congelado como sustrato para la producción de biopesticidas. Los valores representados corresponden a la media de tres fermentaciones independientes. a) Inoculado con <i>Btk</i> . b) Inoculado con <i>Bti</i>	178
Figura 7.6. Incremento de células viables y relación de esporas y células viables al final del proceso FES inoculado con Bt usando como sustrato digestato para cada tratamiento estudiado. Diferentes letras mayúsculas indican diferencias significativas entre los valores obtenidos ($p < 0.05$). a) Cepa de <i>Btk</i> . b) Cepa de <i>Bti</i>	180
Figura 7.7. Perfiles de sOUR, células viables y esporas obtenidos en reactores de FES de 10-L para la producción de biopesticidas a partir de <i>Btk</i> . Los valores representados corresponden a la media de dos fermentaciones independientes. a) Con digestato como sustrato. b) Con digestato y FORM como sustrato.....	183
Figura 7.8. Perfiles de sOUR, células viables y esporas obtenidos en reactores de FES de 10-L para la producción de biopesticidas a partir de <i>Bti</i> . Los valores representados corresponden a la media de dos fermentaciones independientes. a) Con digestato como sustrato. b) Con digestato y FORM como sustrato.....	187
Figura 7.9. Imagen al microscopio de la separación espора-cristal por el método de Rahbani-Mounsef et al., (2014b) con aumento de 10x. a) Comercial Bactur®. b) Inóculo de <i>Btk</i> . c) Inóculo de <i>Bti</i> . d) Fermentado de FES con inóculo de <i>Btk</i> . e) Fermentado de FES con inóculo de <i>Bti</i>	190
Figura 7.10. Imagen al microscopio SEM del producto comercial Bactur®. a) Mezcla del producto comercial Bactur®. b) Detalle del cristal proteico que contiene el comercial Bactur®.....	191
Figura 7.11. Imagen al microscopio SEM del fermentado en reactores de 10-L con inóculo de <i>Btk</i> . a) Células viables y esporas de <i>Btk</i> . b) Detalle de las células viables de <i>Btk</i> . c y d) Cristales proteicos de <i>Btk</i>	192

Figura 7.12. Imagen al microscopio SEM del fermentado en reactores de 10-L con inóculo de <i>Bti</i> . a) Células viables y esporas de <i>Bti</i> . b) Detalle de las células viables de <i>Bti</i> . c) Cristal proteico bipiramidal de <i>Bti</i> . y d) Cristales proteicos esféricos de <i>Bti</i>	193
Figura 8.1. Esquema de las extracciones utilizadas.....	200
Figura 8.2. Estrategias para incrementar el efecto biopesticida del material resultante de la FES.....	201
Figura 8.3. Porcentajes relativos de extracción de células viables de la FES con inóculo de <i>Btk</i> en relación con la extracción 1:10 de Ringer® para distintas relaciones de sólido:solvente a diferentes tiempos del proceso. a) 0 horas. b) 24 horas. c) 48 horas. d) 72 horas.....	203
Figura 8.4. Porcentajes relativos de esporas extraídas de la FES con inóculo de <i>Btk</i> en relación con la extracción 1:10 de Ringer® para distintas relaciones de sólido: solvente a diferentes tiempos del proceso. a) 0 horas. b) 24 horas. c) 48 horas. d) 72 horas.....	204
Figura 8.5. Porcentajes relativos de extracción de células viables de la FES con inóculo de <i>Bti</i> en relación con la extracción 1:10 de Ringer® para distintas relaciones de sólido: solvente a diferentes tiempos del proceso. a) 0 horas. b) 24 horas. c) 48 horas. d) 72 horas.....	206
Figura 8.6. Porcentajes relativos de esporas extraídas de la FES con inóculo de <i>Bti</i> en relación con la extracción 1:10 de Ringer® para distintas relaciones de sólido: solvente a diferentes tiempos del proceso. a) 0 horas. b) 24 horas. c) 48 horas. d) 72 horas.....	207
Figura 8.7. Purificación de la muestra con hexano. Prueba con inóculo de <i>Btk</i> llevado a esporulación.....	211
Figura 8.8. Sembrado del fermentado de <i>Btk</i> liofilizado y purificado con hexano. a) Placa Petri colonias de células viables de <i>Btk</i> . b) Placa Petri de esporas de <i>Btk</i>	214
Figura 8.9. Gel de electroforesis. M1, M2, M3: marcadores. C: Producto comercial Bactur®. B: nutriente Broth. <i>Btk</i> : inóculo de <i>Btk</i> . <i>FBtk</i> : fermentado con inóculo de <i>Btk</i> . <i>Bti</i> : inóculo de <i>Bti</i> . <i>FBti</i> : fermentado con inóculo de <i>Bti</i> . Todas las muestras proceden de un liofilizado con un tratamiento de purificación con NaOH.....	217

Abreviaciones

Lista de Abreviaciones

Abreviación	Definición	Unidades
ADF	Fibras ácido-detergentes	
ADL	Lignina	
AT ₄	Consumo de oxígeno acumulado en cuatro días	mg O ₂ g ⁻¹ MS
bh	Base húmeda	
bs	Base seca	
BSA	Suero bovino de Albumina	
<i>Bt</i>	<i>Bacillus thuringiensis</i>	
<i>Bta</i>	<i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>aizawai</i>	
<i>Bti</i>	<i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>israelensis</i>	
<i>Btk</i>	<i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>kurstaky</i>	
<i>Btt</i>	<i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>teniobris</i>	
CC	Colonias viables	UFC g MS ⁻¹ o UFC mL ⁻¹
CE	Conductividad eléctrica	mS cm ⁻¹
COC	Consumo acumulado de oxígeno	mg O ₂ g ⁻¹ MS
DA	Digestión anaerobia	
DA-L	Fracción líquida de digestato	
DA-S	Fracción sólida de digestato	
DLB	Digestato líquido suplementado con nutriente Broth estéril sin ajustar el pH	

Lista de Abreviaciones

Abreviación	Definición	Unidades
DLBp	Digestato líquido suplementado con nutriente Broth estéril ajustando el pH	
DLE	Digestato líquido esterilizado sin ajustar el pH	
DLEp	Digestato líquido esterilizado ajustando el pH	
DLH	Digestato líquido higienizado sin ajustar el pH	
DLHp	Digestato líquido higienizado ajustando el pH	
DO	Densidad óptica	
FES	Fermentación en Estado Sólido	
FmS	Fermentación sumergida	
FORM	Fracción orgánica de residuo municipal	
GEI	Gases de efecto invernadero	
H	Humedad	%
IRD	Índice Respirométrico Dinámico	$\text{g O}_2 \text{ h}^{-1} \text{ kg}^{-1} \text{ MS}$
IRD_{1h}	Índice Respirométrico Dinámico como promedio de una hora de máxima actividad	$\text{g O}_2 \text{ h}^{-1} \text{ kg}^{-1} \text{ MS}$

Lista de Abreviaciones

Abreviación	Definición	Unidades
IRD_{24h}	Índice Respirométrico Dinámico como promedio de 24 horas en el periodo de máxima actividad	g O ₂ h ⁻¹ kg ⁻¹ MS
IRD_{max}	Índice Respirométrico Dinámico máximo	g O ₂ h ⁻¹ kg ⁻¹ MS
MO	Materia orgánica	%
MS	Materia seca	%
NDF	Fibras neutro-detergentes	
OUR	Oxygen Uptaken Rate	mg O ₂ g ⁻¹ MS h ⁻¹
RSU	Residuos sólidos urbanos	
SC	Conteo de esporas	esporas g MS ⁻¹ o esporas mL ⁻¹
SCT	Complejo de cristales proteicos y esporas	
SDS	Dodecilsulfato sódico	
SEM	Microscopía electrónica de barrido	
sOUR	Velocidad específica de consumo de oxígeno	mg O ₂ g ⁻¹ MS h ⁻¹
UFC	Unidades formadoras de colonias	

CAPÍTULO 1

Introducción

1.1. Introducción

El incremento de la población genera una mayor demanda de alimentos y energía, y tiene como consecuencia un aumento en la generación de residuos, produciendo serios problemas sociales, ambientales y económicos (Browne y Murphy, 2013; FAO, 2011). Asegurar la adecuada gestión de los residuos sólidos es uno de los desafíos clave del siglo XXI y se considera un elemento fundamental para el desarrollo sostenible de las ciudades (Wilson, 2015). En este contexto, la economía circular (Figura 1.1) ha ganado atención como una solución clave para mitigar la creciente generación de residuos sólidos y la escasez de recursos. La economía circular corresponde a un nuevo modelo de crecimiento basado en el uso eficiente de recursos, donde se intenta sustituir la economía lineal basada en producir, consumir y tirar, por una circular en la que se reincorporen al proceso productivo una y otra vez los materiales que contienen los residuos para la producción de nuevos productos o materias primas. En este planteamiento, el reciclaje o la valorización material de los residuos juegan un papel primordial (Bocken et al., 2017).

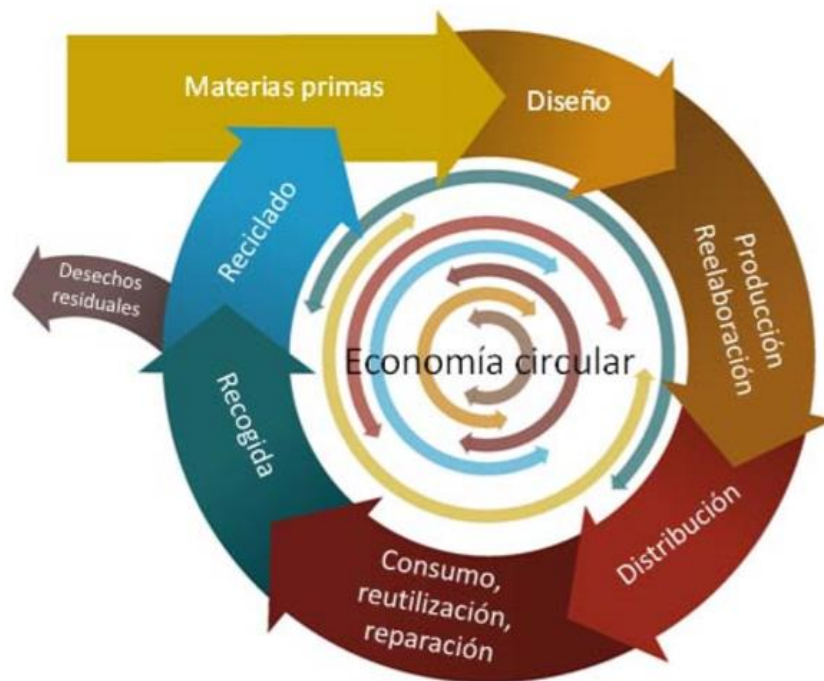


Figura 1.1. Esquema economía circular. (Fuente: Plan Estatal Marco de gestión de residuos (PEMAR) 2016-2022).

1.2. Residuos

La cantidad total de residuos generados está relacionada con el tamaño de la población y el volumen de la economía de un país. Se espera que el crecimiento de la población urbana para el 2050 sea de 9.7 mil millones de personas, y que en Europa aumente la población urbana en un 84.3%. Estas estimaciones se reflejan en la creciente demanda energética y de alimentos, produciendo una alta cantidad de residuos sólidos municipales (FAO, 2011).

Los residuos pueden ser clasificados en función de su origen, distinguiendo aquellos procedentes del sector primario: residuos agrícolas, ganaderos y forestales; los procedentes del sector secundario: residuos industriales (agroalimentarios, textiles, etc.) y finalmente los procedentes del sector terciario o de servicios, constituidos principalmente por residuos sólidos urbanos (RSU) y lodos de estaciones depuradoras de aguas residuales urbanas (Musatti et al., 2017).

Los RSU, denominados residuos domésticos en la Ley de Residuos (Ley 22/2011, de 28 de julio, de residuos y suelos contaminados), son aquellos que se generan en los hogares como consecuencia de las actividades domésticas. Éstos se pueden dividir en diferentes fracciones como son: fracción orgánica, papel y cartón, plástico, vidrio, metales férricos y no férricos, maderas y otros.

En 2015, se generaron 241 millones de toneladas de RSU en la UE (Eurostat, 2019). De estos residuos, el 40-60% eran residuos orgánicos (Fava et al., 2015). Las altas concentraciones de población en núcleos urbanos, el desarrollo de la industria agroalimentaria y la intensificación de las explotaciones ganaderas han facilitado la producción de grandes cantidades de residuos orgánicos que ocasionan graves problemas ambientales (Peng y Pivato, 2019).

Los residuos orgánicos se definen como los residuos biodegradables de jardines y parques, alimentos y residuos de cocina de los hogares, restaurantes, empresas de catering y locales de venta al por menor, y residuos comparables del procesamiento de alimentos o plantas. No incluye residuos forestales o agrícolas, estiércol, lodos de depuradora u otros residuos biodegradables como textiles naturales, papel o madera procesada tal y como lo define la Comisión Europea (2006).

Por lo tanto, es esencial para su gestión, un esquema organizado y efectivo de manera que se pueda llevar el desarrollo urbano a una dinámica completamente sostenible en términos de materiales, productos orgánicos, residuos orgánicos y flujos de energía tanto dentro del área urbana, como entre las áreas urbanas y rurales.

La alta fracción de residuos orgánicos generados actualmente representa un gran desafío en términos de su gestión, puesto que pueden generar olores, emisiones de gases de efecto invernadero (GEI), lixiviados y problemas sanitarios. No obstante, se debe considerar que son un recurso que, siguiendo el modelo de economía circular, sirve para la producción de energía renovable y para generar productos de valor añadido.

De los diferentes grupos de residuos urbanos que se generan, los residuos de fracción orgánica de residuos municipales (FORM), por ejemplo, pueden ser tratados con un sistema de digestión anaerobia (DA) para recuperar energía mediante la producción de biogás, rico en metano, y la estabilización de los residuos mediante la degradación de la materia orgánica (Mata-Alvarez et al., 2000). El subproducto final de la degradación de la FORM es el digestato, que debe gestionarse mediante el compostaje y otros procesos de conversión biológica en el marco de las políticas económicas y medioambientales actuales (Möller y Müller, 2012). Una de las formas de gestionar el uso final del digestato ha sido utilizarlo como fertilizante, y actualmente, se está investigando otra forma de valorizarlo a través de la Fermentación en Estado Sólido (FES) con la posibilidad de obtener bioproductos de alto valor añadido, como enzimas o biopesticidas, entre otros (Ballardo et al., 2017; Musati et al., 2017).

1.3. Fracción orgánica de residuos municipales y digestato

La FORM corresponde a residuos heterogéneos con diversas características según el origen y el sistema de recolección que se aplique (Alibardi y Cossu, 2015). A pesar de la heterogeneidad, la FORM se compone principalmente de residuos de alimentos con un alto contenido de humedad alrededor del 52% - 80% de la masa total de los residuos y una alta biodegradabilidad (Mata-Alvarez et al., 2000). La FORM es potencialmente problemática porque se degrada para formar gases como el metano, genera olores y atrae plagas, produciendo problemas de salud pública cerca de las instalaciones de gestión,

tratamiento y disposición de los residuos, en vertederos principalmente (Peng y Pivato, 2019).

Sin embargo, la aplicación de la directiva de jerarquía integrada de gestión de residuos determina que el reciclaje agrícola de residuos orgánicos debe tener un enfoque más sostenible y ecológico que los métodos tradicionales de eliminación de residuos y recuperación de energía (Sharma et al., 2019). Así, los residuos orgánicos como la FORM deben recogerse por separado o ser reciclados en origen (por ejemplo, mediante compostaje doméstico) o, en su defecto, potenciando los tratamientos de compostaje y las instalaciones de plantas digestión anaerobia (DA).

El compostaje consiste en la conversión biológica de materia orgánica biodegradable en sustancias similares al humus con la ayuda de microorganismos como bacterias, hongos y actinomicetos en un proceso controlado (Atalia et al., 2015). Aplicado a la FORM, los residuos orgánicos se descomponen y estabilizan en términos de reducción en el volumen de residuos, patógenos y compuestos malolientes y generan un producto que puede utilizarse como abono orgánico y enmienda al suelo en la agricultura (Diacono y Montemurro, 2010).

La digestión anaerobia (DA) es una técnica para el tratamiento de residuos orgánicos que implica la recuperación de energía produciendo biogás, un combustible renovable, y la estabilización simultánea de los residuos orgánicos. Se realiza a través de la descomposición de materia orgánica en ausencia de oxígeno con la ayuda de microorganismos, que tienen diferentes tasas de descomposición dependiendo de las temperaturas del proceso, el tiempo de retención y el pH entre otros parámetros (Lohri et al., 2017). Se ha descrito que la digestión a temperaturas termofílicas (55°C) es más eficiente para descomponer residuos orgánicos y destruir patógenos que a temperaturas mesofílicas (37°C) (Shi et al., 2014). El principal subproducto de este tratamiento es el digestato, cuyas características dependerán del tipo de sistema de DA que se utilice, por ejemplo, vía seca o húmeda, continuo o discontinuo, de una etapa o múltiples etapas, entre otros.

El digestato es un material semiestabilizado rico en materia orgánica recalcitrante y minerales, donde la materia orgánica fácilmente biodegradable ya se ha transformado en metano durante la DA (Tampio et al., 2016). El digestato suele tener un contenido de

sólidos superior al 15% cuando la FORM se procesa por vía húmeda (Chanakya et al., 2009) y de casi el 35% cuando se procesa por vía seca (De Baere et al., 2008). Mientras que el contenido de nitrógeno total es de 60–80% de amoníaco (Makádi et al., 2012).

Para gestionar el digestato producido, puede separarse en fracciones sólidas (DA-S) y líquidas (DA-L) mediante el uso de una unidad de separación sólido-líquido. Después de esta separación, los nutrientes se distribuyen entre las fracciones sólidas y líquidas. Se estima que el DA-L contiene un 70–80% del total de amonio, mientras que el 20–30% restante se distribuye en la DA-S (Fuchs y Drosch, 2013). El fósforo en cambio se distribuye de modo que un 55-65% del fósforo total permanece en la DA-S y un 35-45% en la DA-L (Bauer et al., 2009). Se ha descrito también que la DA-S contiene una gran cantidad de fibras lignocelulósicas que no han sido hidrolizadas y podrían contribuir a la producción de enzimas como las celulasas (Pivato et al., 2016).

La estabilidad biológica es un indicador importante para la utilización y disposición final del digestato. Un digestato inestable produce un alto nivel de lixiviado y olores (Lü et al., 2017), característica que se determina a partir del consumo de oxígeno del digestato, ya que éste representa el indicador de estabilidad aeróbica del material, mientras que el potencial de metano residual representa la estabilidad anaeróbica del digestato (Gómez et al., 2006). El consumo de oxígeno de digestato procedente de FORM puede tener valores alrededor de 0.68–0.91 g O₂ kg-VS⁻¹ h⁻¹, un valor ligeramente bajo que explica la estabilidad del digestato (Drennan y DiStefano, 2010).

Una vez estabilizado y cumpliendo con el protocolo de calidad a nivel nacional o europeo (Shi et al., 2014), las tres formas del digestato (es decir, entero, fracción líquida y fracción sólida) se pueden aplicar al suelo como destino final de eliminación y puede calificarse de residuo que pasa a ser un producto (Nkoa, 2014).

Sin embargo, la aplicación directa del digestato en suelos puede implicar que su alto contenido en nutrientes aumente la concentración de nitrógeno en los ecosistemas acuáticos y podría promover la eutrofización de las reservas de agua dulce (Kayhanian, 1999), o saturar los campos con fósforo y nitratos (Fuchs y Drosch, 2013; Bauer et al., 2009). Por lo tanto, es necesario desarrollar usos o destinos alternativos del digestato, además de la aplicación directa a la tierra.

Cuando el digestato se clasifica como un “residuo”, a menudo se requieren tratamientos posteriores, donde se convierte el digestato en carbón o biodiesel, utilizándose como enmienda del suelo o fuente de energía (Monlau et al., 2015).

El concepto de economía circular podría ser una estrategia sistemática para abordar los desafíos de la gestión del digestato, las limitaciones de la aplicación como enmienda orgánica (como productos) y la necesidad de un tratamiento posterior (como un residuo) presentándose como una opción restaurativa y regenerativa para la gestión sostenible del digestato (Dahlin et al., 2016).

Dado que el digestato, como producto final, también puede contener sustancias no deseadas, como impurezas físicas, patógenos, semillas de malezas, metales pesados y contaminantes orgánicos persistentes (Fuchs y Drosig, 2013), ha sido considerado en esta tesis un sustrato para producir un bioproducto con potencial como enzimas o biopesticidas a partir de nuevos enfoques de biorrefinería como es la Fermentación en Estado Sólido (FES).

1.4. Fermentación en Estado Sólido

1.4.1. Definición de Fermentación en Estado Sólido

La fermentación es una técnica ampliamente utilizada para la producción de una gran variedad de sustancias beneficiosas para individuos y la industria. Corresponde a la conversión biológica de sustancias complejas en compuestos simples mediante microorganismos como bacterias y hongos. Los principales productos de la fermentación son dióxido de carbono y alcohol, pero durante esta descomposición metabólica se liberan otros compuestos adicionales, llamados metabolitos secundarios que pueden incluir antibióticos, péptidos, enzimas, entre otros. Se ha demostrado que muchos de ellos tienen potenciales beneficios para el ser humano, la industria y el medio ambiente, llamados compuestos bioactivos y, por lo tanto, tienen importancia económica (Subramaniyam y Vimala, 2012). Esto ha generado que las técnicas de fermentación se modifiquen y refinen para maximizar su obtención.

Existen dos técnicas de fermentación que actualmente se utilizan para obtención de estos metabolitos: Fermentación Sumergida (FmS) y Fermentación en Estado Sólido (FES).

La técnica de FmS utiliza sustratos con exceso de agua libre como melazas y caldos. Los compuestos bioactivos producidos son secretados en el caldo de fermentación. Los sustratos son utilizados rápidamente por los microorganismos y deben ser constantemente reemplazados o suplementados con nutrientes (Subramaniyam y Vimala, 2012).

La FES en cambio, se ha definido como el proceso de fermentación que involucra una matriz sólida y se lleva a cabo en ausencia o casi ausencia de agua libre; sin embargo, el sustrato debe poseer suficiente humedad para soportar el crecimiento y el metabolismo del microorganismo (Thomas et al., 2013). En este caso se pueden distinguir tres fases, una fase sólida, donde la matriz podría ser la fuente de nutrientes o simplemente un soporte impregnado por los nutrientes adecuados que permiten el desarrollo de los microorganismos (Costa et al., 2018), una fase líquida que corresponde a la fina película de agua que se forma alrededor de las partículas sólidas y aporta la humedad suficiente para el crecimiento de los microorganismos (Singhania et al., 2009) y una fase gaseosa, donde el aire es responsable de suministrar el oxígeno necesario para la metabolización microbiana de los nutrientes disponibles (Figura 1.2).

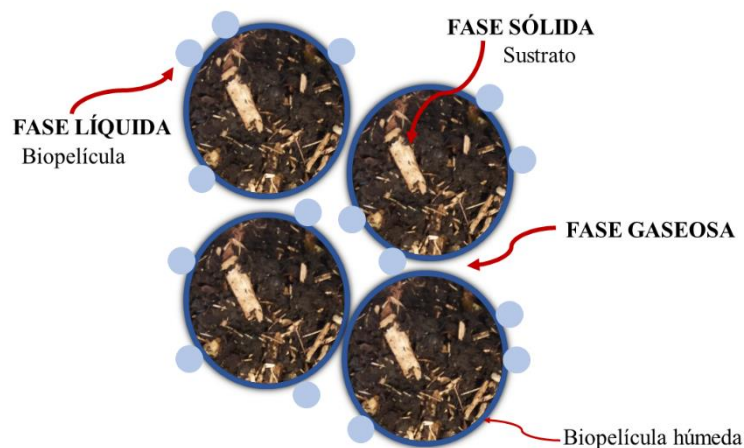


Figura 1.2. Fases del sistema FES involucradas.

En la Tabla 1.1. se observa la comparación de ambas técnicas de fermentación. Si bien el uso de FmS o FES dependerá del compuesto que se desea obtener, la FES tiene ventajas al incluir menores costes de producción con un mayor rendimiento del proceso, menor demanda de energía y agua, lo que implica un menor volumen de agua residual a tratar.

Tabla 1.1. Comparación de las principales características de FES y SmF. El-Bakry et al. (2015)

Característica	FES	FmS
Sustrato	Bajo coste (uso de residuos)	Medios sintéticos
Humedad	Sin agua libre	Medio líquido necesario
Disponibilidad de oxígeno	Directamente de la fase gaseosa	Requiere adición de oxígeno
Control de procesos	Difícil	Fácil
Agitación	Difícil	Fácil
Disponibilidad de nutrientes	Difícil (gradientes de concentración)	Alta (no hay gradientes de concentración)
Concentración de procesos	Típicamente alto	Típicamente bajo
Procesado del producto	Dependiente del proceso	Difícil y caro
Escalado	Difícil, se requieren diseños específicos	Fácil y tecnologías disponibles en el mercado
Inversión	Equipos comúnmente de bajo coste	Equipos comúnmente de alto coste
Residuo líquido	Cantidades reducidas	Cantidades altas

1.4.2. Aspectos generales de la Fermentación en Estado Sólido

Los aspectos más importantes en el proceso de FES son la selección de microorganismos, de los sustratos, los parámetros para la optimización del proceso y la posterior purificación del producto (Pandey, 2003).

Para el proceso de FES la idoneidad de los microorganismos está relacionada con la necesidad de agua. Los más adecuados serían los hongos y las levaduras con un nivel necesario de agua entre 50-60% (Yazid et al., 2017). En cambio, las bacterias no serían aptas porque necesitan un nivel entre 80-90%. Sin embargo, hay una diversidad de bioprocesos donde se ha demostrado que las bacterias también se pueden desarrollar FES (Pandey et al., 2000).

La selección del sustrato adecuado se relaciona con el tamaño de partícula y los nutrientes necesarios. El material sólido no es soluble y puede actuar como soporte físico o fuente de nutrientes que si serán solubles. Puede ser un sustrato sólido natural como cultivos agrícolas, residuos agroindustriales o un soporte inerte, de tal forma que se reproduzcan las condiciones de baja actividad de agua y alta transferencia de oxígeno mediante el uso de un material nutricionalmente inerte empapado en una solución nutritiva (Pandey et al., 2000).

Los parámetros del proceso y su optimización son la clave para la obtención de los bioproductos. Éstos incluyen parámetros principalmente fisicoquímicos como son la temperatura, pH, humedad, aireación, agitación y tamaño de partícula.

Los microorganismos poseen la capacidad de crecer en rangos óptimos de pH y temperatura, y fuera de estos rangos, la tasa de crecimiento puede ser reducida o inhibida. Durante el proceso de FES, se genera una gran cantidad de calor debido a la actividad microbiológica, y se pueden generar productos intermedios que varíen la acidez del medio, pudiendo afectar a las propiedades del producto final, el crecimiento microbiano y, según el tipo de microorganismo, la producción de esporas (Pandey et al., 2003).

El contenido óptimo de humedad está relacionado con el microorganismo y el sustrato utilizado, aunque los valores a los que se recomienda trabajar están entre un 40-60%, debido a que, si los valores son elevados, el espacio de poro del sustrato libre para el aire disminuye impidiendo la circulación de aire, en cambio un valor bajo de humedad dificulta la transferencia de nutrientes disminuyendo el crecimiento microbiano (Pandey et al., 2003).

La aireación es la responsable de suministrar el oxígeno a los microorganismos, eliminando el dióxido de carbono, el calor del fermentador y disminuyendo el vapor de agua y los metabolitos gaseosos y volátiles producidos (Graminha et al., 2008). Si la aireación es escasa, los microorganismos que se desarrollarán serán los anaerobios responsables de la aparición de malos olores, retrasando la descomposición de la materia orgánica. En cambio, si la aireación es excesiva puede enfriar la matriz sólida y secarla favoreciendo el crecimiento de hongos o levaduras.

La agitación mejora la homogeneidad de la matriz sólida, mejorando la transferencia de calor y nutrientes durante toda la fermentación. En todos los casos, una agitación excesiva puede compactar el lecho y en consecuencia disminuir la transferencia de oxígeno por la matriz sólida impidiendo el desarrollo de los microorganismos aerobios. Además, en el caso de un proceso de FES con hongos filamentosos, éstos se pueden dañar, reduciendo la porosidad de la matriz.

El tamaño de la partícula está relacionado con la transferencia de oxígeno a través de la matriz sólida. Si éstas son pequeñas la superficie de contacto será superior, pero el espacio

entre ellas también será menor, limitando la difusión de oxígeno a los microorganismos. Así, cuanto mayor sea la superficie de contacto con el microorganismo la reacción será más rápida y completa, pero también habrá que añadir un agente estructurante para mejorar la aireación.

Los inconvenientes encontrados en la FES con respecto a la FmS son la dificultad de controlar los procesos que ocurren debido a su difícil homogeneización y aparición de gradientes de temperatura y composición, como son las variables de pH, humedad y disponibilidad de nutrientes.

Otra de las limitaciones de la FES tiene relación con el tipo de reactor utilizado, que dependerá a su vez de la cantidad de sustrato utilizado: a escala laboratorio (pocos gramos o pocos kilogramos) y escala piloto (varios kilogramos o toneladas). Los procesos que se llevan a escala laboratorio son difíciles de extrapolar a escala piloto debido a la dificultad de controlar los parámetros del proceso FES (temperatura, humedad, pH y tamaño de la partícula). La comprensión de los efectos de la transferencia de calor y de masa está entre los aspectos más críticos de la FES, debido a la heterogeneidad del sustrato y los gradientes existentes dentro del reactor (Thomas et al., 2013).

1.4.3. Bioproductos a partir de la Fermentación en Estado Sólido

La FES se ha utilizado para la producción de alimentos, aunque actualmente, se centra también en los bioprocesos como la biorremediación, biodegradación de compuestos peligrosos, desintoxicación de residuos agroindustriales, biotransformación de cultivos, biopulping y la producción de productos de valor añadido tales como: enzimas (Cerdeira et al., 2017b), biocombustibles (Botton et al., 2018), biosurfactantes (Jiménez-Peñalver et al., 2017), ácidos orgánicos y aromas (Martínez et al., 2017) y biopesticidas (Ballardo et al., 2017).

Sin embargo, la mayoría de estos estudios se han llevado a cabo a escala laboratorio y, en menor medida, a escala piloto. Por ello, uno de los principales desafíos para el desarrollo de la FES es el escalado de un proceso productivo, por lo comentado al final del apartado anterior.

1.4.4. Fermentación en Estado Sólido a partir de digestato

La fracción sólida del digestato se ha considerado generalmente inadecuada para una conversión adicional en productos de mayor valor añadido y generalmente encuentra su camino en la aplicación en el sector agrícola para el acondicionamiento de suelos y lechos para animales (Knoop et al., 2017) o incinerándose para sustituir la energía de los combustibles fósiles, lo que disminuye las emisiones de GEI (Matsuda et al., 2012).

En FmS se ha utilizado la fracción líquida de digestato para la obtención de enzimas lignocelulolíticas por hongos (Musatti et al., 2017). Este enfoque de valorizar el digestato es económico con el medio ambiente en comparación con los métodos físicos y químicos tradicionales, debido a su bajo consumo de energía y materias primas. El uso de FmS en lugar de FES fue para superar la inhibición por pH y aumentar la accesibilidad a la superficie, dado que el digestato se caracteriza por un nivel de pH relativamente alto (7.5–8.1), pudiendo representar un factor limitante en los cultivos de hongos, que generalmente se establece en un ambiente ácido (Musatti et al., 2017), por lo tanto, al degradar la biomasa lignocelulósica del digestato a partir de diferentes cepas de hongos se puede obtener un producto de valor añadido como son las enzimas extracelulares.

Mejías et al. (2018) propuso la valorización del digestato para obtener celulasas a partir de *Trichoderma reesei*, un conocido productor de celulasas, pero debido a la escasa calidad de nutrientes del digestato no se obtuvieron de celulasas. Esta tesis es la primera investigación en la que se desarrolla la valorización del digestato a partir de la Fermentación en Estado Sólido para obtener nuevos productos como son los biopesticidas a partir de *Bt*.

1.5. Proyecto DECISIVE

Esta tesis se desarrolla dentro del proyecto DECISIVE (www.decisive2020.eu) de la Unión Europea en el programa HORIZON 2020. Este proyecto quiere demostrar la capacidad de reducir la generación de residuo urbano e incrementar el reciclado y la bioconversión a través de la gestión descentralizada de residuos y conversión de la fracción orgánica de los residuos sólidos municipales.

El proyecto pretende cambiar la gestión de flujos de residuos orgánicos urbanos de un escenario lineal a un escenario circular, donde los residuos orgánicos generados en los hogares, restaurantes, empresas de catering se podrían valorizar energéticamente en el mismo lugar donde se producen mediante DA. Por eso esta gestión ayudará a llevar la gestión de residuos a una estrategia de "Cero residuo" y a una eficiencia de recursos.

En este sentido, se promueve una gestión descentralizada de residuos orgánicos urbanos en un circuito cerrado a través de soluciones tecnológicas y no tecnológicas para la creación de una economía circular regenerativa basada en la gestión de residuos orgánicos. De forma tecnológica se centra en desarrollar una gestión de la valorización de los residuos urbanos a través de la DA y la FES en las zonas urbanas y periurbanas, valorizando los residuos orgánicos que se generan en un nuevo producto, tal y como se explica en la Figura 1.3.

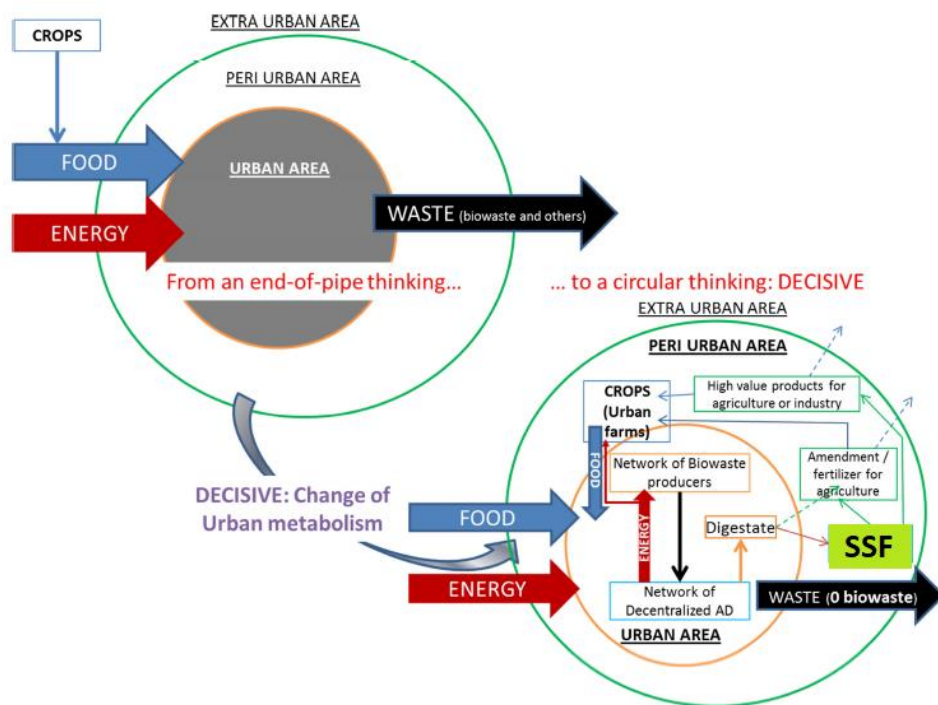


Figura 1.3. Ciclo cerrado de recursos en la gestión de residuos biológicos mediante el proyecto DECISIVE. (Fuente: Proyecto DECISIVE)

En el marco de este proyecto, el objetivo general del trabajo del grupo GICOM, y en consecuencia de esta investigación, es la producción de bioproductos de valor añadido a partir de digestato, fracción orgánica de residuos sólidos municipales y residuos

agrícolas/agroindustriales mediante el uso de la FES. Los bioproductos a explorar son biopesticidas, enzimas hidrolíticas (individuales y mezclas) y biosurfactantes. Como objetivos se desarrollaron las primeras estrategias de escalado del proceso y posibles aplicaciones de los residuos que quedan después de la FES.

1.6. Biopesticidas

A lo largo de los años, se ha registrado un aumento en la incidencia de las plagas que involucran daños y destrucción en cultivos que afectan directamente la agricultura y las prácticas agrícolas (Koul, 2011). Desde la década de 1960, el manejo de plagas en los países industrializados se ha basado en el uso intensivo de pesticidas químicos sintéticos (Chandler et al., 2011). Sin embargo, el uso de pesticidas sintéticos es cada vez más difícil debido al daño que causan en el medio ambiente, la resistencia a las plagas de los insecticidas y los efectos letales en organismos no objetivo (Gill y Garg, 2014). El uso generalizado de pesticidas sintéticos ha disminuido debido a diversas restricciones en los niveles de desarrollo, registro y producción (Velivelli et al., 2014).

Los biopesticidas se definen como “pesticidas biológicos” e incluyen varios tipos de intervención de control de plagas: a través de relaciones predatorias, parasitarias o químicas. El término ha sido históricamente asociado al control biológico, y por implicación, con la manipulación de organismos vivos. Las posiciones normativas pueden verse influenciadas por las percepciones públicas, así, en la UE, los biopesticidas se han definido como "una forma de pesticida a base de microorganismos o productos naturales"(Marrone, 2007).

Por lo general, los biopesticidas tienen ventajas ya que no producen residuos, reducen el impacto sobre las especies que no son su objetivo, se pueden producir disminuyendo los costes en comparación con los pesticidas químicos y a largo plazo pueden ser más efectivos que éstos (Rizvi et al., 2012). En cambio, como inconvenientes necesitan tener una alta especificidad, lo que implica conocer la plaga exacta a la que afecta y su patógeno, además su efectividad es variable con el tiempo, pues al ser organismos vivos que se encuentran influenciados por el medio biótico y abiótico, su velocidad de actuación

es lenta, y por tanto, las plagas pueden producir daños elevados hasta que el biopesticida tenga efecto (Miresmailli y Isman, 2014).

En abril de 2016, hay 299 ingredientes activos de biopesticidas registrados y 1400 registros de productos de biopesticidas activos según la Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos la (EPA) (Marrone, 2007). Los biopesticidas se clasifican en tres tipos diferentes según el principio activo como menciona la EPA (2015): biopesticidas microbianos, productos bioquímicos y semiquímicos. Los biopesticidas microbianos son los agentes de control biológico que reemplazan a los pesticidas químicos y consisten en bacterias, hongos entomopatógenos o virus (Marrone, 2007). El patógeno más exitoso para lograr este objetivo es la bacteria con cualidades insecticidas *Bacillus thuringiensis*. Actualmente, aproximadamente el 75% de todo el uso de biopesticidas consiste en productos basados en *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) (Olson, 2015). Este biopesticida genera un impacto muy bajo en el medio ambiente, ya que reside de forma natural en el suelo (Keshavareddy y Kumar, 2016).

1.7. Cepa de *Bacillus thuringiensis*

El *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) pertenece a la familia del género *Bacillus*. *Bt* es una bacteria aeróbica facultativa gram positiva que habita de forma natural en el suelo y que tiene la propiedad de formar esporas en situaciones de baja concentración de nutrientes, para protegerse (Iriarte y Caballero, 2001). Las esporas son pequeños cuerpos microscópicos que se forman, bien con fines reproductivos o bien, con fines de resistencia a condiciones adversas. Aunque la esporulación o formación de esporas es un proceso común en muchos microorganismos, *Bt* tiene una propiedad especial y es que sus esporas encierran en su interior toxinas en forma de cristal proteico (las proteínas Cyt y Cry) que tienen efecto biopesticida (Soberón y Bravo, 2007).

El cristal proteico se produce durante la esporulación y también es conocido como δ -endotoxina, que está formado por varias unidades polipeptídicas (proteínas tóxicas para el insecto) de diferentes pesos moleculares entre 27 y 140 kDa (Poopathi y Kumar, 2003).

La célula vegetativa de *Bt* tiene un tamaño alrededor de 3 a 5 μm de largo y de 1 a 1.2 μm de ancho. En la Figura 1.4a se observa la célula vegetativa y en su interior formación de

la espora (sp) y el cristal proteico (c). En las Figuras 1.4b y c se observan los cristales proteicos o cuerpos paraesporales una vez han sido liberados de la célula los cuales contienen las toxinas con efecto biopesticida.

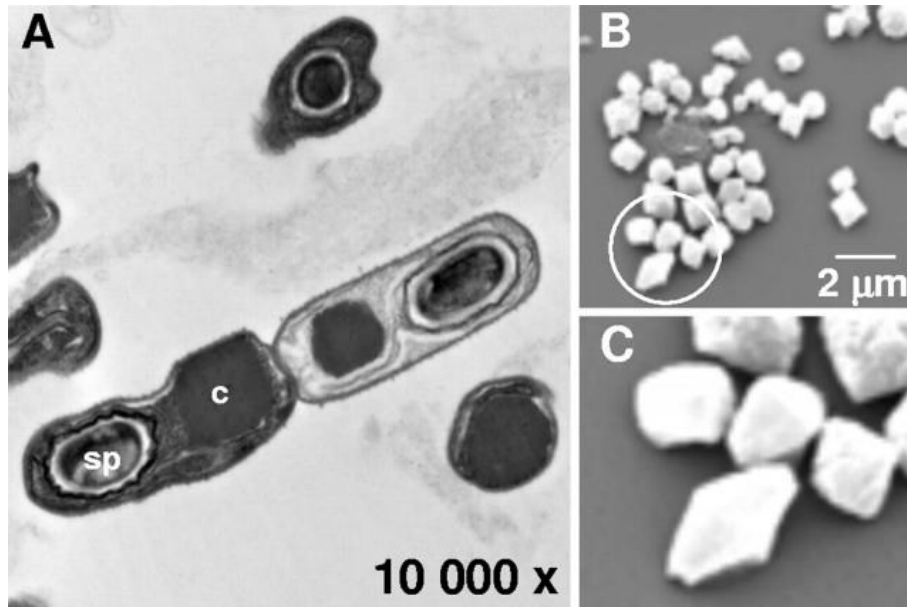


Figura 1.4. Micrografía electrónica de esporas de *B. thuringiensis* (a) y de proteínas Cry purificadas (b y c). (Fuente: Swiecicka *et al.*,2007)

1.7.1. Biología de *Bacillus thuringiensis*

El ciclo de vida de *Bt* se puede dividir en dos fases principales (Figura 1.5): la fase de crecimiento exponencial (ciclo vegetativo que engloba la Etapa 0) y, la fase de esporulación, cuando se produce el crecimiento de la preespora hasta la lisis de la célula madre (de la Etapa I/II hasta la Etapa VII) donde se libera el cristal de la célula (Rejeb *et al.*, 2017).

En la fase de crecimiento exponencial de las bacterias estas catabolizan sus carbohidratos, lo que representa el principal sistema de conversión de glucosa en los metabolitos intermedios (Gutiérrez *et al.*, 2017). Cuando la mitad de los azúcares se han consumido los metabolitos intermedios se catabolizan para producir energía y CO₂ (González-Ponce *et al.*, 2017). Durante la fase de esporulación, el *Bt* esporula debido al estrés relacionado con la falta de nutrientes en el ambiente y a las condiciones adversas (temperatura, pH...), y en esta fase comienza la formación del cristal proteico (Soberón y Bravo, 2007). La

espora es una forma de vida latente que puede permanecer en el ambiente por periodos de tiempo muy largos (años) en ausencia de humedad y nutrientes. Cuando la espora se encuentra de nuevo en un medio rico que contenga los nutrientes necesarios puede germinar para comenzar de nuevo el crecimiento vegetativo (Soberón y Bravo, 2007).

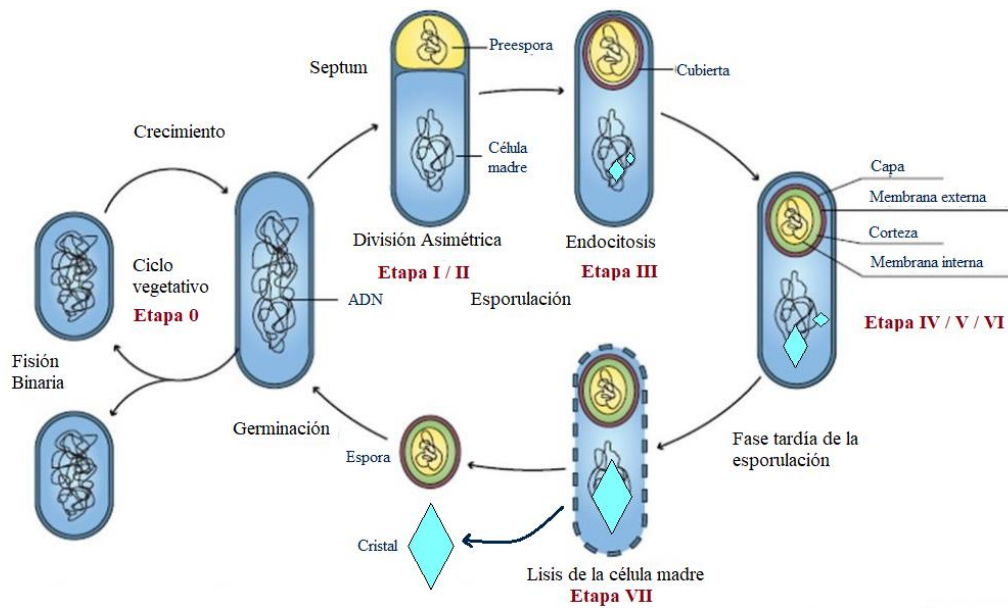


Figura 1.5. Ciclo biológico de *Bacillus thuringiensis*, esporulación y ciclo de germinación.

(Fuente: Adaptado de McKenney, Peter, Driks y Eichenberger, 2012).

Como describen Iriarte y Caballero (2001) la fase de esporulación se puede subdividir en 7 pasos:

- Fase I, el ADN forma un eje longitudinal en la bacteria (célula viable).
- Fase II, se forma un tabique transversal que divide la célula en dos partes asimétricas, encerrando una copia de ADN en cada una de ellas, la membrana de la célula más grande crece alrededor de la más pequeña (preespora).
- Fase III, el córtex, el espacio entre estas dos membranas está lleno de un solo peptidoglicano protegiendo a las bacterias de la presión osmótica. Se forma el cristal proteico.
- Fase IV, hay acumulación de proteínas altamente resistentes que forman la cubierta de la espora.

- Fase V, se desarrolla entre las fases IV y VI donde el cristal define su forma.
- Fase VI, la espora está rodeada por una capa más delgada llamada exoespora.
- Fase VII, lisis de la célula madre, separación de la espora y el cristal.

Finalmente, se requieren enzimas líticas para liberar las esporas y cristales. Cada cristal proteico está constituido por proteínas tóxicas con potencial biopesticida.

1.7.2. Modo de acción de las proteínas tóxicas de *Bacillus thuringiensis*

El modo de acción de estas proteínas tóxicas de *Bt*, es a través de la ingesta de los cristales proteicos por parte de las larvas de los insectos (Iriarte y Caballero, 2001). Cuando el cristal es ingerido por el insecto se disuelve en el intestino mediante las proteasas alcalinas y libera las proteínas transformándolas en toxinas activas presentando efectos tóxicos sobre el insecto.

Los efectos tóxicos que se producen en el insecto comienzan con una hemiplejía bucal a las pocas horas y parálisis del intestino que les provoca diarrea y vómitos ocasionándoles una inmovilización de todo el cuerpo hasta llegar a la muerte. Esto se debe a que se produce un desequilibrio osmótico en las células epiteliales donde las proteínas Cry se insertan en las membranas ejerciendo su actividad tóxica (Bravo et al., 2011).

1.7.3. Factores que afectan al crecimiento, esporulación y formación de la proteína tóxica de *Bacillus thuringiensis*

Los factores que afectan al desarrollo completo de *Bt* son: la fuente de carbono, fuente de nitrógeno, el ión de potasio y metales pesados, así como el pH, temperatura y aireación.

Como fuente de carbono utiliza azúcares produciendo ácidos durante la fermentación (Ozkan et al., 2003). La fuente de nitrógeno debe estar suplementada con algún aminoácido que apoye la esporulación y la producción de toxinas por *Bt*, normalmente la mejor fuente de nitrógeno orgánico ha sido la peptona (Icgen et al., 2002).

Los iones de potasio son esenciales para la producción de toxinas por *Bt* (Ozkan et al., 2003). Además de los iones metálicos como Ca^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} y Fe^{2+} que son esenciales para la producción de la esporulación más alta y la formación de δ -endotoxinas (Icgen et al., 2002).

En cuanto al pH, el *Bt* puede crecer en un rango de 5.5 a 8.5, al inicio de su crecimiento el pH es de 6.8 a 7.2, disminuyendo cuando se libera acetato hasta valores de 5.8, y

aumentando hasta 7.5-8 cuando éste se consume (Icgen et al., 2002). La temperatura óptima de crecimiento es de 30°C (Ozkan et al., 2003) y siempre se necesita una aireación continua, puesto que si ésta falla el *Bt* no crece ni es capaz de esporular generando la toxina (Foda et al., 2002).

1.7.4. Persistencia y seguridad del efecto biopesticida del *Bacillus thuringiensis*

El biopesticida derivado de *Bt* no es dañino para los organismos no objetivo, incluidos los insectos, las aves y los seres humanos (Tirado-Montiel et al., 2001). Las proteínas son biodegradables por lo que tampoco presentan riesgos ambientales, no contaminando suelos ni aguas (Iriarte y Caballero, 2001).

Los factores ambientales por los que se ven afectadas las proteínas, degradándose, son la temperatura, el agua y la luz. Por ejemplo, la temperatura óptima para el efecto biopesticida está entre 10 y 30°C con una viabilidad de efecto tóxico de 30 días (Iriarte y Caballero, 2001). Cuando la temperatura es superior a 30°C las proteínas reducen la actividad pesticida influenciada también por otros factores como el agua, la luz solar y los productos químicos (Osborn et al., 2007). En la exposición a la luz solar (rayos UV) la toxina es destruida pudiendo sobrevivir las toxinas de *Bt* entre 1 y 2 días en el campo y dos semanas si se aplican a la silvicultura (Vettori et al., 2003).

1.7.5. Descripción de las subespecies de *Bacillus thuringiensis*

Existen distintas subespecies de *Bt* que se producen comercialmente debido a que cada una de ellas, según la proteína Cry que contiene, es efectiva contra un tipo de plaga, bien Lepidópteros, Dípteros o Coleópteros.

Las subespecies más estudiadas como productores de biopesticidas y que sirven para la producción de δ -endotoxinas a nivel comercial son *B. thuringiensis* subsp. *Kurstaki* (*Btk*), subsp. *Israelensis* (*Bti*), *Bt Aizawai* (*Bta*) y *Bt Teniobris* (*Btt*) (Dambach et al., 2014; Elleuch et al., 2015).

Cada subespecie de *Bt* puede tener un número variable de plásmidos responsables de la síntesis de diferentes δ -endotoxinas formando más de un tipo de cristal. Estos plásmidos llevan varios genes de toxinas (genes Cry), a veces idénticos y, por lo tanto, permite aumentar su espectro de acción contra más especies de insectos (Rabinovitch et al., 2017). Las diferentes subespecies de *Bt* pueden intercambiar fácilmente sus plásmidos mediante

un proceso como la conjugación, un fenómeno que se ha demostrado en el intestino de las larvas de mosquitos. La Tabla 1.2. resume las subespecies más importantes de *Bt* con el tipo de plaga y cultivo a los que va dirigidos en función de las endotoxinas.

Btk fue aislado por primera vez en 1962 por Edourad Kurstak de larvas muertas de la polilla de la harina del Mediterráneo (*Anagasta kuekniella*) de un molino harinero en Bures Sur Yvette, cerca de París, Francia. Abbott Labs introdujo el primer producto comercial 'DiPel' en 1970. La primera cepa aislada de *Btk* fue HD-1 aplicada contra la lombriz roja enferma (*Pectinophora gossypiella*) por Dulmage (1970) y la HD-263 contra la polilla almendrada muerta (*Ephestia cautelln*). La mayoría de los aislamientos de *Btk* (p. e., HD-73) producen un gran cristal parasporal bipiramidal (1.1 x 0.5 μ m) que contiene una proteína única que casi siempre es tóxica para los lepidópteros. Sin embargo, en algunos aislamientos de *Btk* el cristal bipiramidal está acompañado por un cristal cuboidal más pequeño y es tóxico para los lepidópteros y los mosquitos (Peart et al., 2000).

Bti fue encontrado en Israel por Barjac. Esta cepa tiene actividad insecticida en mosquitos, moscas negras, moscas y moscas de establo en la etapa larvaria. Es específico para larvas de dípteros (Goldberg et al., 1980). Por lo tanto, *Bti* ha resultado ser de gran importancia, especialmente en los trópicos, debido a su potencial como insecticida biológico contra las especies de *Anopheles*, *Aedes*, *Culex* y *Simulium damnosum*, portadores de enfermedades como la malaria, la fiebre amarilla, la filariasis y la ceguera del río, respectivamente (Darriet, 2016; Hayakawa et al., 2017). La mayoría de las cepas de *Bti* activas contra los mosquitos producen inclusiones parasporales de forma esférica o irregular, un diámetro promedio de aproximadamente 1 μ m de, con un rango de 0.7 a 1.2 (Peart et al., 2000).

Una de las características más atractivas de *Bti* es su carácter tolerante a humedad y temperatura. Esto permite que sus formulaciones se puedan almacenar a temperatura ambiente y resulten en formulaciones estables durante mucho tiempo (Foda et al., 2010). Sin embargo, en el medio acuático, su actividad larvicida es de corta duración.

Tabla 1.2. Variedades de *Bt* relacionando su proteína insecticida, plaga y cultivo al que afecta.

<i>Bt</i> variedad	Proteína Cry	Orden	Plaga	Cultivo	Referencia
<i>Bt Kurstaki</i> (<i>Btk</i>)	CryIA, CryIA, CryIA(a), CryIIA, CryIIB, CryIA(a)	Lepidópteros	<i>Aglaope infausta</i>	Almendra	(Zhang, et al., 2013)
			<i>Autographa gamma</i>	Tomate	(Smitha et al., 2013)
			<i>Chrysodeixisincludens</i>	Haba de soja	
			<i>Ostrinia nubilalis</i>	Maíz	
			<i>Pieris breassicae</i>	Repollo	
			<i>Preays citri</i>	Cítricos	
			<i>Prays oleae</i>	Aceituna	
			<i>Lobesia botrana</i>	Melocotón	
			<i>Anarsia Lineatella</i>	Vid	
			<i>Plutella sylostella</i>		
<i>Sparganothis pilleriana</i>					
<i>Bt Israelensis</i> (<i>Bti</i>)	CryIVA, CryIVB, CryIVC, CryIVD, CytA	Dípteros	<i>Aedes</i>		(Poopathi y Kumar, 2003)
			<i>Anopheles</i>		(Foda et al., 2010)
			<i>Culex</i>		
			<i>Culiseta</i>		
			<i>Orthocladus</i>		
			<i>Típula</i>		
			<i>Simulium</i>		

<i>Bt</i> variedad	Proteína Cry	Orden	Plaga	Cultivo	Referencia
<i>Bt Aizawai</i> (<i>Bta</i>)	CryIA, CryIA, CryIC, CryID	Lepidópteros	<i>Agrotis ipsilon</i> <i>Autographa gamma</i> <i>Chrysodeixis chalcites</i> <i>Earias insulana</i> <i>Etiella sinckenella</i> <i>Eupoecilia ambiguella</i> <i>Prays oleae</i> <i>Acrolepiosis assectella</i> <i>Helicoverpa armiguera</i> <i>Plutella sylistella</i> <i>Spodoptera littoralis</i> <i>Spodoptera exigua</i>	Col de tomate Algodon judío Puerro Aceituna	(Gonçalves et al., 2018)
<i>Bt Teniobris</i> (<i>Btt</i>)	CryIII A	Coleópteros	<i>Leptinotarsa decemlineata</i>	Patata	

También hay otras subespecies de *Bt* activas en lepidópteros como la conocida *Bacillus thuringiensis aizawai* (*Bta*), que se puede aplicar contra el grupo de *Spodoptera* e insectos que han desarrollado resistencia a *Btk* (Kim et al., 2017); *Bacillus thuringiensis subespecie teniobris* (*Btt*) que fue descubierta en 1983 y es eficaz contra las larvas de coleópteros y que puede infectar la larva del escarabajo de la patata de Colorado, que causa la mayor plaga de la patata en Europa y América del Norte, y ha desarrollado resistencia a muchos insecticidas químicos (Fuente-Salcido et al., 2016).

1.8. Biopesticidas a partir de *Bacillus thuringiensis*

Los biopesticidas a partir de *Bt* se empezaron a producir en las primeras décadas del siglo pasado, después de que el biólogo japonés Shigetane Ishiwatari en 1902 descubriese el *Bt*, y en 1911 Ernst Berliner aislara la bacteria debido a la enfermedad que contraían las orugas de la polilla gris de la harina, dando su nombre a *Bt* en honor a la región donde fue encontrada, Turingia. El primer producto comercial de *Bt* fue desarrollado en el año 1938 en Francia con el nombre de “Sporine”, pero hasta los años 60 no se realizaron pruebas de campo contra las plagas.

Actualmente, todos los biopesticidas vendidos o distribuidos deben estar registrados por la EPA con estudios científicos que demuestren que se pueden usar sin representar riesgos injustificados para las personas o el medio ambiente (EPA 2015). Los biopesticidas producidos a base de *Bt* también se encuentran regulados por la EPA registrándose como un insecticida microbiano al que se le deben realizar varios análisis para evaluar la toxicidad y si existe efecto en otros seres vivos y en el medio ambiente (Lacey et al., 2001). En Europa el registro de los biopesticidas se regula como productos fitosanitarios, no se encuentran reconocidos como biopesticidas, con el Reglamento 1107/2009 de protección vegetal de la UE. Además, se debe llevar a cabo con otros Reglamentos y Directivas de la UE como es la Directiva 2009/128/CE sobre el uso sostenible de los plaguicidas y el Reglamento sobre los niveles máximos de residuos (LMR) en los alimentos.

La comercialización de biopesticidas a base de *Bt* se encuentra disponible en diferentes formulaciones, como concentrados líquidos, polvos humectables, polvos y gránulos listos para usar. Las preparaciones comerciales de *Bt* consisten en una mezcla formulada de esporas y cristales, ya que, como se ha comentado un cristal proteico solo puede matar a un insecto (Rabinovitch et al., 2017). La espora también puede aumentar la actividad del cristal protegiéndolo de la luz UV, ya que el cristal de la toxina de *Bt* es sensible a la luz UV y se puede inactivar con la exposición a la luz solar (Ruan et al., 2004).

El biopesticida a partir de *Bt* se utiliza comercialmente para controlar plagas en los bosques y los insectos agrícolas; ya que como se ha explicado antes es seguro contra humanos, animales, fauna y el medio ambiente (Wang et al., 2014). Sin embargo, su uso ha sido restringido debido a su alto coste de producción (Yezza et al., 2006a), ya que comercialmente se produce en un medio sintético que comprende harina de soja, harina de pescado, glucosa, extracto de levadura, peptona y oligoelementos que se agregan para mejorar el proceso de esporulación (Tirado-Montiel et al., 2001). Este proceso se realiza con una FmS, proceso de producción tradicional de *Bt*, pero conlleva problemas debido a la baja concentración de producto final y al procesamiento posterior del mismo que resulta complicado (Brar et al., 2006). Además, el coste de los medios de fermentación ronda el 35-59% del total de la fermentación (Yezza et al., 2006a).

Por ello, en los últimos años, la FES se ha estudiado para producir *Bt* y otros agentes de control microbiano utilizando residuos agrícolas e industriales como sustrato (El-Bendary, 2006). *Bt* necesita medios de cultivo que contienen fuentes de nitrógeno, carbono y sales minerales para crecer, por lo que se han podido sustituir las materias primas utilizadas por residuos que contienen los nutrientes necesarios para ello, reduciendo así los costes de las fermentaciones (Ndao et al., 2017).

1.8.1. Producción de biopesticidas a partir de *Bacillus thuringiensis* utilizando residuos como sustratos

1.8.1.1. Fermentación sumergida

Los primeros estudios sobre FmS para producir biopesticida derivado de *Bt* se iniciaron en 1970, en la Universidad Estatal de Campinas (UNICAMP) para explorar la viabilidad de producir preparaciones de endotoxinas de *Bt*, usando residuos agroindustriales como levadura forrajera, leche de soja y proteínas de semillas leguminosas (Alves et al. 1997).

Los informes de Stanbury et al. (1995) sobre la reducción de costes del proceso de producción permiten sustituir el medio comercial por materias primas provenientes de la agricultura y la industria. Las materias primas estudiadas para producir biopesticida a partir de *Bt* son la harina de soja con residuos agroindustriales complejos (azúcar de caña, almidón soluble, frijol de soja, almidón de yuca, almidón de maíz, paja de arroz, salvado de trigo, licor de maíz, melaza de caña de azúcar, suero de queso y residuos de coco) (Mummigatti y Raghunathan, 1988 ; Escobar et al., 2004; y Mourao, 2008; Vu et al., 2009 ; Rahbani-Mounsef et al., 2014a; Jouzani et al., 2015), aguas residuales de la industria del almidón (Brar et al., 1998; Vu et al., 2010) y lodos de aguas residuales (Mohammedi et al., 2016) con diferentes tratamientos (Tirado-Montiel et al., 2001) en el laboratorio y en gran escala (Yezza et al., 2006a). Estos sustratos permiten el crecimiento, la esporulación y la formación de cristales para obtener un biopesticida a base de *Bt*.

Uno de los primeros estudios sobre la producción de *Bt* fue con semillas de leguminosas, mezcla de soja con almidón soluble o melaza de azúcar de caña, observando que parte de los aminoácidos que contienen estos sustratos ayudan al crecimiento de la δ -endotoxina y otros lo inhiben (Mummigatti y Raghunathan, 1988).

Los lodos de aguas residuales mostraron resultados positivos a escala de laboratorio y escala piloto ya que el *Bt* pudo crecer y esporular. En este estudio el problema fue la presencia de patógenos y metales tóxicos. Además, se observó que cuando el pH era inferior a 5, se podía inhibir el crecimiento, debido a una débil esporulación y la formación de cristales proteicos de *Bt* (Tirado-Montiel et al., 2001). Estos autores también encontraron que la variación de toxicidad se relaciona directamente con los nutrientes disponibles, el origen de los lodos y los métodos empleados para su generación (Yezza et al., 2006a). Las fuentes de carbono, nitrógeno y la relación de C/N influyen al tamaño, la composición y la formación de la δ -endotoxina que afecta a la toxicidad en la plaga. Si la concentración de nitrógeno era baja (146.3 mg L^{-1}) y la cantidad de carbohidratos elevada se producía un crecimiento de células viables de *Bt*, retrasando la esporulación.

Tabla 1.3a Producción de biopesticida a partir de *Bacillus thuringiensis* (*Bt*): principales parámetros de FmS.

Referencias	<i>Bt</i>	Sustrato	Volumen (L)	Agitación (rpm)	Aireación (VVM)	Temp (°C)	pH	Inóculo (% (v/v))	C/N	Tiempo (h)
(Jouzani et al., 2015)	<i>Btk</i>	AW	1.5	300-1200	1	30	6.5	2		12
(Mohammedi et al., 2015)	<i>Btk, Bta, Btt, Bti</i>	WS	0.1	-	-	30	6.9±0.1	2	12.5	48
(Rahbani-Mounsef et al., 2015)	<i>Btk</i>	CM	1.5	340-500	0.033-1	30	NC	50(a)	-	35
(Anakwenze et al. 2014)	<i>Btk</i>	SMG	0.020	160	-	30	7	1(a) 3.5·10 ⁶ (b)	-	72
(Rahbani-Mounsef et al. 2014)	<i>Btk</i>	CM	2.9	500	0.033	30	NC	2	-	48
(Emandes et al., 2013)	<i>Bti</i>	TM	0.50	150		30	7	1(a) 2·10 ² (b)		120
(Vu et al., 2012)	<i>Btk</i>	SIW	10	300-500		30	7	2	-	48
(Khedher et al., 2011)	<i>Btk</i>	SIWS	0.50	200	-	30	7	-	-	96
(Vu et al., 2010)	<i>Btk</i>	SIW	10	300-500	2-4	30	7	2	13.9	72
(Vu et al., 2009)	<i>Btk</i>	SIW	10	250-500	2-4	30	7	2.5	13.9	48
(Valiciente y Mourao, 2008)	<i>Btt.</i>	MS	0.15	200	-	30	7.2	5	34.1	96
(Vu et al., 2008)	<i>Btk</i>	IW	10	300-350	2-2.5	30	7	2	12.9	48
(Yezza et al., 2006a)	<i>Btk</i>	IW, WS	100	100-150	0.3 - 0.5	30	7	2	10.12	48
(Poopathi y Kumar, 2003)	<i>Bti</i>	PSB	0.002	200	-	37	7	-	-	72
(Tirado-Montiel et al., 2001)	<i>Btk</i>	WS	0.25	250	-	30	7	1·10 ³ (b)	-	264
(Brar et al., 1989)	<i>Btk</i>	SIW	12	250-400	2.5 - 3.5	30	7	2	14.9	48

Btk: *Bt* var. *kurstaski*
Bta: *Bt* var. *aizawai*
Btt: *Bt* var. *teniobris*
Bti: *Bt* var. *israelensis*

AW Residuo agroindustrial
 WS Lodos
 CM Molienda de cereales
 SMG Medio estéril con glucosa

TM Triptosa and milhocina
 SIW Residuo industrial
 SIWS Residuo industrial y soja
 MS Harina de maíz y soja

PSB Harina de patata y azúcar
 UFC: Unidades Formadoras de colonias.
 (a) Unidades: mL
 (b) Unidades: UFC mL⁻¹

Tabla 1.3b. Producción de biopesticida a partir de *Bacillus thuringiensis* (Bt) principales resultados de FmS.

Referencias	Células viables (UFC mL ⁻¹)	Esporas (esporas mL ⁻¹)	Cristal (Crys mL ⁻¹)	Esporulación (%)	Toxina (mg L ⁻¹)	Toxicidad (SBU L ⁻¹)
(Jouzani et al., 2015)	-	5.2·10 ⁹	-	-	750	-
(Mohammedi et al., 2015)	1.90·10 ⁷ -6.40·10 ⁹	1.57·10 ⁷ -4.40·10 ⁹	-	82.6-97.0	-	(9.7-14.7)·10 ⁹
(Rahbani-Mounsef et al., 2015)	2·10 ⁷	1.98·10 ⁹	2.49·10 ⁹	-	2.49·10 ³	-
(Anakwenze et al. 2014)	-	-	-	-	-	-
(Rahbani-Mounsef et al. 2014)	1.96·10 ⁹	1.66·10 ⁹	1.80·10 ⁹	-	2.4 10 ³	-
(Emandes et al., 2013)	-	3·10 ⁸	-	-	2.8 10 ⁻³	-
(Vu et al., 2012)	5.6·10 ⁸	4.3·10 ⁸	-	-	-	12.4·10 ¹⁰
(Khedher et al., 2011)	62.8·10 ⁶	105.9·10 ⁴	-	-	3.347·10 ³	-
(Vu et al., 2010)	25·10 ⁸	13·10 ⁸	-	-	1.67	18.5·10 ³
(Vu et al., 2009)	8.3·10 ⁸	3·10 ⁸	-	85.7 %	1.12·10 ³ -	-
(Valiciente y Mourao, 2008)	3.9·10 ⁷	4.39·10 ⁸	-	-	-	-
(Vu et al., 2008)	3.5·10 ⁸	1.43·10 ⁸	-	57.1	1.043 10 ³	18.4·10 ⁹
(Yezza et al., 2006a)	(2.93-16.9)·10 ⁸	(6.47-66.7) ·10 ⁸	-	95-22	1.043·10 ³	(6-18)·10 ⁹
(Poopathi y Kumar, 2003)	-	-	-	-	-	-
(Tirado-Montiel et al., 2001)	1.4·10 ⁷	1.2·10 ⁷	-	86	1.043 10 ³	4100 (a)
(Brar et al., 1989)	1.67·10 ⁹	8.4·10 ⁶	-	-	-	17.1·10 ⁹

UFC: Unidades Formadoras de colonias.

SBU: Spruce budworm units

UI: Unidades Internacionales.

(a) Unidades: UI µL⁻¹

El efecto de las condiciones de aireación es un factor clave para la producción de *Bt*. Rahbani-Mounsef et al. (2015) evaluaron este efecto a partir de un medio con cereales para mejorar la productividad de las proteínas de la toxina y observaron un aumento lineal de la tasa de crecimiento específica promedio con el aumento de la transferencia de O₂ y una esporulación y liberación más rápida de cristales proteicos y δ -endotoxinas.

La Tabla 1.3a resume las condiciones de cultivo en los estudios más importantes de FmS para la producción de biopesticida a partir de *Bt* y la Tabla 1.3b los valores más importantes de células viables, esporas, cristal, δ -endotoxina y la toxicidad obtenidas estas pruebas.

1.8.1.2. Fermentación en Estado Sólido

La primera aplicación de FES para la producción de *Bt* apareció en forma de patente estadounidense de Mechalas (1963), seguida de los informes de Dulmage y Rhodes (1971). En estudios posteriores, a partir del año 2002, se han utilizado residuos como sustratos disminuyendo así los costes de producción de biopesticida derivado de *Bt* (Adams et al., 2002). Algunos ejemplos de materias primas utilizadas para producir *Bt* son: harina de patata (Adams et al., 2002; Poopathi y Kumar, 2003; Smitha et al., 2013), salvado de trigo (Devi et al., 2005), lodos de aguas residuales (Zhuang et al., 2011; Mona Fatin et al., 2016), residuos de los capullos de gusanos de seda (Patil et al., 2013); residuos de cocina (Zhang et al., 2013), residuos de hongos (Wu et al., 2014), residuos de alimentos (Zou et al., 2016), residuos agroindustriales (Foda et al., 2010; El-Bendary et al., 2016), residuos de soja (Ballardo et al., 2016), fracción orgánica de residuos municipales (Ballardo et al., 2017).

En los estudios de FES para producir biopesticida a partir de *Bt* se han optimizado parámetros como son la cantidad de inóculo, pH inicial, sales, grasas y aireación. La cantidad de inóculo inicial óptimo observada por Zou et al. (2016) depende de la competencia entre microorganismos, no necesariamente al aumentar la cantidad de inóculo se incrementa la producción de *Bt*. El pH debe estar en un valor neutro o alcalino (7-9), a valores inferiores a 5 se inhibe la formación de la toxina. El contenido en sales afecta a las células porque puede deshidratarlas e inhibir el crecimiento de *Bt* influyendo en la formación de la δ -endotoxina. Cuanto mayor es el contenido en grasas, que influye en la viscosidad, la transferencia de oxígeno es menor, afectando al crecimiento de células

viales de *Bt* y a la δ -endotoxina (Mona Fatin et al., 2010). Devi et al. (2005) estandarizó un método de aireación a intervalos de 8 h, comenzando a las 16 h después de la incubación para apoyar el crecimiento óptimo de *Bt* con salvado de trigo y melaza. Patil et al. (2013) observaron que un sustrato con valores altos en proteínas (44.9-57.5%), lípidos (40-30.5%) y una fuente de carbono disponible puede ayudar a la producción de *Bt*.

Otro impacto en el crecimiento y la toxicidad *Bt* fue el efecto de los metales pesados (Pb (II), Cu (II), Cd (II) y Cr (III)) observando que cuando la exposición de Cu (II) es de 150 mg L⁻¹ se reduce la cantidad y el tamaño de los cristales proteicos, lo que disminuye la síntesis de δ -endotoxinas y la toxicidad del *Bt* (Zhuang et al., 2011).

En otros estudios de FES, la producción de *Bt* se optimizó gracias a la posibilidad de utilizar los residuos de cocina para observar el efecto sobre el crecimiento y la toxicidad de *Bt*. Zhang et al. (2013) obtuvieron el medio óptimo con un 55.21% de residuos de cocina, 22.08% de salvado de trigo, 11.04% de polvo de torta de soja, 11.04% de cascaras de grano y 0.63% de iones mixtos.

El escalado del proceso para obtener biopesticida derivado de *Bt* se probó por varios autores como Poopathi y Kumar, (2003), El-Bendary et al., (2006), Zhang et al., (2013) y Wu et al., (2014). Todos los estudios concluyeron que los problemas que se asocian con el proceso de escalado de FES están relacionados con la transferencia de masa y calor debido al sustrato sólido (Luna-Finkler y Finkler, 2012), además de la agitación, el contenido de humedad, la aireación, la transferencia de oxígeno, disponibilidad de nutrientes y la temperatura en el reactor (Raghavarao et al., 2003). Por ejemplo, El-Bendary et al., (2006) concluyeron que la cantidad de material en el lecho causa problemas de aglomeración afectando al crecimiento microbiano debido a una falta de transferencia de oxígeno. También, Zhang et al. (2013) observaron que, al escalar el proceso hasta una cantidad de 40 kg, las esporas y la toxicidad disminuyen debido a una menor transferencia de oxígeno y la difícil accesibilidad de los nutrientes por parte del *Bt*.

Tabla 1.4a. Producción de biopesticida a partir de *Bacillus thuringiensis* (*Bt*): principales parámetros de FES.

Referencias	<i>Bt</i>	Sustrato	Volumen (g)	Humedad (%)	Aireación (mL min ⁻¹)	Temp (°C)	pH -	Inóculo (% w:w) esporas mL ⁻¹	C/N ratio -	Tiempo (h)
(Ballardo et al., 2017)	<i>Btk</i>	OSW	3800	59.3 ± 2.1	(a) CS	40- 69	8.22±0.07	10	16.9	1200
(Zou et al., 2016)	<i>Btk</i>	FW	-	75.25	(b) 250	30	5.67	0.2	20.03	72
(El-Bendary et al., 2016)	<i>Bti</i>	AIW	50	15	Agitación diaria	-	7	10	-	120
(Mona Fatin et al., 2016)	<i>Bt</i>	WSWB	-	-	(b) 150	30	7.00	-	-	240
(Ballardo et al., 2015)	<i>Btk</i>	SW	100 2300	50.1	(a) 15	30 60-65	7.35 7.33	10	12.2	480
(Wu et al., 2014)	<i>Bti</i>	SM	10	-	(b) 150	32	7.20	10	11.55	360
(Patil et al., 2013)	<i>Bt</i>	PW-SL	500	75	-	32	7.00	(g)1·(10 ⁹)	-	120
(Smitha et al., 2013)	<i>Btk</i>	PF	(c)100	-	(b) 125-140	37	-	(e)10	-	12
(Zhang et al., 2013)	<i>Btk</i>	KW	(c)15 35	50	80	35	5.63±0.03	15	-	45
(Zhuang et al., 2011)	<i>Btk</i>	SWB	8.0 L	60	100	30	7.2	(f) 2	10.12	72
(Foda et al., 2010)	<i>Bti</i>	BL	(c)250	60	-	30	-	-	-	216
(Devi et al., 2005)	<i>Btk</i>	WB	50	-	-	30	7.2	(d) 10	-	48
(Adams et al., 2002)	<i>Btk</i>	BL	10	60	-	30	-	(g) 1.5· (10 ⁸)	12.7-9.4	72

Btk: *Bt* var. *kurstaski*
Bti: *Bt* var. *israelensis*

OSW Residuo orgánico sólido
 FW Residuo de comida
 PF Harina de patata

AIW Residuo agroindustrial
 WB Salvado de trigo
 BL Residuo de pollos

WS Lodos de aguas residual
 SL Residuo de capullo de
 gusanos.
 SM Residuo cultivo de hongos

SW Residuo de soja
 KW Residuo de cocina
 SWB Lodo y salvado de trigo

UFC: Unidades formadoras de colonias

(a)Estrategia control de aire (Puyuelo et al. 2010) (b) Agitación (rpm) (c) ml (d) % (v/v) (e) % (w/v) (f) (% wt.) (g)UFC L⁻¹

Tabla 1.4b. Producción de biopesticida a partir de *Bacillus thuringiensis* (Bt: principales resultados de FES.

Referencias	Células viables (UFC g ⁻¹ MS)	ESporas (UFC g ⁻¹ MS)	Toxina (mg g ⁻¹)	LC ₅₀ (µg mL ⁻¹)	Toxicidad (UI mg ⁻¹)
(Ballardo et al., 2017)	1.7-2.2·(10 ⁷)	1.3-2.1·(10 ⁷)	-	-	-
(Zou et al., 2016)	1.03·(10 ¹¹) (a)	2.23·(10 ¹¹) (a)	231·(10 ⁻⁶)	-	56875
(El-Bendary et al., 2016)	-	L: 221-234·(10 ⁸) ES: 222- 252·(10 ⁹)	- ES:8.8-9.2	L: 1 ·10 ⁻⁵ ES: 3 ·10 ⁻⁵	-
(Mona Fatin et al., 2016)	-	1.64·(10 ¹¹) (a) (10 days)	-	8.43·(10 ⁸)	1487
(Ballardo et al., 2015)	E: 6.2·(10 ¹¹) NE: 3.8·(10 ⁹) ES:9.5·(10 ⁷)	E: 8.6·(10 ¹⁰) NE: 1.3·(10 ⁸) ES:1.1·(10 ⁷)	-	-	-
(Wu et al., 2014)	L: 1.25±6·(10 ⁹) ES: 3.8·(10 ⁹)	L: 95±5·(10 ⁹)	-	L: 2±0.09 ES: 1.2±0.1	SC: 1.487
(Patil et al., 2013)	-	3 - 3.5·(10 ¹⁰)	-	-	-
(Smitha et al., 2013)	-	-	6.31 ·10 ⁶ (48h)	-	-
(Zhang et al., 2013)	-	L: 5.01·(10 ¹⁰) ES: 9.6·(10 ⁸)	-	-	L: 15200 ES: 10874
(Zhuang et al., 2011)	5.98±0.42·(10 ¹⁰)	5.26±0.32·(10 ¹⁰)	7.14 ± 0.35	-	4758
(Foda et al., 2010)	58.33 ± 1.97 (10 ⁶)	47.00 ± 13.89 (10 ⁶)	-	142.4-220.4	-
(Devi et al., 2005)	-	L: 9.2·(10 ¹⁰); SC: 12.6·(10 ¹⁰)	L: 66; ES: 112	ES: 222.09	-
(Adams et al., 2002)	5·(10 ¹⁰)	6·(10 ¹⁰)	8.4 ·10 ⁶	-	-

E: Estéril;
UFC: Unidades Formadoras de colonias.

NE:No estéril;

L: Laboratorio
UI: Unidades Internacionales.

ES:Escalado
(a) Unidades: UI µL⁻¹

Todos los detalles de los sustratos utilizados para producir biopesticida a base de *Bt* por FES se recogen en Tabla 1.4a y la Tabla 1.4b, donde se muestran los parámetros estudiados para el proceso de FES y los valores más importantes obtenidos en la producción de biopesticidas a partir de *Bt*, como células viables, recuento de esporas, δ -endotoxina, las dosis letales (LC₅₀) y toxicidad.

Los reactores que se utilizan para obtener biopesticida derivado de *Bt* suelen ser matraces Erlenmeyer, reactores de columna de vidrio o botellas Roux a escala de laboratorio. Cuando se escala el proceso, los reactores utilizados son reactores de bandejas o tambor. En los de bandeja, el fondo está perforado de tal manera que mantiene el sustrato y permite la aireación de la superficie inferior del sustrato (Krishania et al., 2018). Los reactores de tambor consisten básicamente en un reactor en forma de tambor equipado con un dispositivo giratorio y provisto de una entrada y salida de aire (Spier et al., 2011).

1.8.1.3. Comparación entre Fermentación sumergida y Fermentación en Estado Sólido

Las ventajas de la FES en relación con la FmS ya se explicaron anteriormente (apartado 1.4.1). Si se concretan en el caso de la producción de biopesticidas a partir de *Bt*, se puede concluir lo siguiente.

No siempre es viable económicamente la implementación de la FmS debido al alto coste relacionado con la necesidad de aireación y el uso de antiespumantes (Brar et al., 2006). Además de que requiere la implementación de grandes reactores, para el posterior centrifugado del producto final a alta velocidad e instalaciones de secado para obtener el biopesticida producido a partir de *Bt* (El-Bendary, 2006).

La FES ofrece una tecnología alternativa que presenta ventajas como las citadas anteriormente en el apartado de FES en general. Añadiendo a este tipo de bioproducto la facilidad de esporular sobre un sustrato sólido con baja inversión de capital y la obtención de un producto concentrado (Hölker et al., 2004; Singhania et al., 2009). De todas formas, es difícil lograr una aplicación industrial a gran escala, debido a la lenta transferencia de masa, que se debe vigilar mediante el control de humedad y temperatura de la fermentación, no siempre fácil (Pandey et al., 2000).

La producción de biopesticida derivado de *Bt* se puede comparar a través de su producción a partir de lodos de aguas residuales entre FmS (Mohammedi et al., 2006;

Tirado-Montiel et al., 2001; Yezza et al., 2006a) y FES (Mona- Fatin et al., 2016; Zhuang et al., 2011). En este caso, los valores obtenidos de colonias y esporas en FES son mayores en dos unidades: en general, comparando los valores de células viables son más altos en FES, estando en una magnitud entre 10^6 hasta 10^9 UFC g MS⁻¹, y las esporas entre valores de 10^6 y 10^{11} esporas g MS⁻¹ dos unidades más altas que en FmS. También, la toxicidad aumenta un 20% cuando se trabaja en FES (Zhuang et al., 2011). En cuanto al volumen de los reactores utilizados es mayor en FES que en la FmS. Mientras tanto, los valores de δ -endotoxina y toxicidad fueron mayores con FES hasta 15200 UI mg⁻¹ cuando las esporas llegaron a un valor de 10^{10} esporas g MS⁻¹ (Zhang et al., 2013).

En el estudio reciente de Lima-Pérez et al. (2019) se compara FmS y FES con un medio optimizado para el crecimiento de *Bt*. El sustrato inerte de la FES fue la espuma de poliuretano, creando una red que deja al sustrato completamente disponible para que las células consuman todos los nutrientes y obtengan la energía necesaria para la producción de células viables y esporas de *Bt*. El resultado fue que la FES proporcionó mayores rendimientos de biomasa y una diferenciación celular temprana entre células viables y esporas.

1.8.2. Recuperación de las toxinas

La recuperación de estas toxinas después del proceso de FES se considera el principal desafío para la formulación de *Bt* con efecto biopesticida. El procesamiento de la toxina es una parte integral de la industria de bioprocesos. Se compone de una secuencia de operaciones de separación y recuperación. Los costes de recuperación de los productos microbianos pueden variar desde un 15% a un 70% del coste total de fabricación según lo publicado por Atkinson y Mavituna (1991). Por lo tanto, es importante el desarrollo de métodos de procesamiento eficientes y económicos para la recuperación de productos microbianos (Behera y Varma, 2017).

El producto final del medio de fermentación de *Bt* contiene un complejo de toxinas (STC), que es una mezcla de cristales, esporas, restos de células y componentes del medio. Los métodos seguidos para procesar al biopesticida producido por FES son:

- Centrifugación con ácido o acetona (Rios et al, 1997).
- Floculación/sedimentación después de la adición de cloruro de calcio, cloruro férrico o sulfato de aluminio (Luna y Finkler, 2008).

- Ultrafiltración seguida de centrifugación continua y precipitación ácida (Prabakaran y Hoti, 2012).
- Ultrafiltración con una filtración al vacío posterior (Brar et al., 2006).

Muchos de los biopesticidas a partir de *Bt* se presentan en polvo para suspenderlos posteriormente en agua. En esta tesis se aplicaron métodos estudiados antes por Rahbanhi-Mounsef et al. (2015) para la separación de esporas y cristal como son extracciones con hexano o NaOH en un residuo heterogéneo como el digestato fermentado.

1.8.3. Coste de la producción de biopesticida a partir de *Bacillus thuringiensis*

Actualmente, existen más de 98 pesticidas bacterianos pulverizables formulados (424 millones de USD) (Lacey et al., 2001). El *Bt* ha sido considerado como el biopesticida más exitoso en el último siglo (Marrone, 2007).

Hoy en día, los aerosoles que utilizan cepas de *Bt* de origen natural, representan aproximadamente el 75% del mercado mundial de biopesticidas, que se estima en 8 mil millones de USD por año en 2005 (Sanchis, 2011). Además, de su producción y recuperación de la toxina, su aplicación (pulverización convencional o cultivos *Bt* modificados genéticamente) es fácil y barata (Bharadwaj, 2016).

Algunos estudios como los que se muestran en la Tabla 1.5 relacionan el coste para producir 1 kg de biopesticida a partir de *Bt* según el sustrato utilizado, observando que se reducen los costes de producción cuando se trabaja con residuos como la harina de patata en comparación con el medio comercial hasta un 94%.

Tabla 1.5. Coste de biopesticidas de *Bacillus thuringiensis* a partir de residuos.

Sustrato	Coste (US \$ kg ⁻¹)
Medio comercial (Wu et al., 2014)	1.25
Harina de patata (Wu et al., 2014)	0.075
Harina de soja (Smitha et al., 2013)	1.50
Salvado de trigo con melaza y levadura (Smitha et al., 2013)	0.70

Establecer los costes asociados a la producción de *Bt* mediante FES es complejo. Aunque se ha demostrado en estudios anteriores que se pueden reducir los costes usando residuos

industriales y agrícolas, incluso mejorando la efectividad de pesticidas más costosos (Escobar et al., 2004; Smitha et al., 2013; Wu et al., 2014).

1.8.4. Ensayos de biopesticida a partir de *Bacillus thuringiensis* a escala de laboratorio y de campo

Desde 1960, se han desarrollado diferentes ensayos biológicos a escala laboratorio y pruebas de campo para determinar el poder insecticida de las formulaciones de biopesticida a partir de *Bt* y su eficacia en plagas específicas de microbios seleccionados y en comparación con los productos comerciales de pesticidas químicos (Navon, 2000). Las plagas investigadas en los bioensayos generalmente fueron las de *Choristoreuna fumiferena*, *Spodoptera frugiperda*, *Aedes aegypti*, *Plutella xylostella*, *Heliothis zea*, *Achaea Janata*, *Bactrocera dorsalis* y *Culex pipiens* (Sanchis, 2011).

Los productos insecticidas basados en la bacteria *Bt* se han utilizado durante décadas para controlar las plagas de lepidópteros (orugas), dípteros (mosquitos y moscas negras) y coleópteros (larvas de escarabajos) (Sanchis, 2011). La aplicación en plagas de este biopesticida debe tener en cuenta la edad de las larvas (Markwick et al., 2001), el comportamiento de la alimentación de los insectos y el momento de la aplicación según la época del año y del día para que tenga un resultado efectivo (Carvalho, 2006).

Para los bioensayos, normalmente se sigue el método de incorporación a la dieta de Dulmage (1970) y Beegle (1986). La aplicación más extensa en la prueba de campo fue con el gusano pimpla (*Lepidoptera: Choristoreuna fumiferena*), uno de los principales responsables de la destrucción del bosque de coníferas. La mortalidad se expresó en relación con las larvas de gusano pimpla (SBU) inducidas por la preparación a base de *Bt* en comparación con la mortalidad por la preparación estándar Foray 48B (Abbott Labs, Chicago). El parámetro utilizado para analizar el efecto de mortalidad es la concentración letal al 50% (LC₅₀), parámetro que significa la concentración de producto que produce la muerte del 50% de los insectos evaluados.

Una de las plagas más destructiva de los cultivos de crucíferas en el mundo es la de *Plutella xylostella* (Guo et al., 2015), un lepidóptero contra el cual se aplica la cepa de *Btk*. Los bioensayos realizados en esta plaga por Zhuang et al. (2011) indicaron que la efectividad del biopesticida obtenido con la cepa de *Btk* producido a partir de lodo era más eficaz cuanto menor era el contenido de metales pesados. En la prueba de campo

realizada por Stemele (2017), la efectividad del biopesticida variaba según la temperatura, ya que en invierno, otoño y verano el nivel de *P. xylostella* fue de menor densidad que en primavera. En esa época del año es necesario aplicar el biopesticida cada quince días, pues si se realiza cada menor tiempo la plaga de *P. xylostella* sigue ocasionando daños en los cultivos como si no se aplicase el *Btk* en ellos (Stemele, 2017).

En el caso de la cepa de *Bti* la plaga más utilizada para los bioensayos ha sido el díptero *Culex pipiens* o mosquito común. Éste es la causa de muchas enfermedades, como la encefalitis japonesa, la meningitis y la urticaria (Foda et al. 2010). Los bioensayos realizados a partir de un biopesticida producido a través de FES con residuo de sustrato del cultivo de hongos dieron un porcentaje de mortalidad 1.2 veces mayor que el *Bti* comercial, y después de 15 días la concentración de dosis letal, LC_{50} , fue de 44.83% (Wu et al., 2014). También, El-Bendary et al., (2016) encontraron que con una FES a partir de residuos agroindustriales el valor de dosis letal contra *C. pipiens* puede llegar a ser del 41% con un biopesticida de *Bt* producido a partir de residuos agroindustriales.

Por último, otra de las aplicaciones del efecto biopesticida a partir de *Bt* es en los cultivos transgénicos, especialmente en la flor del algodón y del maíz. En estos se modifican las semillas introduciéndoles las δ -endotoxinas de *Bt* que producen las proteínas Cry dirigidas a Lepidopteros y Coleopteros. Aunque en la flor del algodón la plaga de *Heliothis zea* mostró resistencia a la δ -endotoxina de *Bt* (Fleming et al., 2018).

CAPÍTULO 2

Objetivos

Esta investigación ha sido realizada dentro del marco del proyecto europeo DECISIVE HORIZON2020, cuyo principal objetivo es la implantación de un sistema descentralizado de gestión de residuos mediante una microdigestión anaerobia. En este contexto, se plantea el uso del digestato obtenido para la producción de bioproductos mediante FES, entre los cuales están los biopesticidas. El estudio de este proceso constituye el objetivo de esta tesis. La principal barrera radica en que el digestato es un material con escasa materia orgánica fácilmente biodegradable. Un trabajo previo en la misma línea se realizó a partir de la fracción orgánica de los residuos urbanos obteniendo un material final con propiedades biopesticidas.

El principal objetivo de esta tesis es la producción de biopesticidas utilizando digestato de fracción orgánica de residuos sólidos municipales como sustrato para el crecimiento y esporulación de *Bacillus thuringiensis* mediante Fermentación en Estado Sólido. Como objetivo final, se buscarán estrategias de operación y de escalado del proceso (hasta un reactor de 100-L).

Como objetivos parciales para alcanzar el objetivo principal se han establecido los siguientes:

- Determinación de la idoneidad del digestato a escala de laboratorio para la obtención de bioproductos (biopesticidas y simultáneamente proteasas), a través de la Fermentación en Estado Sólido, tanto en condiciones estériles como no estériles.
- Optimización de la producción de biopesticida a partir de *Bacillus thuringiensis* en reactores de 10-L aislados térmicamente.
- Comparativa de reactores aislados y no aislados térmicamente para el estudio de estrategias de operación para la producción de biopesticidas.
- Escalado del proceso a reactor de 100-L.
- Evaluación de la producción de biopesticida a partir de dos cepas diferentes de *Bacillus thuringiensis*, variedad *kurstaky* para la aplicación contra lepidópteros y variedad *israelensis* activa contra dípteros.
- Estudio de la conservación del material final de la FES para su posterior uso como biopesticida. Se considerarán diferentes tiempos de conservación, tanto a temperatura ambiente como en cámara fría, así como sólido o un extracto líquido.

- Evaluación de la recuperación del producto por medio de la liofilización para una mejor conservación a largo plazo.
- Estudio del proceso de extracción final del biopesticida de la matriz sólida para su aplicación en el campo en forma de producto líquido.
- Aplicación de técnicas de purificación y cuantificación de la toxina del *Bacillus thuringiensis* para comparar su producción con un biopesticida comercial.

CAPÍTULO 3

Materiales y métodos

Resumen

En este capítulo se describen los sustratos utilizados y su acondicionamiento para los experimentos de Fermentación en Estado Sólido, las cepas utilizadas, los equipos, la metodología y los cálculos seguidos para la obtención de los resultados finales de esta investigación.

3.1. Materiales

3.1.1. Sustratos y acondicionamiento

El principal residuo utilizado a lo largo de esta tesis fue la fracción sólida de digestato procedente de la Planta de tratamiento de la FORM del *Consorti per a la Gestió de Residus del Vallès Oriental* (Granollers, España). Este material procede de un proceso de digestión anaeróbica húmeda seguida de una deshidratación, donde la fracción sólida es separada de la líquida. Esta fracción sólida es el material que será utilizado para los experimentos de Fermentación en Estado Sólido y será almacenado en cámara fría a 4°C durante un máximo de una semana hasta su uso para los experimentos de FES.

En los capítulos 7 y 8 de esta memoria se trabaja con una mezcla de digestato y FORM en relación 1:1 (p:p). Esta fracción orgánica es de elaboración propia a partir de los residuos vegetales de cocina que se producen en los hogares (tomate, lechuga, apio, manzana, escarola, kiwi, naranja, sandía, etc.). En este caso, el pretratamiento consiste en trocear estos residuos a un tamaño inferior a 0.5 cm para que la mezcla posterior con el digestato quede lo más homogénea posible.

Para preparar la mezcla de sustrato inicial, tanto el digestato como la FORM deben someterse a un proceso de higienización como se indica en el reglamento EU Regulation 142/2011. Este proceso consiste en mantener el residuo durante 1 hora en un horno previamente calentado a 70°C, como explica la normativa de la UE mencionada anteriormente. Después, el residuo se deja enfriar hasta temperatura ambiente.

Los estructurantes utilizados fueron Spontex®, palillos de madera y astillas de madera. El Spontex® solo fue utilizado en los experimentos de laboratorio correspondientes al Capítulo 4. Se trata de un material inerte que solo aporta porosidad al sustrato para una buena transferencia de oxígeno. En los capítulos posteriores a escala de laboratorio se

usaron palillos de madera y a escalas superiores astillas de madera, ambos se utilizaron en una relación de sustrato y agente estructurante de 1:1(v:v). Las astillas de madera fueron facilitadas por la empresa Palets Pla d’Urgell (Ivars d’Urgell, Lleida) bajo la marca ACALORA. Esta madera es reciclada, descartando el aglomerado y siendo principalmente madera de pino, pasada por una criba de G-30 y dando como resultado un tamaño de astilla de 3-4 cm. La función principal del estructurante es proporcionar el nivel adecuado de humedad y porosidad, ayudando a la correcta transferencia de oxígeno a través de la matriz sólida. En el proceso de FES, las astillas de madera no se biodegradan debido a la lenta biodegradabilidad de sus componentes y la corta duración de la FES. Las principales propiedades de la mezcla se enumeran en la Tabla 3.1. En las Figuras 3.1, 3.2 y 3.3 se muestran las imágenes de los sustratos, el agente estructurante y la mezcla para los procesos de FES.

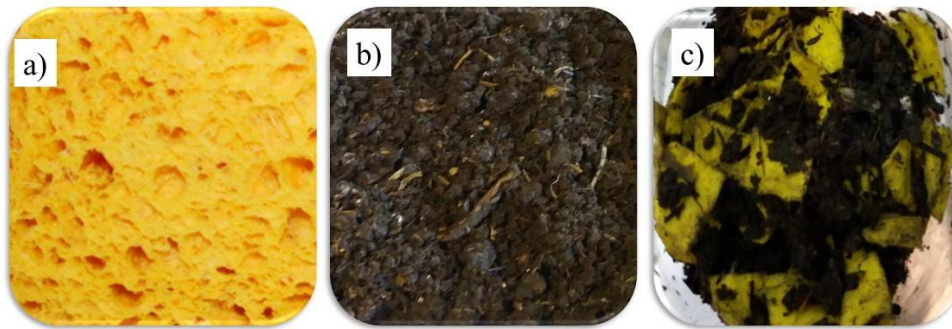


Figura 3.1. Digestato estructurado con Spontex. a) Spontex®, b) Digestato, c) Mezcla digestato y Spontex® para FES utilizada en el Capítulo 4.

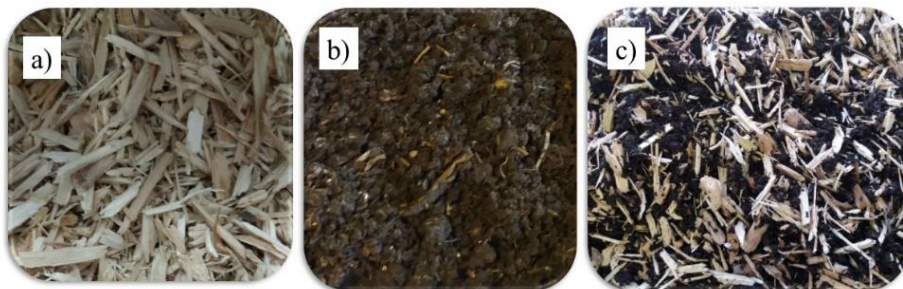


Figura 3.2. Digestato estructurado con astillas de madera. a) Astillas de madera, b) Digestato, c) Mezcla digestato y astillas de madera para FES.



Figura 3.3. Mezcla de digestato y FORM estructurada con astillas de madera. a) Astillas de madera, b) Digestato, c) FORM, d) Mezcla digestato, FORM y astillas de madera para FES. Utilizada en los capítulos 7 y 8.

Tabla 3.1. Características de los sustratos y agente estructurante utilizado en los procesos de fermentación. (Media±desviación estándar n=10^a)

Parámetro	Unidades	Digestato	Astillas de madera	Fracción orgánica
Humedad	(%, bh)	76±5	11.8	76±1.7
Materia orgánica	(%, bs)	63±2	95.3	84.5±0.5
Ph (1:5)	-	8.3±0.1	-	4.9±0.1
CE (1:5)	(mS cm ⁻¹)	2.84±0.1	-	1.5±0.1
Carbono	(%, bs)	34±2	1-5	-
Nitrógeno	(%, bs)	4.3±0.3	-	-
Hidrógeno	(%, bs)	2.8±0.2	0.1	-
Azufre	(%, bs)	0.3±0.1	-	-
C/N ratio	-	11.8±0.7	500	-
Hemicelulosa	(%, bs)	10.0±0.9	-	-
Celulosa	(%, bs)	10.4±1.2	-	-
Lignina	(%, bs)	17.5±1.9	-	-
IRD_{24h}	(g O ₂ kg ⁻¹ MS h ⁻¹)	1.5±0.3	-	-

^an: número de muestras analizadas
bh: base húmeda, bs: base seca, MS: materia seca.

Los detalles específicos de cada residuo utilizado en los procesos de FES se describen en cada uno de los capítulos.

3.1.2. Microorganismos

3.1.2.1. Cepa de *Bacillus thuringiensis*

Las cepas de *B. thuringiensis* var. *Kurstaky* NRRL HD-73 (CECT 4497) (*Btk*) y *B. thuringiensis* var. *Israelensis* NRRL H-14 (CECT 5904) (*Bti*) fueron adquiridas de la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT, Valencia, Spain). Una vez recibida, la cepa fue rehidratada de acuerdo con las instrucciones proporcionadas por CECT. Todos los materiales fueron esterilizados (autoclavado a 121°C durante 30 minutos). Las cepas fueron sembradas en placas de Petri con medio de agar, incubadas durante 48 horas a 30°C. Posteriormente, una colonia crecida en placa se pasa al criovial con glicerol, se homogeniza y posteriormente se elimina el líquido, dejando solo los crioviales que contienen 25 perlas impregnadas de *Bt*. A continuación, son almacenadas a -80°C durante un año como máximo. Para más información sobre el sistema de criopreservación de la cepa se puede consultar Simione (2009).

3.1.2.2. Preparación del inóculo: reactores de 0.5-L (escala laboratorio)

El inóculo utilizado para la FES se prepara siempre en una fermentación sumergida con nutriente Broth. Este inóculo fue preparado a partir de una crioperla y 100 mL de nutriente Broth (Oxoid, Powder 1%, Peptone 1%, NaCl 0.5%), medio específico de crecimiento para el *Bt*, previamente esterilizado a 121°C durante 30 minutos. Los matraces Erlenmeyer fueron incubados en un agitador con movimiento rotatorio de 180 rpm a 30°C durante 20 h. Las Figuras 3.4 y 3.5 muestran las cinéticas de crecimiento de *Btk* y *Bti*, alcanzando el final de la fase de crecimiento exponencial a las 20 horas. En ese momento, el caldo del nutriente Broth se centrifuga a 3500 rpm durante 10 minutos para concentrar el inóculo que será añadido al sustrato en los reactores de escala de laboratorio (0.5-L), momento en el que comienza la FES. La centrifugación es necesaria para no aumentar en exceso la humedad de la mezcla sólida de digestato más estructurante.

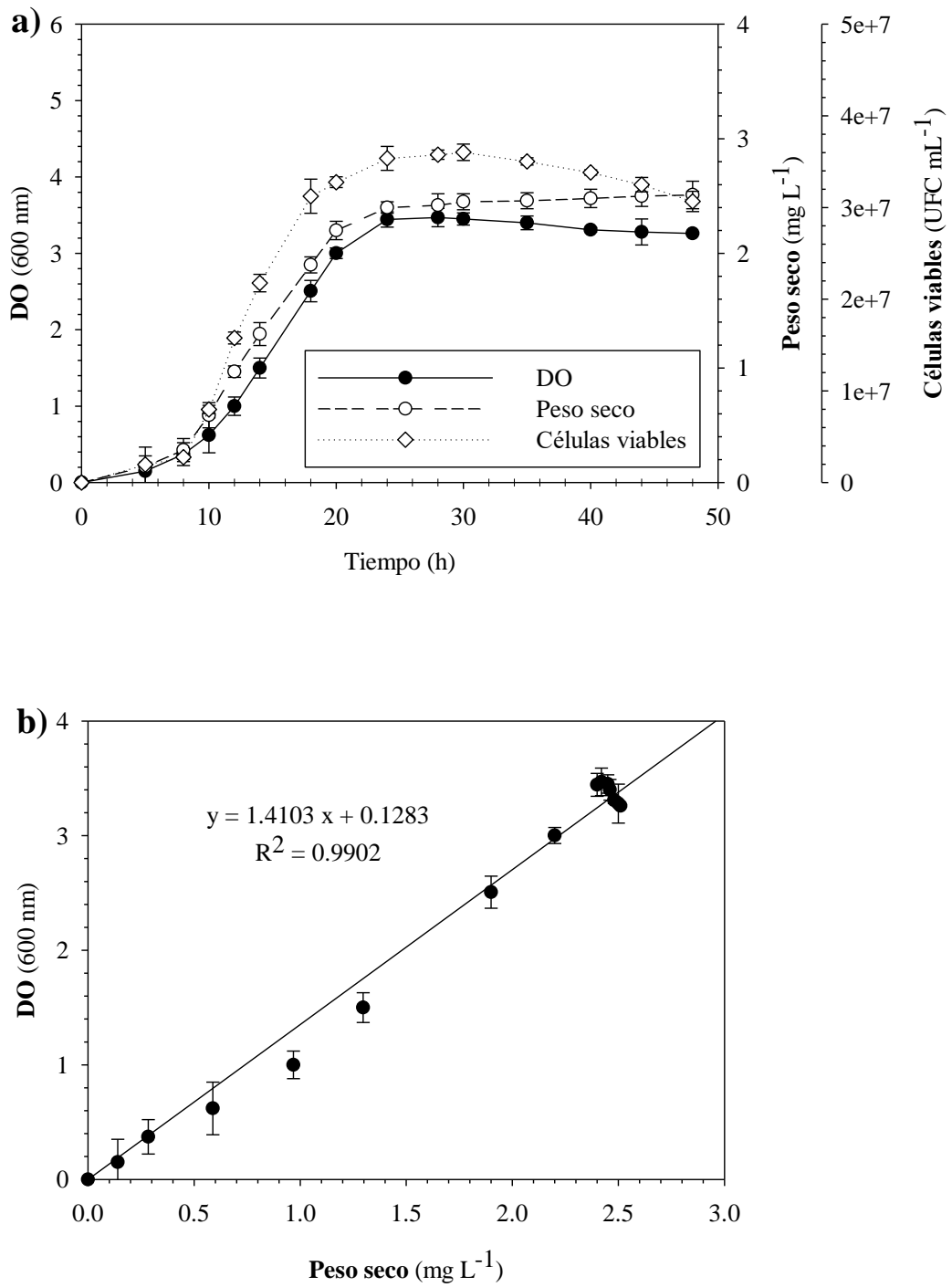


Figura 3.4. Cinética de crecimiento de *B. thuringiensis* variedad *Kurstaski* (*Btk*) en medio líquido. a) Curva de crecimiento durante 48 horas a 30°C, observando densidad óptica (DO) (600 nm), peso seco y células viables. b) Recta de calibrado densidad óptica y peso seco.

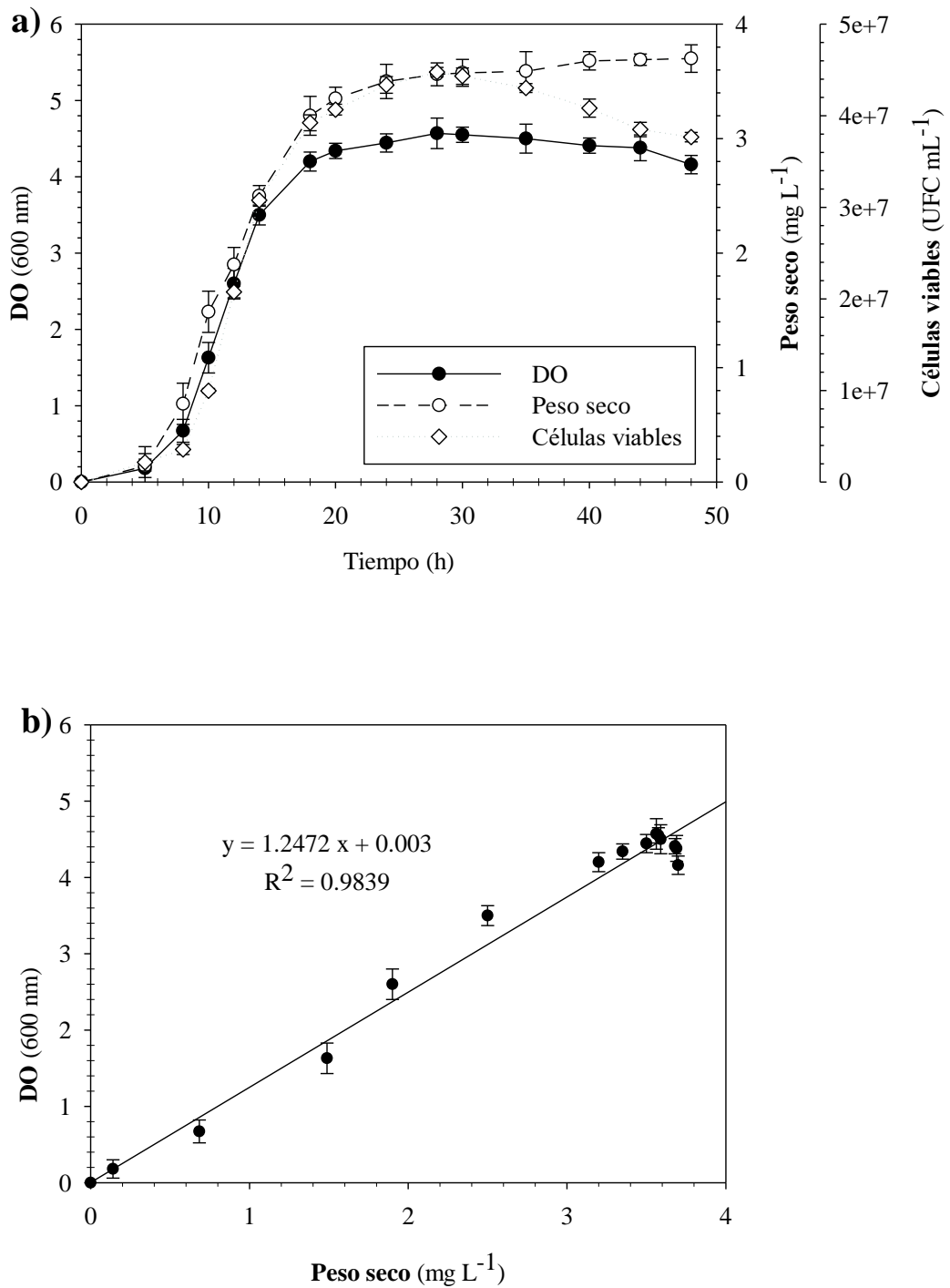


Figura 3.5. Cinética de crecimiento de *B. thuringiensis* variedad *israelensis* (*Bti*) en medio líquido.

a) Curva de crecimiento durante 48 horas a 30°C, observando densidad óptica (DO) (600 nm), peso seco y células viables. b) Recta de calibrado densidad óptica y peso seco.

3.1.2.3. Preparación del inóculo: reactores desde 4.5-L hasta 100-L

En las fermentaciones en las que se utilizan reactores de volumen desde 4.5-L hasta 100-L la cantidad de inóculo que se requiere es mayor, por tanto, los pasos a seguir para su obtención serán los que se explican a continuación. El primer paso consiste en incubar una crioperla de *Bt* en 100 mL de nutriente Broth durante 20 horas a 30°C. El segundo paso consiste en utilizar los 100 mL fermentados con *Bt* para inocular reactores de 2-L que contienen 1.1-L de nutriente Broth. Este paso se realiza en reactores de 2-L durante 20 horas a 30°C sin agitación mecánica con un caudal de aire de 20 mL min⁻¹ que provoca agitación suficiente al reactor. Por último, el caldo del nutriente Broth con el *Bt* crecido en él se centrifuga a 3500 rpm durante 10 minutos, obteniéndose un inóculo concentrado para ser aplicado al sustrato en los reactores correspondientes de cada sistema de FES.

En la Figura 3.6 se muestra el esquema aplicado para el crecimiento del inóculo de *Bt* de ambas cepas utilizadas para los reactores de 4.5-L hasta 100-L.

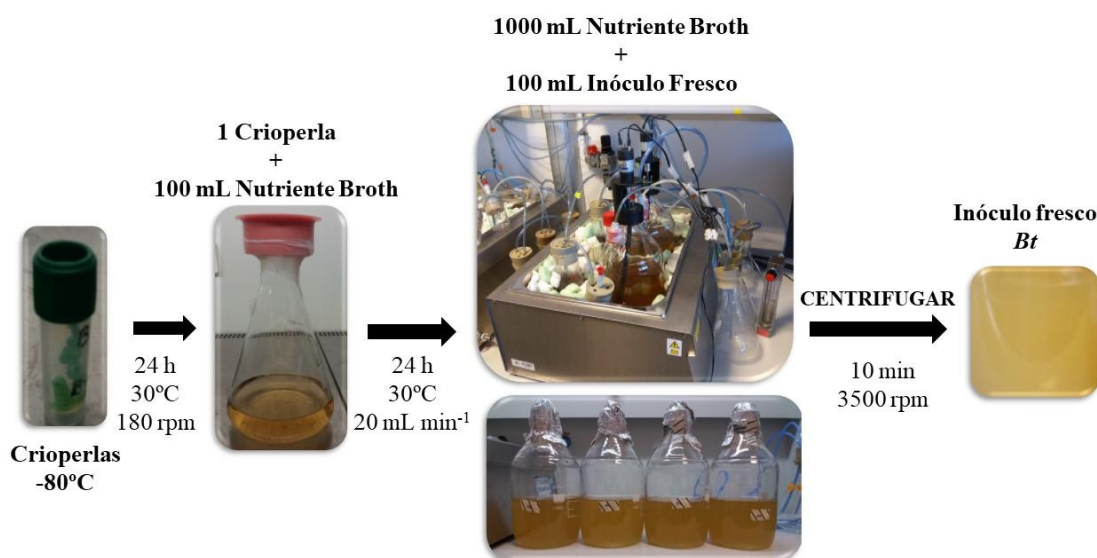


Figura 3.6. Esquema de crecimiento del inóculo *Bacillus thuringiensis*.

La cantidad de inóculo necesaria dependerá de la escala del sistema de fermentación a la que se trabaje, por tanto, el número de reactores utilizados de 2-L será diferente para cada una de ellas. La ratio utilizada es de 0.0030 g *Bt* g⁻¹ sustrato, es decir, masa de inóculo de *Bt* en peso seco en relación con la masa de sustrato en peso seco en el sistema de

fermentación utilizado. Esta relación se encuentra descrita al final de este apartado en la sección 3.1.2.5 y detallada en cada uno de los capítulos de resultados.

3.1.2.4 Evaluación del inóculo

Al final del crecimiento de *Bt* en medio líquido para la preparación del inóculo se realizan cuatro medidas de forma rutinaria para confirmar su crecimiento y viabilidad: observación en el microscopio óptico, densidad óptica, peso seco y conteo de células viables.

Microscopio óptico: la observación es importante para descartar contaminación por otro microorganismo. La Figura 3.7 muestra los inóculos de *Bt* crecidos en medio líquido Broth al final de la fermentación con un aumento de x100. Las concentraciones utilizadas fueron de 10^7 UFC mL⁻¹ en ambas cepas.

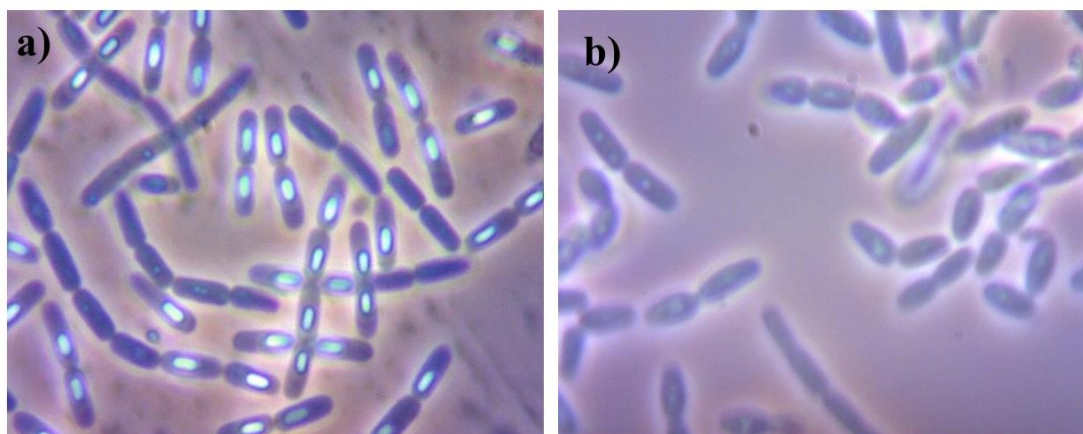


Figura 3.7. Imágenes del inóculo de *Bacillus thuringiensis* con microscopio óptico. a) *Btk*. b) *Bti*.

Densidad óptica (DO): da una estimación de la concentración de la biomasa en el medio de cultivo. Para cada fermentación realizada se utiliza un lote de inóculo diferente, pero la DO debe dar un valor similar en todas las fermentaciones para que los experimentos sean reproducibles. La DO fue medida en un espectrofotómetro (Cary 50 Bio, UV-Visible Spectrophotometer) a 600 nm. Para una correcta lectura de la absorbancia, las muestras de inóculo se deben diluir con agua hasta que la lectura esté entre 0.1-0.35 como describe la ley de Lambert-Beer. El blanco utilizado fue el medio de cultivo Broth. Así, la muestra

se ha diluido hasta x10 veces en el caso de *Btk* y x15 veces para el *Bti*. La DO del inóculo se calcula de acuerdo con la Ecuación 3.1.

$$DO = Abs_{600} \cdot N \quad (\text{Ecuación. 3.1})$$

Donde:

- DO: densidad óptica a 600 nm.
- Abs_{600} : absorbancia a 600 nm.
- N: número de diluciones.

Peso seco: del inóculo utilizado; se mide a partir de 10 mL de inóculo crecido en el medio comercial. Se utiliza un filtro de 0.2 μm (Whatman paper Grade 1) y un matraz kitasato para filtrar la muestra mediante vacío. Una vez filtrado, se seca durante 24 horas a 105°C y se pesa. El cálculo para determinar el peso seco del inóculo se realiza de acuerdo con la Ecuación 3.2.

$$PS_{in\acute{o}culo} (g L^{-1}) = (P_f - P_i) \cdot \frac{1000}{V} \quad (\text{Ecuación 3.2.})$$

Donde:

- $PS_{in\acute{o}culo}$: peso seco del inóculo ($g L^{-1}$).
- P_f : Peso final del filtro (mg).
- P_i : peso inicial del filtro con la muestra (mg).
- 1000: factor de conversión de mg a g.
- V: volumen de inóculo utilizado (mL).

3.1.2.5 Ratio de inóculo (Ri)

Una vez evaluados los parámetros de crecimiento de inóculo se calcula la cantidad de inóculo con respecto a la cantidad de sustrato utilizado en las fermentaciones para mantener siempre la misma ratio. Esta ratio es la cantidad de inóculo centrifugado utilizado en los sistemas de fermentación calculada a partir de la cantidad de gramos de *Bt* en peso seco crecido en medio líquido (Broth) entre los gramos de sustrato utilizado en la FES en peso seco de acuerdo con la Ecuación 3.3.

$$Ri = \frac{MS_{Bt} \cdot V \cdot NR}{MS_S \cdot PS} \quad (\text{Ecuación 3.3})$$

Donde:

- R_i , ratio de inóculo ($\text{g } Bt_{MS} \text{ g}^{-1} \text{ sustrato}_{MS}$).
- MS_{Bt} , peso seco del inóculo de *Bt* en líquido (g L^{-1}).
- V , volumen de medio líquido donde crece el *Bt* (L).
- N_R , número de reactores utilizados (Unidad).
- MS_S , peso seco del sustrato utilizado en la fermentación (g).
- Ps , peso total de sustrato en el reactor de la fermentación (g).

Esta ratio se corresponde con los parámetros del inóculo que se muestran en la Tabla 3.2 para cada una de las cepas de *Bt* utilizadas.

Tabla 3.2. Valores de los parámetros del inóculo de *Bt* crecido en medio líquido Broth.

Cepa de <i>Bt</i>	Densidad óptica (600 nm)	Peso seco (g L^{-1})	Células viables (UFC g^{-1} MS)
<i>Btk</i>	3.00±0.03	2.20±0.12	$(3.28±0.53) \cdot 10^7$
<i>Bti</i>	4.34±0.10	3.35±0.13	$(4.07±0.58) \cdot 10^7$

3.2. Sistemas de Fermentación

A lo largo de esta investigación se han utilizado cuatro sistemas diferentes de fermentación. El Sistema de Fermentación I corresponde a escala de laboratorio (0.5-L). A una escala superior se utilizaron dos tipos de sistemas: Sistema de Fermentación II correspondiente a reactores aislados térmicamente de 4.5-L y 10-L y Sistema de Fermentación III correspondiente a un reactor de 22-L no aislado y con agitación. Finalmente, el Sistema de Fermentación IV corresponde al escalado del proceso que se realizó en un reactor de 100-L no aislado y con agitación.

Todos los sistemas de fermentación disponen de una aireación continua con aire húmedo a partir de un caudalímetro másico (Bronkhorst, Spain) para cada uno de los reactores. El aire previamente humedecido entra al reactor por la parte inferior de éste y circula a través de la matriz sólida hasta la parte superior, donde los gases salen de él. Estos gases pasan por una trampa de agua para recoger todo el exceso de humedad y al final por un sensor de oxígeno (O2-A2, Alphasense, UK) para medir su contenido de oxígeno.

Los sistemas de fermentación II, III y IV están provistos de una sonda de temperatura para medir la temperatura de la matriz sólida.

Los datos de contenido de oxígeno y temperatura son recogidos y almacenados por un software permitiendo la monitorización en línea de todos los datos a través de un sistema basado en un Arduino®, tal y como se muestran en la Figura 3.8. Los datos recogidos son usados para el cálculo de la tasa del consumo de oxígeno (OUR) y el consumo acumulado de oxígeno (COC).

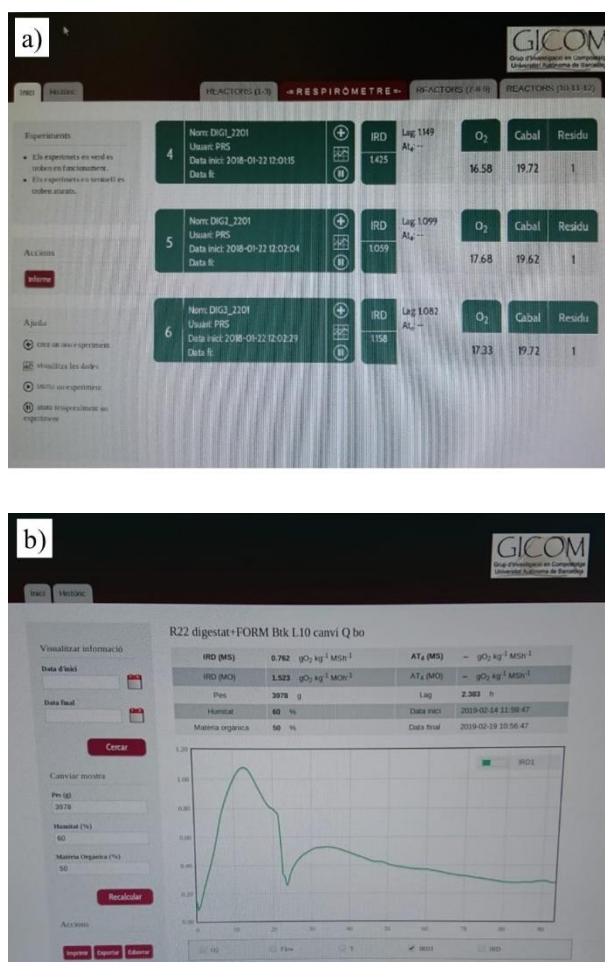


Figura 3.8. Captura de pantalla del software para el monitoreo en línea de diferentes parámetros operativos. a) Pantalla general del software. b) Detalle de los datos de un reactor con los parámetros de adquisición de datos de oxígeno, temperatura y caudal.

3.2.1. Sistema de Fermentación I: reactores de 0.5-L

El Sistema de Fermentación I fue diseñado y construido por Barrena et al. (2006) basado en la metodología de Adani et al. (2006). El sistema consiste en biorreactores de lecho compacto de polipropileno cilíndricos de 0.5-L donde el aire entra por la parte inferior, circulando a través de toda la matriz sólida hasta la salida de gases ubicada en la parte superior del reactor. Estos reactores están situados en un baño de agua permitiendo que el sistema funcione a una temperatura fija. En el caso de esta investigación la temperatura a la que se trabaja es 30°C, ya que las condiciones óptimas de crecimiento del *Bt* se dan a esa temperatura (Osborn et al., 2007). La Figura 3.9 muestra la configuración experimental de una línea del sistema de fermentación que incluye tres reactores idénticos y la Figura 3.10 las imágenes del montaje real en el laboratorio.

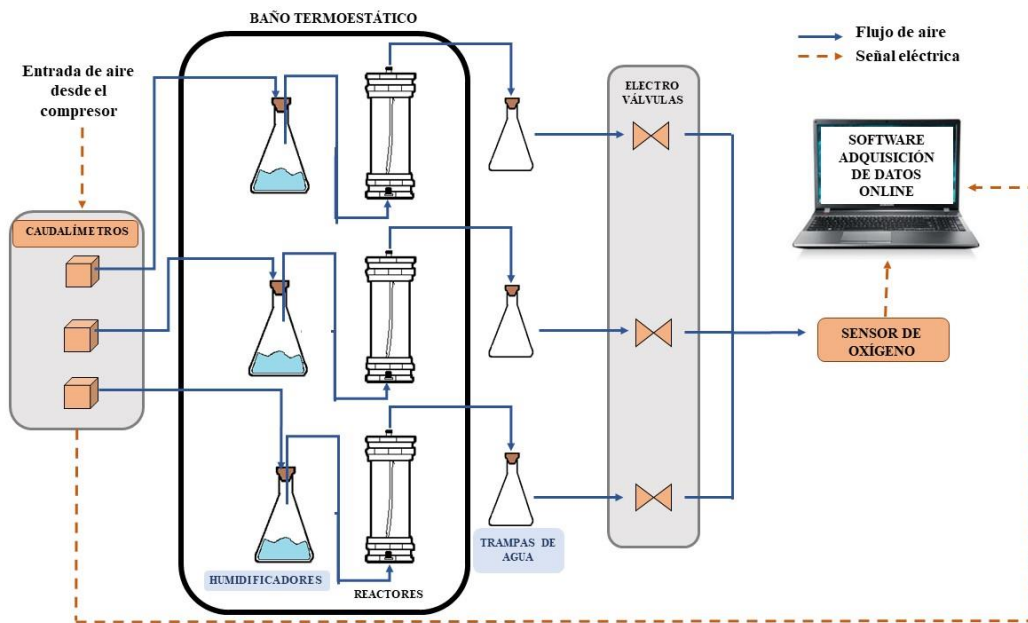


Figura 3.9. Esquema del montaje experimental del Sistema de Fermentación I.

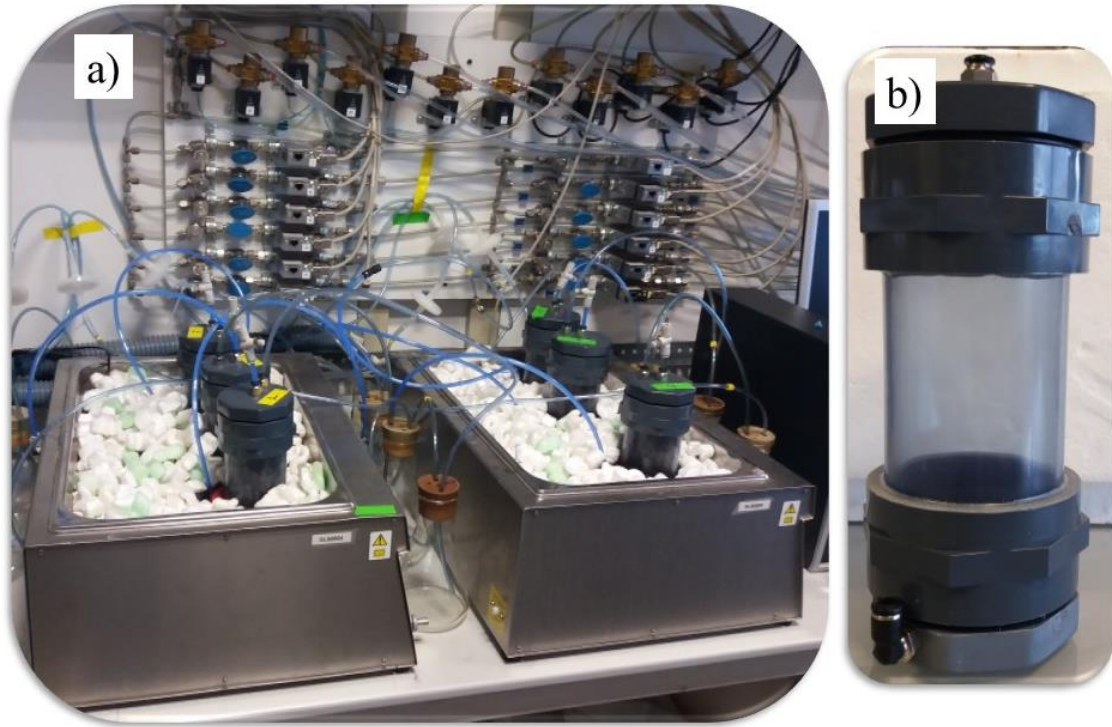


Figura 3.10. Imágenes del Sistema de Fermentación I. a) Sistema completo con baño termostático, reactores, trampas de agua y caudalímetros. b) Reactor de polipropileno cilíndrico.

Este sistema también ha sido utilizado para determinar la biodegradabilidad de los sustratos que se han utilizado a lo largo de esta investigación, mediante la obtención de los parámetros respirométricos IRD_{24h} y AT_4 . En este caso la temperatura del baño se encuentra fija a $37^{\circ}C$ de acuerdo con Adani et al. (2006). Estos parámetros se explican en el apartado 3.4.1.

3.2.2. Sistema de fermentación II: reactores aislados térmicamente de 4.5-10-L

Este Sistema de Fermentación está formado por reactores aislados térmicamente diseñados con vasos Dewar® como se describe en Abraham et al. (2013). Estos reactores tienen en la parte superior una tapa aislada para evitar las pérdidas de calor y la influencia de la temperatura ambiente, que se cierra de forma hermética. La tapa posee tres orificios, uno para la sonda de temperatura (Pt-100, Desin, España) y otros dos que son para las conexiones de entrada y salida de aire.

El aire que pasa a través del reactor se dispersa gracias a una malla que se coloca en la parte inferior de los reactores y actúa como soporte del material. Por lo que, en primer lugar, hay que colocar la malla y posteriormente se añade el material para que el aire de entrada se distribuya de abajo hacia arriba por toda la matriz sólida. La salida de aire de los reactores conecta con una trampa de agua para que los gases condensados no lleguen a los sensores de oxígeno. El contenido de oxígeno es medido usando sensores de oxígeno en un rango de (0-20.9%), mientras que el caudal de aire necesario tiene que ser suficiente para asegurar que el contenido de oxígeno en el reactor sea siempre superior al 5% evitando las condiciones anaerobias.

Así, los datos de temperatura, caudal de aire de entrada y concentración de oxígeno a la salida son recogidos y procesados por un sistema Arduino®, conectado a un ordenador. La Figura 3.11 muestra la configuración experimental del Sistema de Fermentación II y la Figura 3.12 las imágenes del montaje real de los reactores en el laboratorio.

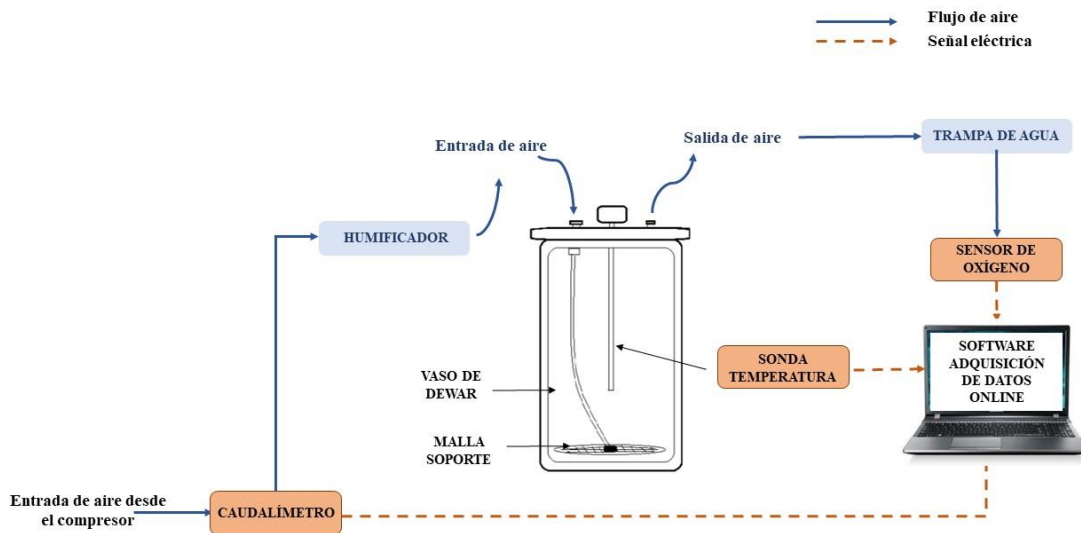


Figura 3.11. Montaje experimental del Sistema de Fermentación II.

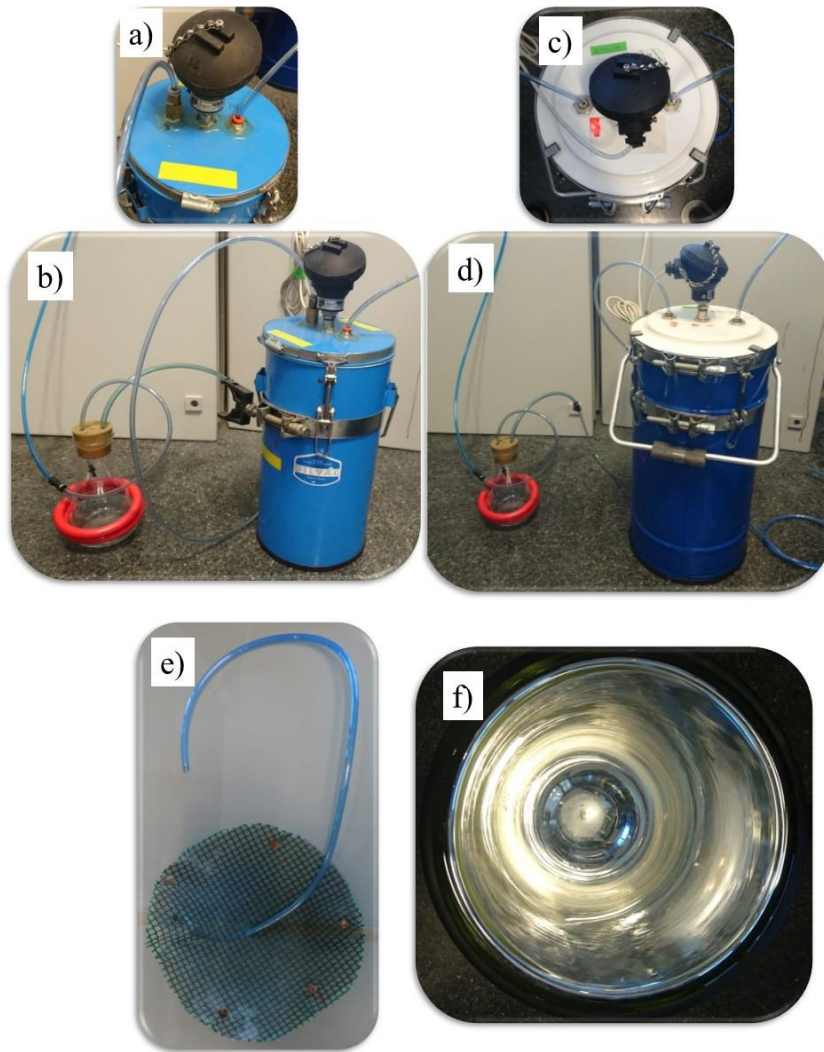


Figura 3.12. Imágenes del Sistema de Fermentación II. a) Tapa reactor de 4.5-L b) Montaje del sistema con el reactor de 4.5-L. c) Tapa reactor de 10-L. d) Montaje del sistema con el reactor de 10-L. e) Malla para distribuir el aire por la matriz sólida y tubo para la entrada de aire. f) Interior de los reactores, vaso Dewar.

3.2.3. Sistema de fermentación III: reactor no aislado térmicamente de 22-L

El Sistema de Fermentación III consiste en un biorreactor cilíndrico de acero inoxidable de un volumen total de 22-L (70 cm de altura y 30 cm de diámetro) (Martínez et al. 2018). El reactor tiene un sistema de agitación integrado con un eje helicoidal (40 cm de altura) que se acciona de forma automática y dispone de un variador de frecuencia para regular la velocidad, y una cesta interna extraíble donde se coloca el material. El caudal de aire es suministrado por la conexión que existe en la parte inferior del reactor y éste tiene una

salida en la parte superior, donde se sitúa la tapa, a la que posteriormente se conecta una trampa de agua para, finalmente, conectar con el sensor de oxígeno (Sensotran, España). La sonda de temperatura (Pt-100, Desin, España) se sitúa en la parte inferior del reactor, entre el espacio libre del eje helicoidal y la pared de la cesta. El sistema se utilizó a un 70% de su capacidad para poder realizar una buena homogeneización de la muestra, ya que en pruebas preliminares se observó que si se llenaba por completo, el material colapsaba con la tapa y no se mezclaba completamente. La cantidad de muestra utilizada fue de 4 kg con una agitación diaria a 14 rpm durante 5 minutos. Esta velocidad permite un mezclado completo sin compactar el material en la parte inferior. Los parámetros fueron monitorizados de la misma manera que en los sistemas descritos anteriormente. En la Figura 3.13 se describe la configuración experimental del sistema de fermentación y en la Figura 3.14 se presentan las imágenes del montaje real del reactor de 22-L.

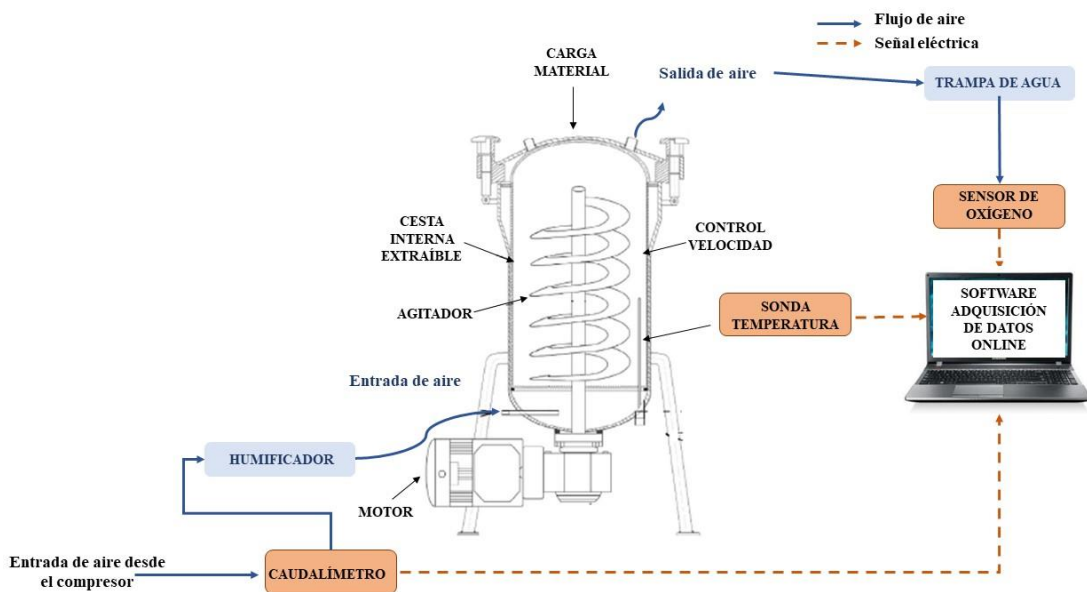


Figura 3.13. Montaje experimental del Sistema de Fermentación III.

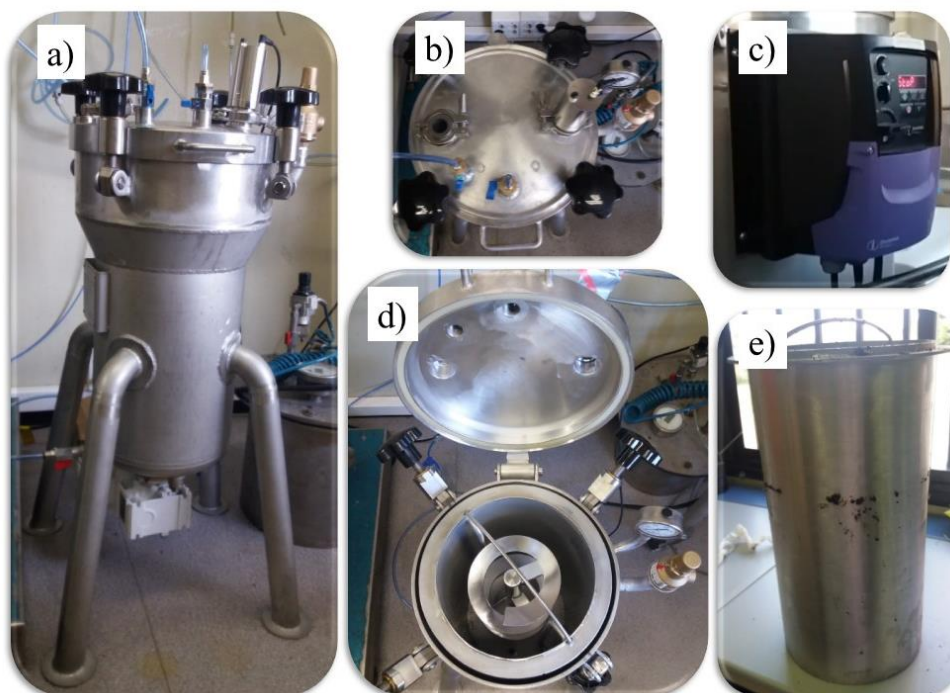


Figura 3.14. Imágenes del Sistema de Fermentación III. a) Reactor de 22-L b) Tapa reactor de 22-L. c) Variador de frecuencia d) Interior con el agitador helicoidal e) Cesta interior.

3.2.4. Sistema de fermentación IV: reactor no aislado térmicamente de 100-L

El Sistema de Fermentación IV es similar al III. Se trata de un biorreactor de acero inoxidable cilíndrico que consta de un eje helicoidal interno con un volumen de 100-L (80 cm de altura y 46 cm de diámetro). El agitador (80 cm de altura) está conectado a un rotor situado en la parte superior y la velocidad está controlada por un controlador de velocidad que se encuentra situado en el lateral del biorreactor. El reactor posee dos tapas, una inferior y otra superior. La tapa inferior consta de dos orificios, por uno de ellos se introduce el aire, y el otro sirve para eliminar los posibles lixiviados que se pudieran generar en el proceso. Esta tapa es abatible y se utiliza para el vaciado del biorreactor. La tapa superior consta de una tolva por donde se introduce el material de la fermentación, un orificio para la salida de aire, además de un sensor de temperatura (DS18B20 sensor, BricoGeek, España) y una linterna para observar la mezcla del interior del reactor. En un lateral del biorreactor se sitúa otra sonda de temperatura (Pt-100, Desin, España) que proporciona datos durante todo el proceso. Al igual que en los Sistemas de Fermentación II y III, la salida de gases está conectada a una trampa de agua y a un sensor de oxígeno

(Sensotran, España). Los parámetros de caudal, temperatura y cantidad de oxígeno consumido son monitorizados tal y como se describe en el apartado 3.2.2. En la Figura 3.15 se describe la configuración experimental del sistema de fermentación y la Figura 3.16 presenta las imágenes del montaje real del reactor de 100-L.

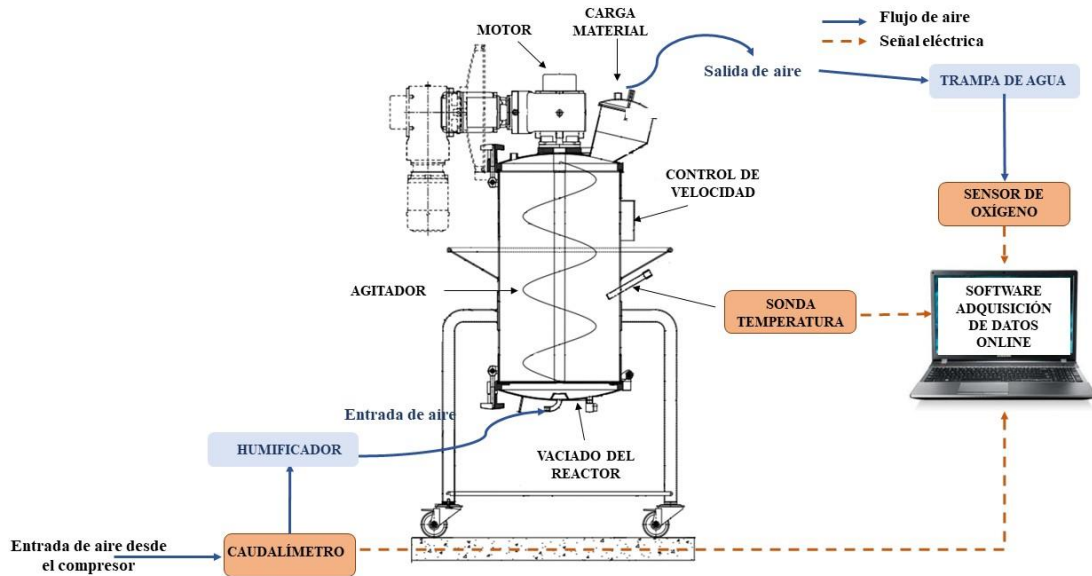


Figura 3.15. Montaje experimental del Sistema de Fermentación IV.

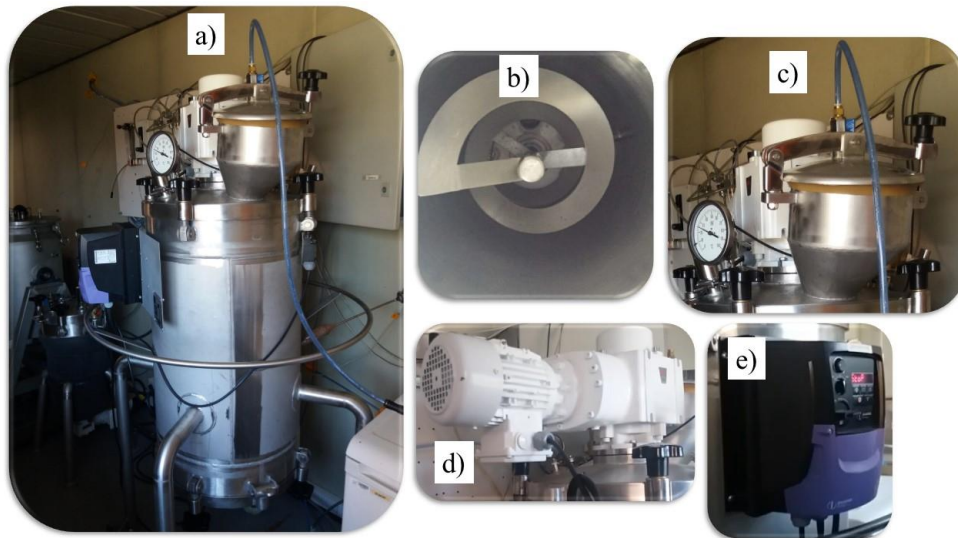


Figura 3.16. Imágenes del Sistema de Fermentación IV. a) Reactor de 100-L b) Agitador helicoidal c) Tolva para la carga de material. d) Motor del agitador e) Variador de frecuencia.

3.3. Parámetros de seguimiento de la actividad biológica del proceso

La velocidad de consumo de oxígeno (OUR) y el consumo acumulado de oxígeno (COC) han sido utilizados para medir la actividad biológica durante los procesos de FES (Ponsá et al., 2010a).

3.3.1. Velocidad de consumo de oxígeno

La velocidad de consumo de oxígeno (OUR: Oxygen Uptaken Rate) es un parámetro utilizado para medir la actividad biológica durante el proceso de FES. Las unidades son masa de oxígeno consumida por unidad de tiempo. Este parámetro se suele expresar de manera específica en todas las fermentaciones, refiriéndolo a la materia seca (MS) o a la masa de materia orgánica (MO) contenida en el reactor.

La velocidad específica de consumo de oxígeno (sOUR) en $\text{mg O}_2 \text{ g}^{-1} \text{ MS h}^{-1}$ se calcula a partir de la velocidad de consumo de oxígeno utilizando un balance de materia en el reactor en régimen estacionario y en condiciones normales, utilizando la Ecuación 3.4:

$$sOUR_{1h} = \frac{(O_{2,i} - O_{2,o}) \cdot F \cdot 31.98 \cdot 60 \cdot 1000^a}{1000^b \cdot 22.4 \cdot MS} \quad (\text{Ecuación 3.4})$$

Donde:

- $sOUR_{1h}$: velocidad específica de consumo de oxígeno a 1 hora ($\text{mg O}_2 \text{ g}^{-1} \text{ MS h}^{-1}$).
- $(O_{2,i} - O_{2,o})$: es la diferencia del contenido de oxígeno entre el aire que entra y sale del reactor en el mismo tiempo en fracción molar (mL L^{-1}).
- F : es el caudal volumétrico en condiciones normales (1 atm y 273 K) (mL min^{-1}).
- 31.98: peso molecular del oxígeno ($\text{g O}_2 \text{ mol}^{-1} \text{ O}_2$).
- 1000^a : factor de conversión (mg g^{-1}).
- 1000^b : factor de conversión (mL L^{-1}).
- 22.4: factor de conversión de mL a moles de aire medidos en condiciones normales (1 atm y 273 K).
- MS: contenido de materia seca del reactor (g).

3.3.2. Consumo de oxígeno acumulado

El consumo de oxígeno acumulado (COC) se calcula a través de la integración en continuo de la sOUR donde el tiempo se expresa en horas, de acuerdo con la Ecuación 3.5.

$$COC = \int_0^t sOUR \cdot dt \quad (\text{Ecuación 3.5})$$

Donde:

- COC: consumo acumulado de oxígeno (mg O₂ g⁻¹ MS).
- sOUR: velocidad específica de consumo de oxígeno (mg O₂ g⁻¹ MS h⁻¹).
- t: tiempo final de la Fermentación en Estado Sólido (h).

3.4. Métodos analíticos

3.4.1. Estabilidad/Biodegradabilidad de los sustratos

Se han utilizado dos parámetros para comprobar la estabilidad de los sustratos previa a su utilización en los procesos de FES (Ponsá et al., 2010). Estos son: el índice respirométrico dinámico durante las 24 h de máxima actividad (IRD_{24h}) y el consumo acumulado de oxígeno a los 4 días (AT₄) (Barrena et al., 2011).

Estos parámetros se determinaron utilizando el mismo montaje experimental que el Sistema de Fermentación I. La temperatura que se utilizó fue de 37°C para obtener unos valores estándares y comparables con otros materiales. Las determinaciones se realizaron por triplicado y se utilizaron 100 g de muestra estructurada con palillos de madera y una humedad de entre el 60-70% en peso. El caudal de aire que se utilizó fue de 20 mL min⁻¹, garantizando condiciones aerobias dentro del sistema, siempre por encima de un 10% de oxígeno (Mejías et al., 2017).

3.4.1.1. Índice Respirométrico Dinámico (IRD)

El IRD aporta información sobre lo rápido o lento que se degrada la materia orgánica biodegradable contenida en una muestra sólida (Barrena et al., 2014). Se determina a partir de valores puntuales de sOUR con temperatura constante y se calcula de la misma forma que éste, pudiendo ser expresado en g O₂ h⁻¹ kg⁻¹ MS o g O₂ h⁻¹ kg⁻¹ MO. Para

obtener valores comparables y estándares a otros materiales se establece una temperatura experimental de 37°C. Las opciones para expresar el índice respirométrico de un residuo son varias:

- IRD_{max} : Valor puntual máximo de sOUR.
- IRD_{1h} : Valores máximos de sOUR calculados como promedio de una hora en el periodo de máxima actividad.
- IRD_{24h} : Valores máximos de sOUR calculados como promedio de 24 horas en el período de máxima actividad.

Para evitar valores erróneos y discriminación de picos, el índice de biodegradabilidad de un material se suele expresar como IRD_{24h} .

3.4.1.2. Consumo de oxígeno acumulado a los 4 días

Se determina a partir de la velocidad de consumo de oxígeno y es considerado por algunos autores y normas legales como una medida de estabilidad, dando información sobre la cantidad de materia orgánica biodegradable que tiene la muestra (Barrena et al., 2011). Este consumo de oxígeno acumulado se determinó en todos los casos para un periodo de proceso de 4 días (AT_4), siguiendo las indicaciones del Federal Government of Germany (2001). El cálculo del consumo acumulado se realiza de acuerdo con la Ecuación 3.6, donde el tiempo se expresa en horas.

$$AT_4 = \int_t^{t+96} OUR_t \cdot dt \quad (\text{Ecuación 3.6})$$

Donde:

- AT_4 : consumo de oxígeno acumulado en cuatro días (después de la fase de latencia) ($\text{mg O}_2 \text{ g}^{-1} \text{ MS}$).
- t : tiempo correspondiente a la fase de latencia. Ésta termina cuando la tasa de consumo de oxígeno llega al 25% de la tasa máxima de consumo calculado como el promedio de tres horas.

3.4.2. Análisis rutinarios

Los parámetros rutinarios se determinaron de acuerdo con los procedimientos incluidos en el “Test Methods for the Examination of Composting and Compost” (The US Department of Agriculture and The US Composting Council, 2001). Los parámetros analizados fueron humedad, materia seca, materia orgánica, pH y conductividad. Todos

los resultados fueron calculados como una media de tres réplicas y presentados con la desviación estándar.

3.4.2.1. *Humedad y materia seca*

Para el cálculo de la humedad (H) y materia seca (MS) las muestras fueron secadas en un crisol a 105°C durante 24 horas, después de las cuales se pesó, calculando los valores con las Ecuaciones 3.7 y 3.8:

$$H (\%) = \frac{P_i - P_f}{P_i - P_o} \cdot 100 \quad (\text{Ecuación 3.7})$$

$$MS (\%) = 100 - H (\%) \quad (\text{Ecuación 3.8})$$

Donde:

- Pi: peso inicial de la muestra (g).
- Pf: peso final de la muestra seca (g).
- Po: peso del crisol (g).

3.4.2.2. *Materia orgánica*

El contenido en materia orgánica total (MO) fue analizado por ignición a 550°C de la muestra seca en presencia de exceso de aire durante 4 horas, calculada como se muestra en la Ecuación 3.9:

$$MO (\%) = \frac{P_i - P_a}{P_i - P_o} \cdot 100 \quad (\text{Ecuación 3.9})$$

Donde:

- Pi: peso inicial de la muestra seca (g).
- Pa: peso final de las cenizas (g).
- Po: peso del crisol (g).

3.4.2.3. *pH y conductividad eléctrica*

El pH y la conductividad eléctrica (CE) se determinaron a partir de una mezcla de muestra y agua destilada en una proporción de 1:5 (w:v). La mezcla se agitó durante 30 minutos a temperatura ambiente para permitir que las sales se solubilizaran en el agua destilada. Luego, se centrifugó la mezcla a 3500 rpm durante 10 min. El pH del sobrenadante fue medido con un pHímetro (Crison®, microPH2001) y la CE fue determinada usando un conductímetro eléctrico (Crison®, microCM2100).

3.4.3. Análisis elemental

El análisis elemental fue llevado a cabo por el Servei d'Anàlisi Química de la UAB. La determinación de C, N, H y S se realizó con el analyzer Flash 2000 (Thermo Scientific).

3.4.4. Análisis de metales

El análisis de metales también fue llevado a cabo por el Servei d'Anàlisi Química de la UAB. La determinación de P, K, Ca, Mg, Fe, Cd, Cu, Cr, Ni, Zn y Pb se realizó por espectrometría ICP-MS.

La determinación de Hg se realizó por descomposición térmica y espectrofotometría de absorción atómica.

3.4.5. Contenido en fibra

El contenido en fibras fue determinado en el laboratorio del Departamento de Ciencia Animal y de los Alimentos de la UAB por el método de Van Soest et al. (1991) con el equipo de ANKOM Fiber Analyzer. De acuerdo con este método, el contenido de celulosa es la diferencia entre la fibras neutro-detergentes (NDF) y las fibras ácido-detergentes (ADF). También, el contenido de hemicelulosa se corresponde con la diferencia entre ADF y el contenido de lignina (ADL).

3.5. Determinación de la actividad enzimática de proteasas

La determinación de la actividad enzimática de proteasas se realizó siguiendo el método descrito por Alef y Nannipieri (1972) con pequeñas modificaciones. Este método se basa en la liberación de los aminoácidos de la tirosina y otros péptidos de la caseína presente en la mayoría de las proteínas durante la incubación debido a la actividad de la proteasa presente. Se utiliza el reactivo Folin-Ciocalteu Phenol que reacciona uniéndose al doble enlace de las moléculas para producir un compuesto de color azul, que se cuantifica y se mide como valor de absorbancia en el espectrofotómetro. Para la medición se comparan los valores de absorbancia generados en la actividad enzimática de proteasas con la curva de calibrado que se realiza haciendo reaccionar cantidades conocidas de tirosina con el mismo reactivo.

Método de Extracción

Primero se debe realizar una extracción del sólido fermentado en una ratio de 1:5 (w:v) con 50 mM HCl-Tris ((hydroxymethyl) aminomethane) como buffer ajustándose el pH a 8.1 y agitándose durante 45 minutos. El extracto se centrifuga a 10000 rpm durante 10 minutos y 4°C, posteriormente se filtra con papel de filtro (Whatman paper Grade 1), descartando el pellet y utilizando el sobrenadante para la determinación de las proteasas.

Reactivos

- Tris buffer (50 mM, pH 8.1): 6.05 g Tris (hydroxyl methyl) aminometano se disuelven en 700 mL de agua Milli-Q, ajustando el pH a 8.1 con HCl, añadiendo 1000 mL de agua y se conserva a 4°C hasta su uso.
- Caseína (2%): 10 g de caseína se disuelven en 500 mL de agua milli-Q, mezclándose a 50°C. La solución se almacena a 4°C, hasta una semana máximo.
- Ácido tricloroacético (TCA, 15%): Se disuelven 75 g de ácido tricloroacético en 500 mL de agua destilada mezclándose por agitación continua.
- Reactante alcalino: Consta de tres soluciones (A, B y C) preparadas previamente y conservadas a temperatura ambiente.
 - Solución A: Se disuelven 50 g de Na_2CO_3 y 2.4 g de NaOH en 1000 mL de agua destilada.
 - Solución B: Se disuelven 0.5 g de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ en 100 mL de agua destilada.
 - Solución C: Se disuelve 1 g de $\text{C}_4\text{H}_4\text{KNaO}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ en 100 mL de agua destilada.
- Folin-Ciocalteu (25%): Se disuelve en una ratio 1:3 (v:v) Folin-Ciocalteu y agua destilada.
- Solución estándar de Tirosina ($500 \mu\text{g mL}^{-1}$): Se disuelven 500 mg de tirosina en 100 mL de Tris buffer.

Procedimiento

- Las muestras del extracto se preparan por triplicado en tubos de centrifuga de 50 mL a las que se les añade 1 mL de extracto, 4 mL de Tris buffer y 5 mL de caseína (2%).

- Se prepara el blanco de la enzima por triplicado en tubos de centrífuga de 50 mL a las que se les añade 1 mL de extracto y 4 mL de Tris buffer.
- Se prepara el blanco del método en un tubo de centrífuga de 50 mL a los que se añaden 5 mL de Tris buffer y 5 mL de caseína (2%).
- Se realiza una incubación con agitación a 50°C durante 2 horas a todos los tubos.
- Pasado ese tiempo, se añaden 5 mL de ácido tricloroacético (15%) a todas las muestras.
- Se añaden 5 mL de caseína (2%) a los triplicados de blanco de las enzimas y se agitan en un vórtex para una buena mezcla.
- Se centrifuga a 10000 rpm durante 10 minutos, se descarta el pellet.
- A 1 mL de sobrenadante, se añaden 1.5 mL de reactante alcalino. Este reactivo se prepara en ese mismo momento en relación 100:2:2 en volumen A:B:C. Se deja incubar 15 minutos a temperatura ambiente.
- Para finalizar se añade 1 mL de solución Folin-Ciocalteu (25%) y se deja incubar a oscuras 1 hora a temperatura ambiente. Pasado ese tiempo, se mide la absorbancia en un espectrofotómetro a 700 nm.

Recta de calibrado

La recta de calibrado se determina sustituyendo el sustrato por tirosina en volúmenes entre 0.25 y 2.5 mL y completando el volumen restante (5 mL) con Tris buffer (pH 8.1). Se añaden 5 mL de caseína (2%) y 5 mL de ácido tricloroacético (15%). Siguiendo el método de la actividad de proteasas se muestra la recta de calibrado en base a la concentración de L-Tirosina para la determinación de la actividad de la proteasa en la Figura 3.17.

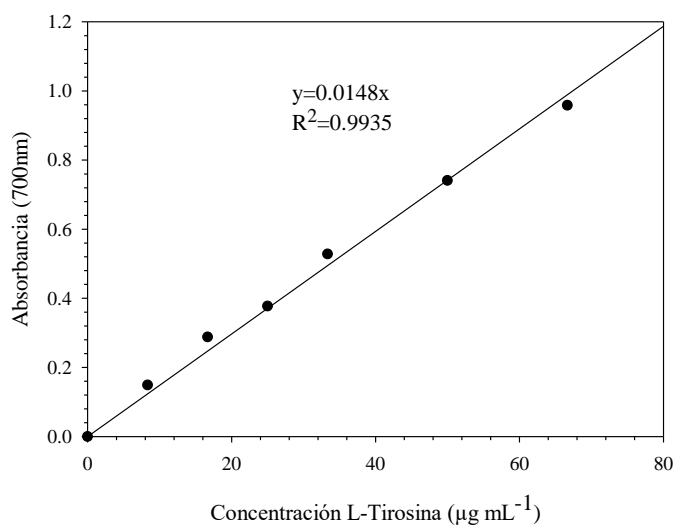


Figura 3.17. Recta de calibrado para la determinación de la Actividad de la proteasa en base a la concentración de L-Tirosina.

Cálculo de la actividad

A partir de la medida de la absorbancia, el cálculo de la actividad se realiza de acuerdo a la Ecuación 3.10.

$$Actividad\ PA\ (U\ g^{-1}\ MS) = \frac{Abs \cdot 15 \cdot V}{MS \cdot P_t} \quad (\text{Ecuación 3.10})$$

Donde:

- U: Una unidad de actividad alcalina de proteasas se expresa como 1 microgramo de Tirosina liberada bajo las condiciones del ensayo (2 horas a 50°C en un agitador orbital). Los resultados se expresan como la media de triplicados y el error calculado.
- Abs: absorbancia medida a 700 nm.
- 15: dilución de la cantidad de muestra analizada (1 mL).
- V: volumen de HCl-Tris añadido al sólido al realizar la extracción (L).
- MS: cantidad de materia seca contenida en la muestra sobre la que se realiza la extracción (g).
- Pt: valor de la pendiente de la recta de calibrado (mL µmol⁻¹ tirosina).

3.6. Métodos específicos para la caracterización del biopesticida

3.6.1. Método de muestreo

La cantidad de muestra necesaria para todos los análisis fue de 100 g. Cuando se trabajó a escala laboratorio (0.5-L) se sacrificó un reactor en cada muestreo, ya que se recomienda no vaciar el reactor más de un 25% para no cambiar las condiciones de la fermentación y el reactor contenía 115 g de material. En los reactores aislados y no aislados térmicamente (4.5-L, 10-L y 22-L), la muestra recolectada estaba compuesta por tres partes iguales tomadas de las partes inferior, media y superior del reactor. Se utilizó el mismo procedimiento en el reactor a escala piloto (100-L), pero se incluyeron dos puntos de muestreo adicionales para obtener el material cerca de las paredes del reactor. Estas muestras se utilizaron para análisis posteriores (células, esporas y parámetros rutinarios).

3.6.2. Estimación de colonias y esporas

La determinación de células viables y esporas de *Bt* se realizaron mediante técnicas de microbiología aplicadas anteriormente por Zhang et al. (2013) por conteo de colonias. Se utilizó el medio agar nutriente (28 g L⁻¹) como medio sólido que se colocó en placas Petri de 90 mm de diámetro.

Para determinar las colonias viables (CC), las muestras se diluyeron con Ringer®, solución salina de NaCl 0.85% (w:v) que contiene NaCl 0.225%, KCl 0.001%, CaCl₂ 0.012% y NaHCO₃ 0.005% bajo condiciones estériles. Las muestras fueron diluidas en un vaso estéril de 100 mL en una proporción de 1:10, es decir 10 g de muestra diluidos en 90 mL de solución salina (Ringer®). Se utilizó un incubador para agitar la muestra a 220 rpm durante 20 minutos.

A partir de los extractos obtenidos se realizaron diluciones seriadas con Ringer®. Se prepararon baterías de tubos de 15 mL de capacidad añadiendo 9 mL de Ringer® y colocando en el primero 1 mL de la muestra extraída, y en los siguientes 1 mL de la dilución anterior. Cuando se tiene la solución apropiada, se siembran 50 µL de ésta con un asa de Drigalsky estéril en placa Petri con nutriente agar y se incuba a 30°C durante 24 horas permitiendo el desarrollo de las colonias.

Para el conteo de esporas (SC), de la muestra diluida con la solución salina de NaCl 0.85% (w:v) se utilizan 20 mL que se someten a choque térmico de 80°C durante 10 minutos y

posteriormente a un enfriamiento con hielo durante 5 minutos. Se realiza el banco de diluciones de la misma manera que para las células viables, sembrando la dilución adecuada con 50 μL en una placa Petri con nutriente agar y se incuba a 30°C durante 24 horas permitiendo el desarrollo de las colonias. La combinación de estos métodos permite distinguir entre células viables y esporas de *Bt*.

Tanto las determinaciones de CC como las SC se realizaron por triplicado y los resultados se expresan en células viables formadoras de colonias por gramos de materia seca del sustrato (UFC g MS^{-1}) o en esporas formadoras de colonias por gramos de materia seca del sustrato (espora g MS^{-1}). Para un correcto conteo de colonias, el número de colonias en placa debe ser entre 30 y 300 colonias como describe Lachhab et al. (2001).

Para distinguir las colonias de *Bt* de otros microorganismos se utilizó la descripción de Realpe et al. (2002) sobre las morfologías de los diferentes bacillos. En el caso del *Bt* las colonias deben ser de 3 a 8 mm de diámetro con una apariencia de vidrio esmerilado y bordes regulares, que forman grupos en cadenas que se pueden observar macroscópicamente (Figura 3.18).

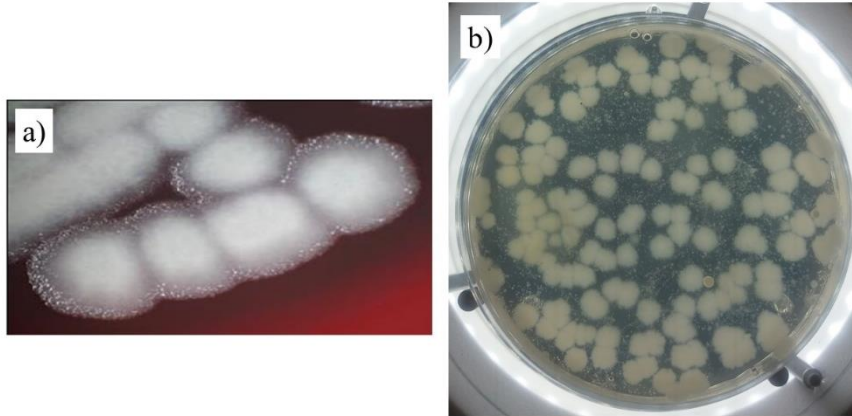


Figura 3.18. Apariencia de las colonias de *Bt* crecidas en placa Petri con el medio Agar. a) Imagen de Realpe 2002. b) Placa Petri de inóculo de *Bt*.

La Ecuación 3.11 muestra el cálculo de la concentración de UFC.

$$\text{UFCs} = N \cdot D \quad (\text{Ecuación 3.11})$$

Donde:

- UFCs, unidades formadoras de colonias (UFC mL^{-1}).
- N: número de colonias (Unidad).

- D: factor de dilución (mL^{-1}).

Si se representan por gramos de materia seca, el cálculo se realiza siguiendo la Ecuación 3.12:

$$UFCs = \frac{N}{DM} \cdot D \cdot E \quad (\text{Ecuación 3.12})$$

Donde:

- UFCs, unidades formadoras de colonias (UFC g MS^{-1}).
- N: número de colonias (Unidades).
- D: factor de dilución (mL^{-1}).
- E: ratio de extracción en la mayoría de los casos 10 g en 90 mL de solución salina (g mL^{-1}).
- MS: peso seco de la muestra (g).

3.6.3. Estimación de la toxina, con efecto biopesticida producida por *Bacillus thuringiensis*

La estimación de la proteína de la toxina se realiza de acuerdo con Rahbani-Mounsef et al. (2015). En primer lugar, se realiza una purificación de la toxina y posteriormente se usa el método de Lowry para la determinación de la concentración de la proteína.

Purificación de la toxina

El extracto de la muestra utilizado para determinar el valor de colonias en placa se sumerge en la sonda del sonicador (VIBRACELL) durante 1 minuto y posteriormente 30 segundos en hielo, durante 10 ciclos seguidos. Después se centrifuga a 13000 rpm durante 5 minutos. El sobrenadante se descarta, y el pellet es lavado dos veces con la solución de NaCl 0.14 M–0.01% Triton X-100, y cuatro veces con agua fría (4°C). El cristal proteico en el pellet se disuelve con 0.05 N NaOH durante 3 horas en agitación a 180 rpm. La suspensión es centrifugada a 13000 rpm durante 5 minutos, descartándose el pellet y utilizando el sobrenadante para medir la concentración de proteína, ya que es donde se queda el cristal proteico, el cual tiene la propiedad biopesticida (Bravo et al., 2011).

La concentración del cristal proteico en el sobrenadante se determina por el método de Lowry (Lowry, 1951) usando albúmina de suero bovino (BSA) como un estándar de proteína.

Reactivos

- Reactivo Lowry consta de tres soluciones (SolA+SolB+SolC) preparadas previamente y conservadas a temperatura ambiente en una proporción de 100:1:1 en base de volumen, respectivamente.
 - SolA: 2.86 g de NaOH y 14.31 g de Na₂CO₃ se disuelven en 500 mL de agua milli-Q.
 - SolB se prepara disolviendo 1.42 g de CuSO₄·5(H₂O) en 100 mL de agua milli-Q.
 - SolC fue preparada disolviendo 2.86 g en 100 mL de Na₂Tartate·2(H₂O) en 100 mL de agua milli-Q.
- El Folin Reagent se prepara en el mismo momento en el que se utiliza mezclando 5 mL de 2N Folin y reactivo de Fenol Ciocalteu con 6 mL de agua milli-Q.

Procedimiento

- Se mezclan 0.5 mL de muestra con 0.7 mL de la solución de Lowry.
- Se incubó durante 20 minutos a temperatura ambiente en condiciones oscuras.
- La muestra se mezcla inmediatamente añadiendo 0.1 mL del reactivo Folin y se mezcla con un agitador.
- La muestra se incuba durante 30 minutos a temperatura ambiente en condiciones oscuras otra vez. Después de la incubación, se utiliza un vórtex para homogeneizar la muestra y se mide la absorbancia con el espectrofotómetro.

El contenido de proteína se mide mediante la absorbancia a 750 nm con un espectrofotómetro de Varían Cary ® 50 UV-visible. La cantidad de proteína fue calculada como mg de toxina proteica por g de sustrato en el medio, tal y como se describe en la ecuación 3.13.

$$\text{Concentración de proteína (mg mL}^{-1}\text{)} = \frac{\text{Absorbancia (750 nm)}}{x} \quad (\text{Ecuación 3.13})$$

Donde:

- Concentración: cantidad de proteína total (mg mL⁻¹).
- Abs: Absorbancia medida a 750 nm.
- x: Pendiente de la recta de calibrado del método de Lowry.

Recta de calibrado

La recta de calibrado se determina diluyendo 2 mg mL⁻¹ BSA proteína estándar siguiendo el método de Lowry de proteína y sustituyendo el sustrato por BSA en valores entre 0 y 0.5 mL, y el resto con agua milli-Q. La recta de calibrado se muestra en la Figura 3.19.

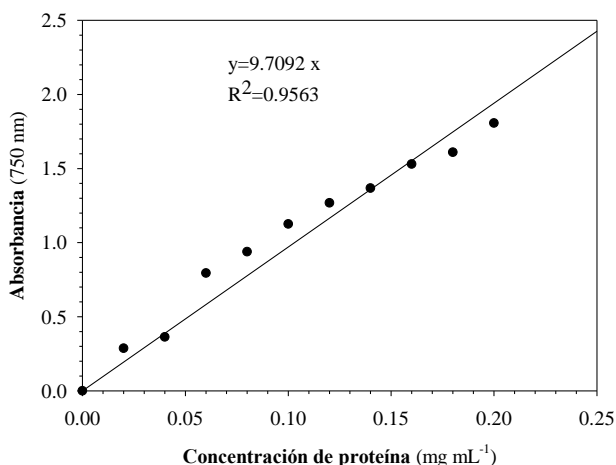


Figura 3.19. Recta de calibrado para el método de Lowry (determinación de proteína total).

3.6.4. Imágenes de microscopía electrónica de barrido (SEM)

Las imágenes de microscopía electrónica de barrido se analizaron en el Servei de Microscopia de la UAB usando un microscopio electrónico Zeiss EVO (Alemania) con aumentos hasta x10000. Las muestras se fijaron en un papel de filtro (Whatman® Nuclepore Track-Etched Membranes de 0.1 µm), se deshidrataron y secaron por el método descrito en trabajos anteriores de Smirnova et al. (2013).

Las imágenes de SEM se obtuvieron de muestras de inóculos crecidos y esporulados para observar el cristal proteico de cada cepa de *Bt*, también de las muestras finales fermentadas de ambos tipos de cepas, extraídas con Ringer® y con agua, y realizando el mismo protocolo al producto comercial de *Bt* Bactur®. La imagen del producto comercial se obtuvo para poder comparar la composición de *Bt* de un producto comercial conocido su potencial con efecto biopesticida y el biopesticida producido por FES.

3.6.5. Electroforesis

La electroforesis es una técnica que se utiliza para la separación de moléculas según la movilidad de éstas en un campo eléctrico. La separación se realiza sobre un soporte poroso conocido como gel de poliacrilamida en el cual se separan las proteínas debido al campo eléctrico que las atrae, estando en el rango de 10-250 kD. El detergente dodecilsulfato sódico (SDS) y el agente reductor (2-mercaptoetanol) desnaturalizan las proteínas, perdiendo su distribución tridimensional. Este fraccionamiento se debe a la diferencia de peso, longitud de la cadena y la forma de la proteína.

Este ensayo fue llevado a cabo de acuerdo con el protocolo descrito por Laemmli (1970) el cual se utiliza para separar las proteínas de acuerdo con el peso molecular de la cadena de polipéptidos. En esta tesis se ha utilizado para analizar los perfiles proteicos de las muestras conteniendo la endotoxina producida por el *Bt*. Los pasos a seguir están divididos en cuatro fases: preparación de la muestra, montaje de la electroforesis, tinción del gel y cuantificación e identificación de la proteína.

Preparación de las muestras

Para preparar las muestras, éstas pueden ser diluidas o no con agua destilada. Se prepara el tampón de carga con el agente reductor con el que las proteínas se desnaturalizan, 2-mercaptoetanol y 4x Laemmli sample buffer en relación 1:10 (v:v). En un tubo Eppendorf se añaden 3 partes de muestra y 1 parte de tampón de carga. Se somete a choque térmico (95-100°C) durante 5 minutos. Se centrifuga a 14 rpm durante 1 minuto. Se mantiene en hielo hasta cargar el gel.

Montaje de electroforesis

El montaje de electroforesis se muestra en la Figura 3.20, donde el gel de poliacrilamida 12% (w:v) mini-protean TGX (BIOrad®) se prepara en el interior de la cámara de electroforesis, agregando el running buffer compuesto de 10x Tris glycine SDS y agua destilada en relación 1:10 (v:v). Posteriormente, las muestras se cargan en el gel añadiendo 15 µL de la muestra en su carril correspondiente. Además, se colocará el marcador en una cantidad de 5 µL del patrón molecular (Precision Plus Protein Standards All blue), del cual se conoce la concentración de proteína. Se conecta la fuente de

alimentación 150 V y se deja correr el gel. Cuando el colorante esté en la parte inferior del gel se detiene la electroforesis y ya se puede proceder a su tinción.

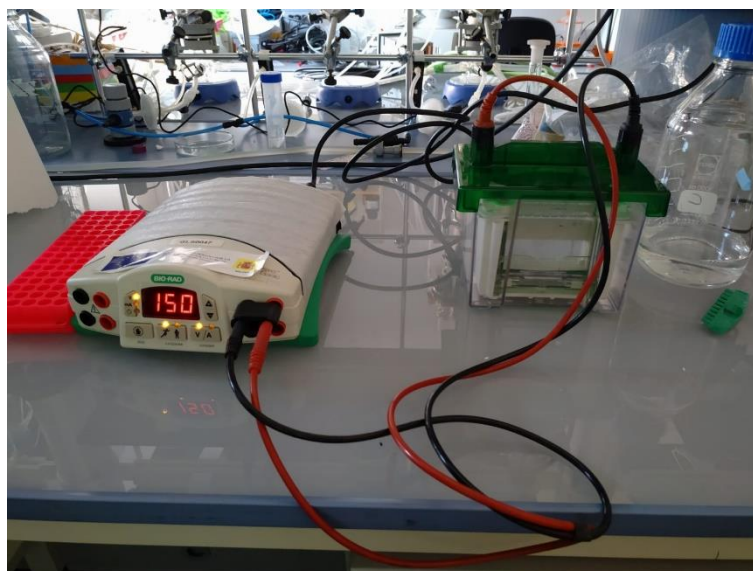


Figura 3.20. Equipo de electroforesis.

Tinción del gel

Para la tinción del gel de electroforesis se retiran las cubiertas del gel de electroforesis, se limpia el gel con agua destilada para eliminar el SDS utilizando una bandeja de tamaño similar al gel y cubriéndolo completamente durante 5 minutos. Este proceso se repite 3 veces. Posteriormente se retira el agua cuidadosamente, se añaden 50 mL de azul de Comassie por cada gel y se deja agitando durante 1 hora. Pasado ese tiempo se retira el azul de Comassie y se lava con agua destilada durante 30 minutos. Se revela el gel y se pasa a tratar los datos con el programa Image Lab de BioRad ®.

Identificación y cuantificación de la proteína

El programa Image Lab de BioRad ® (Figura 3.21) permite la cuantificación e identificación de la proteína en base al marcador utilizado (Precision Plus Protein Standards All blue), obteniéndose un informe general donde se detalla el peso molecular de la proteína y la concentración de ésta en las mismas unidades que el marcador, en este caso nanogramos para cada uno de los carriles.



Figura 3.21. Programa Image Lab de BioRad ®.

3.7. Extracción del biopesticida

Se determinaron diferentes ratios de extracción para la obtención del biopesticida con el objetivo de disminuir la cantidad de reactivo Ringer® necesario en esta operación y con ello, los costes asociados a los reactivos y a la cantidad a transportar del bioproducto producido por FES con las mismas propiedades biopesticidas que la extracción estándar (Ringer® 1:10).

Las extracciones se realizaron a partir de los materiales finales obtenidos en los experimentos del Capítulo 7, concretamente los reactores que contenían digestato y FORM de cada una de las cepas de *Bt*.

Las diferentes ratios de extracción utilizados fueron 1:1, 1:2, 1:5 y 1:10. Estas ratios se estudiaron con dos soluciones diferentes, Ringer® y agua destilada, con el objetivo de poder disminuir la cantidad de solución y sustituirla por un medio más económico y fácil de obtener como es el agua destilada.

Para determinar la mejor ratio de extracción, se evaluaron las células viables y esporas en cada uno de los tiempos de la fermentación y para cada uno de las ratios y agentes extractantes anteriormente mencionados. Estos valores se comparan con la extracción estándar de Ringer® 1:10, la que ha sido utilizada a lo largo de toda la tesis para el análisis

de células viables en muestras. Su cálculo se realiza de acuerdo con la Ecuación 3.14 para las células viables y Ecuación 3.15 para las esporas.

$$\text{Extracción } CC_{t=n} (\%) = \frac{CC_{\text{Ratio } i,x}}{CC_{\text{Estándar}}} \times 100 \quad \text{Ecuación 3.14}$$

Donde:

- Extracción CC: Porcentaje relativo al número de células viables de la extracción estándar (%).
- t=n: Diferentes tiempos de extracción, donde n= 0,24,48,72 y 96h (horas).
- CC_{ratio i,x}: Células viables, donde i=1:1, 1:2, 1:5 y 1:10 y x= Ringer®, o agua destilada (UFC g⁻¹MS).
- CC_{estándar}: Células viables con la extracción estándar de Ringer® 1:10 (UFC g⁻¹ MS).

$$\text{Extracción } SC_{t=n} (\%) = \frac{SC_{\text{Ratio } i,x}}{SC_{\text{Estándar}}} \times 100 \quad \text{Ecuación 3.15}$$

Donde:

- Extracción SC: Porcentaje relativo al número de esporas de la extracción estándar (%).
- t=n: Diferentes tiempos de extracción, donde n= 0, 24, 48, 72 y 96 h (horas).
- SC_{ratio i,x}: Células viables, donde i=1:1, 1:2, 1:5 y 1:10 y x= Ringer® o agua destilada (espora g⁻¹ MS).
- SC_{estándar}: Células viables con la extracción estándar de Ringer® 1:10 (espora g⁻¹ MS).

Se estableció que la extracción en condiciones estándar representaba un 100% de la cantidad de células viables y esporas que podían extraerse. Si el valor fuese superior al 100% se mejoraría la extracción y si éste fuese inferior, la forma de extracción óptima sería en las condiciones estándar, tanto para las células viables como las esporas.

3.8. Técnicas de procesamiento de la toxina de *Bacillus thuringiensis*

Se utilizaron diferentes técnicas de post-procesado para mejorar el efecto biopesticida o facilitar el transporte y manipulación del producto como son la disrupción, purificación y liofilización de la muestra. Los resultados de estos análisis se explican en el capítulo 8 de esta tesis.

3.8.1. Disrupción

La disrupción o ruptura de estructura celular (lisis) mediante ultrasonidos se utiliza para la extracción de compuestos intracelulares o para la inactivación microbiana. Bajo una sonicación intensa, las proteínas son liberadas de las células como resultado de la ruptura celular (Corts et al., 2019). Esta técnica es utilizada para liberar el cristal proteico de las células viables y aumentar el efecto biopesticida del producto obtenido en la FES.

El equipo utilizado fue un ultrasonido VIBRACELL (Figura 3.22) con una sonda de 2 mm y una potencia de 100 W. El proceso consiste en sumergir la sonda en un volumen de 90 mL de muestra durante 1 minuto y dejarlo enfriar 30 segundos posteriormente, repitiéndolo 10 veces.

Cuando se utilizan muestras de menor volumen, es decir, con tubos Eppendorf de 2 mL, se sumerge ese volumen de muestra durante 30 segundos y se deja enfriar 30 segundos posteriormente, repitiéndolo 5 veces.

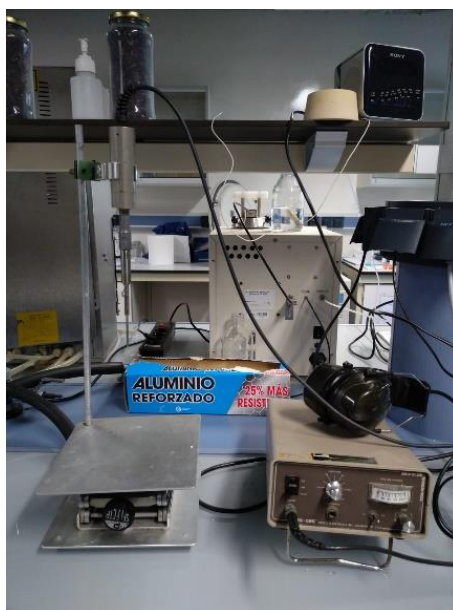


Figura 3.22. Equipo de ultrasonidos VIBRACELL.

3.8.2. Purificación de la muestra

La purificación de la muestra se realiza como se ha indicado en el apartado 3.6.3 a través del método propuesto por Rahbani-Mounsef et al. (2015) para calcular la proteína total que contiene el biopesticida producido.

Los pasos para seguir son los explicados en el apartado 3.6.3 de purificación de la toxina sin realizar el método de Lowry.

3.8.3. Liofilización

La liofilización consiste en deshidratar un material para poder almacenarlo y transportarlo con mayor facilidad sin perder las propiedades de la muestra. Antes de la liofilización el material se congela a -80°C durante 24 horas. En este caso se congeló con acetona y hielo seco formando una película fina de hielo que cubre toda la superficie del recipiente de vidrio que va acoplado al equipo liofilizador.

El equipo de liofilización utilizado fue un liofilizador VirTis Sentry 5l conectado a una bomba de vacío Edwards RV5 A653_01_093 (Figura 3.23). Con las muestras congeladas y acopladas al equipo se reduce la presión circundante para permitir que el agua congelada en el material se sublime. Para acelerar el proceso se utilizan ciclos de congelación-sublimación con los que se consigue eliminar prácticamente la totalidad del agua libre contenida en el producto original, pero preservando la estructura molecular de la sustancia liofilizada. El proceso dura aproximadamente 24 horas hasta que el material se encuentra en estado sólido y convertido en polvo. Este polvo se homogeniza utilizando una varilla de cristal en el mismo recipiente en el que se ha guardado la muestra para minimizar las pérdidas. El extracto se conserva en cámara fría a una temperatura de 4°C hasta su uso.

Para determinar el efecto de la liofilización sobre el biopesticida la muestra liofilizada se disuelve en agua milli-Q conociendo los gramos por mililitro utilizados antes de la liofilización para restablecer la muestra a su volumen inicial. Una vez realizada la resuspensión se determinan la cantidad de células viables y esporas de la muestra liofilizada, calculando el porcentaje de rendimiento de recuperación después de la liofilización.



Figura 3.23. Equipo de liofilización.

El cálculo del rendimiento de recuperación de la cantidad de células viables y esporas tras la liofilización se realizó mediante la Ecuación 3.16.

$$\% \text{ Recuperación} = \frac{\text{Células viables o esporas del extracto liofilizado}}{\text{Células viables o esporas iniciales}} \times 100 \text{ (Ecuación 3.16)}$$

CAPÍTULO 4

Obtención de bioproductos a partir de digestato

Parte de este capítulo está publicado en Cerda, A., Mejias, L., Rodríguez, P., Rodríguez, A., Artola, A., Font, X., Gea, T., Sánchez, A. 2019. Valorisation of digestate from biowaste through solid-state fermentation to obtain value added bioproducts: A first approach. *Bioresource Technology*. 271, 409–416

4.1. Introducción

Este capítulo está dividido en dos bloques diferentes. Uno trata la idoneidad del digestato para obtener bioproductos usando digestato sólido a través de la FES, y el siguiente, el uso de digestato líquido como inóculo para la FES o bien como sustrato en FmS para obtener biopesticidas.

En el primer bloque el objetivo principal es evaluar el potencial del digestato para la obtención de determinados bioproductos de valor añadido a través de FES. Esta primera parte proporcionará información para la selección del bioproducto más adecuado a obtener a partir del digestato para ser, posteriormente, optimizado y escalado. Se utilizará el digestato como materia prima sin ningún tratamiento previo. Los bioproductos seleccionados fueron biopesticidas derivados de *Bt*, y celulasas y soforolípidos investigados por parte de Laura Mejías y Alejandra Rodríguez en sus respectivos trabajos de tesis, obtenidos a partir de otros microorganismos. Además, se sabe que el *Bt* produce enzimas en su fase de esporulación, por lo que se investiga la producción de proteasas a partir del *Bt*, debido a que las proteasas producidas en la fase de esporulación pueden aumentar la virulencia de la toxina proteica y por tanto, el efecto biopesticida (Brar et al., 2007). Estos experimentos se realizan tanto en condiciones de sustrato estéril como no estéril, teniendo en cuenta que, cuando se trabaja en condiciones no estériles de sustrato, éste está sometido a un pretratamiento de higienización como se explicó en el apartado 3.1.1. “Sustratos y acondicionamiento” del Capítulo 3. En este caso, se podrían obtener dos bioproductos de forma conjunta, proteasas y esporas de *Bt*.

El segundo bloque tiene un doble objetivo. Por un lado, conocido el alto coste de los medios sintéticos para producir *Bt*, se estudia utilizar la fracción líquida de digestato como caldo nutritivo para el crecimiento del inóculo para posteriormente utilizarlo en la FES y así, sustituir el medio sintético. El otro objetivo es utilizar esta fracción líquida de digestato como sustrato para obtener directamente un biopesticida a partir de *Bt* por medio de FmS. Es decir, en el primer caso la fracción líquida se podría utilizar en una FES posterior y en el segundo se compara una FmS con una FES de digestato. En este bloque se utilizarán diferentes condiciones de trabajo para obtener la más adecuada, caracterizando el digestato líquido y su efecto en la producción de biopesticidas.

4.2. Metodología

4.2.1. Microorganismos

En este capítulo todos los experimentos para la obtención del biopesticida han sido realizados con la cepa *Btk*.

4.2.2. Fracción sólida del digestato: producción de proteasas

Las características de la fracción sólida del digestato se muestran en la Tabla 3.1 del Capítulo 3 Materiales y métodos. Las fermentaciones se realizaron utilizando digestato higienizado como sustrato y Spontex® como agente estructurante en una proporción de 95:5 (p:p). Las fermentaciones se llevaron a cabo por triplicado en reactores de 0.5-L con un peso total de 120 g de material en cada reactor. Los procesos se realizaron a 37°C utilizando un flujo de aire de 20 mL min⁻¹ durante 96 h.

El muestreo para medir la actividad enzimática de proteasas se realizó a las 0, 24 y 48 h de la fermentación con 3 g de muestra del contenido de cada reactor. Durante el proceso, la actividad biológica medida como sOUR, fue continuamente monitoreada además de las mediciones de los análisis rutinarios, materia seca, contenido de humedad, pH y conductividad eléctrica (CE).

4.2.3. Fracción sólida del digestato: producción de biopesticidas y proteasas con inóculo de *Bacillus thuringiensis*

Las fermentaciones se llevaron a cabo en reactores de 0.5-L utilizando una mezcla de digestato como sustrato y Spontex® como agente estructurante en una proporción del 95:5 (p:p). El peso total en cada reactor fue de 120 g de mezcla por fermentación incluyendo el inóculo de *Bt*. Debido a la naturaleza del sustrato se realizaron dos grupos de experimentos de sustrato: uno usando digestato estéril y otro sin esterilización, pero sometándolo a un tratamiento de higienización. El inóculo de *Btk* se agregó con una concentración de 10⁷ UFC mL⁻¹ en una proporción del 10% (p:p) en base húmeda a la matriz sólida. Estas fermentaciones se realizaron por triplicado a una temperatura fija del baño de 30°C utilizando un flujo de aire constante de 20 mL min⁻¹ durante 96 h. El muestreo para determinar las células viables y esporas de *Bt* se realizó con 3 g de cada reactor a las 0, 24, 48, 72 y 96 h del tiempo de fermentación.

El estudio de la producción de proteasas a partir de digestato, inoculado con *Btk*, se realizó del mismo experimento que la producción de biopesticidas y su control sin inocular *Btk* en el digestato. El análisis de actividad de proteasas se realizó en los mismos momentos con 3 g de cada reactor a las 0, 24, 48, 72 y 96 h del tiempo de fermentación.

4.2.4. Fracción líquida del digestato: producción de biopesticidas

El digestato líquido procedía de la Planta de tratamiento de FORM del *Consorti per a la Gestió de Residus del Vallès Oriental* (Granollers, España) después de una separación por centrifugación del digestato. Las características del digestato líquido se obtuvieron de tres muestras diferentes. El análisis elemental y de metales fue llevado a cabo por el Servei d'Anàlisi Química de la UAB. Sus características se muestran en la Tabla 4.1.

Tabla 4.1. Caracterización del digestato líquido. (Media±desviación estándar, n=3^a)

Parámetro	Unidades	Valor
Humedad	(%, bh)	97.6±0.6
Materia orgánica	(%, bs)	35±6.4
pH (1:5)	-	10.8±0.3
CE	(mS cm ⁻¹)	7.9±0.1
Carbono	(%,bs)	0.29±0.02
Nitrogeno	(%,bs)	0.23±0.01
Hidrógeno	(%,bs)	9.48±0.37
Azufre	(%,bs)	<1
C/N ratio	-	1.26
P	(μg L ⁻¹)	24±2.8
S	(μg L ⁻¹)	35±6.4
K	(μg L ⁻¹)	1339±0.5
Cr	(μg L ⁻¹)	25±15
Ni	(μg L ⁻¹)	35±8.8
Cu	(μg L ⁻¹)	41±9.5
Zn	(μg L ⁻¹)	<100
Cd	(μg L ⁻¹)	<2
Pb	(μg L ⁻¹)	<20
Hg	(μg L ⁻¹)	<5

^an: número de muestras analizadas
bh: base húmeda, bs: base seca.

Se realizaron dos experimentos diferentes con digestato líquido. En el primero, se utilizó el digestato líquido como sustituto de nutriente Broth para hacer crecer el inóculo a escala

de laboratorio a partir de las crioperlas de *Btk* y posteriormente utilizarlo en una FES. En el segundo, se utilizó el digestato líquido para realizar una FmS a partir de inóculo crecido con nutriente Broth en los matraces Erlenmeyer de 0.5-L. En el primero se evita tener que utilizar caldo de cultivo comercial y en el segundo se puede comparar si es mejor una FmS o una FES para la producción de biopesticidas a partir de *Btk*.

Ambas fermentaciones se realizaron en condiciones distintas para encontrar la mejor opción para la producción de *Btk* a partir de digestato líquido a escala de laboratorio. Las diferentes condiciones que se probaron fueron las siguientes: un control con nutriente Broth esterilizado (CB), digestato líquido suplementado con nutriente Broth ajustando el pH (DLBp) y sin ajustar el pH (DLB), digestato líquido esterilizado ajustando el pH (DLEp) y sin ajustar el pH (DLE) y digestato líquido higienizado ajustando el pH (DLHp) y sin ajustar el pH (DLH) (Figura 4.1). El ajuste de pH fue debido a que la fracción líquida de digestato tenía un pH de 10.8 y no encontrándose en el rango recomendado para el crecimiento de *Btk*.

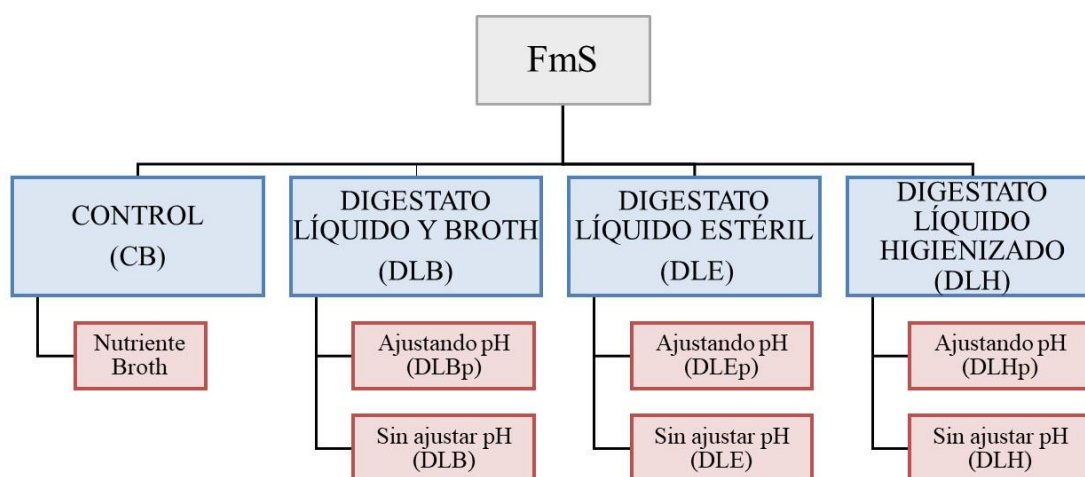


Figura 4.1. Esquema de las diferentes pruebas planteadas seguidas para la obtención de biopesticida a partir de digestato líquido.

Las fermentaciones para producir el inóculo de *Btk* para FES en digestato líquido se realizaron en matraces Erlenmeyer de 0.5-L a partir de una crioperla y 100 mL de

digestato líquido. Se colocaron en un agitador orbital a 180 rpm a una temperatura de 30°C durante 48 horas de la misma manera que se realiza el crecimiento del inóculo en caldo comercial, dejando un tiempo de adaptación al medio. En las muestras con ajuste de pH se utilizó HCl hasta llegar a un valor de pH de 7, el que presenta el nutriente Broth. El muestreo para determinar las células viables y las esporas se realizó al final del proceso, además de realizar los análisis rutinarios de materia seca, contenido de humedad, pH y CE.

Para la FmS a partir de digestato líquido se utilizaron matraces Erlenmeyer de 0.5-L conteniendo cada uno fracción líquida de digestato con un inóculo líquido del 10%, es decir, 10 mL de nutriente Broth y 90 mL de digestato líquido. El inóculo utilizado tenía una densidad óptica de 3.83 ± 0.13 y células viables de $2.40 \pm 0.34 (10^7)$ UFC mL⁻¹, sin esporas. La fermentación se realizó en un agitador orbital a 180 rpm y temperatura de 30°C durante 4 días para que el *Btk* llegase a esporular y así desprendiese también el cristal tóxico. Se realizaron mediciones de densidad óptica, peso seco, pH, CE, células viables y esporas al final del proceso. El pH y la CE se midieron al comienzo y al final de la fermentación.

4.2.5. Análisis estadístico

Todos los datos experimentales han sido analizados utilizando comparaciones por pares basados en la prueba de Tukey ($p < 0.05$). Se realizaron estadísticas con MINITAB™ V17. Si algún valor experimental superó un 95% de confianza, se marcó con un asterisco en las figuras.

4.3. Resultados y discusión

4.3.1. Fracción sólida del digestato: producción de proteasas

Los resultados de la caracterización del digestato (Tabla 3.1, Capítulo 3) mostraron que éste contiene cantidades significativas de proteína ($16.9 \pm 0.5\%$) y material lignocelulósico ($17.5 \pm 1.9\%$), por lo tanto, se planteó la hipótesis que el digestato podría tener potencial como fuente para la producción de proteasas y enzimas lignocelulósicas.

El resultado del experimento para la producción de proteasas mediante FES de digestato sin inóculo adicional se presenta en la Figura 4.2. En la actividad biológica inicial de las

fermentaciones se observó que el digestato presentaba un contenido considerable de materia orgánica aeróbicamente biodegradable (Barrena et al., 2006). El máximo de sOUR se encontró a las 26 h de fermentación con un valor de $1.9 \pm 0.3 \text{ mg O}_2 \text{ g}^{-1} \text{ MS h}^{-1}$. Después de ese pico, la actividad biológica comienza a disminuir, hasta llegar a un valor final en la fermentación cercano a $1.2 \pm 0.4 \text{ mg O}_2 \text{ g}^{-1} \text{ MS h}^{-1}$. Este es un comportamiento típico de los residuos orgánicos de baja biodegradabilidad no llegando nunca a un valor cercano a cero.

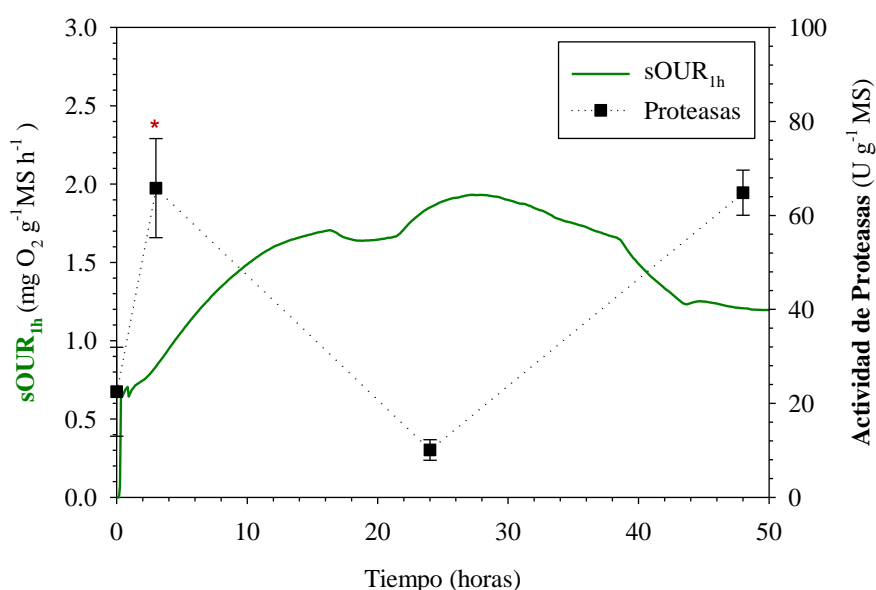


Figura 4.2. Perfiles operacionales de FES realizados por triplicado utilizando digestato como sustrato en un reactor de 0.5 L para la producción de enzimas hidrolíticas. Se presentan la producción de proteasa y los perfiles sOUR (hasta <10%). Los puntos experimentales con un asterisco indican una desviación alta ($p > 0.05$).

La Figura 4.2. también muestra los perfiles de producción de proteasas. Se observaron dos picos discretos, uno al principio y otro al final de la fermentación. Ambos picos alcanzaron una producción de proteasas de casi $65 \text{ U g}^{-1} \text{ MS}$. Como las proteasas son producidas por microorganismos anaerobios los valores son bajos debido a que las condiciones que se producen en la FES son aeróbicas.

Novelli et al. (2016) observaron muchos picos de actividad de proteasa al usar varias cepas de hongos como inóculo mixto, parecido a los dos picos que se producen en la

fermentación con digestato. Estos autores atribuyeron este perfil a las adaptaciones en el funcionamiento molecular y fisiología del microbioma presente en la mezcla de sustratos, como ocurre con el digestato.

Los valores obtenidos de la producción de proteasas se encuentran en el rango inferior de los reportados en la literatura utilizando diferentes sustratos. Abraham et al. (2013) usó la misma configuración FES para la producción de proteasas usando fibra de soja, cáscara de café y residuos de pelo de vacuno con valores de 310.33 ± 9.17 , 89.01 ± 0.59 y 141.75 ± 17.6 U g⁻¹ MS, respectivamente.

Es probable que el pH observado durante la fermentación (8.7-9) promueva la producción de proteasa según lo publicado por varios autores (Abraham et al., 2013; El-Bakry et al., 2015; Soares et al., 2005). Además, la capacidad hidrolítica de las proteasas también se ve reforzada por las condiciones alcalinas. La liberación de proteasa al medio sólido en condiciones hidrolíticas adecuadas podría haber inducido la hidrólisis de otros componentes enzimáticos, tales como las celulasas producidas en el mismo proceso.

Resumiendo, en este primer cribado, el digestato no se encontró adecuado como sustrato para la producción de proteasa utilizando solo microorganismos autóctonos. Se debe realizar una optimización adicional para aumentar los rendimientos de producción. Una de las dificultades de usar el digestato como sustrato es el bajo contenido en materia fácilmente biodegradable. Por lo tanto, una alternativa para impulsar la actividad microbiana puede ser el uso de un co-sustrato biodegradable, tal como la fracción orgánica de residuos sólidos municipales.

Otra alternativa interesante a evaluar es el desarrollo de diferentes estrategias operativas, como operar mediante un proceso de lotes secuenciales, configuración que permite la adaptación del microbioma autóctono según lo publicado por Cerda et al. (2017a). Otro enfoque sería trabajar con cepas específicas para producir, por ejemplo, proteasas según lo reportado por El-Bakry et al. (2015). Una de las cepas conocida que produce proteasas y que se puede desarrollar en el digestato es el *Bt*, así en el siguiente apartado se evaluará la producción de proteasas a partir de *Btk*.

4.3.2. Fracción sólida del digestato: producción de biopesticidas a partir de *Bacillus thuringiensis*

Se muestran los resultados de la FES usando digestato como sustrato bajo condiciones estériles (Figura 4.3) y bajo condiciones de higienización (Figura 4.4) para la producción de biopesticida usando *Btk*. Los resultados mostrados en estas figuras corresponden a la media de tres réplicas independientes. Además de los reactores con inoculación de *Bt* se realizó siempre un control con digestato en las mismas condiciones, pero sin inocular.

En la Figura 4.3, las fermentaciones con digestato estéril muestran la máxima sOUR alrededor de las 9 horas de operación con un valor de $0.80 \pm 0.08 \text{ mg O}_2 \text{ g}^{-1} \text{ MS h}^{-1}$ y decrece hasta el final del proceso. Si se compara con el control (digestato no inoculado con *Btk*) el valor de sOUR máxima se produce a las 40 horas del proceso con un valor de $0.62 \text{ mg O}_2 \text{ g}^{-1} \text{ MS h}^{-1}$, 0.7 veces menos que si se inocula con *Btk*. La fermentación donde se ha inoculado *Btk* implica una rápida evolución del proceso, generando dos picos de incremento en la sOUR al principio de la fermentación. Las diferencias entre los triplicados fueron mínimas (s.d < 5%), lo que indica que el proceso es reproducible como se ha presentado por otros autores en procesos similares (Abraham et al., 2017; Cerda et al., 2017b).

La Figura 4.3 también muestra el conteo de células viables y esporas durante la fermentación. Las células viables en todos los replicados muestran un incremento inicial en las primeras 48 horas hasta valores de $8.49 \pm 2.12 (10^8) \text{ UFC g}^{-1} \text{ MS}$. Después de este periodo, las células viables decrecen hasta valores de $9.09 \pm 0.81 (10^7) \text{ UFC g}^{-1} \text{ MS}$. Estos resultados son muy positivos, porque reflejan la capacidad del *Btk* no solo de sobrevivir en la matriz sólida del digestato, sino también de prosperar y lograr un incremento de 3 veces el conteo de células viables inicial. Es probable que la disminución en el recuento de células viables esté relacionada con cambios en la matriz sólida, altamente atribuido a un agotamiento del sustrato, lo que lleva a las bacterias a crear su forma resistente, es decir, esporas, y en este proceso de esporulación la célula libera al medio el cristal proteico que tiene efecto biopesticida (Bravo et al., 2011).

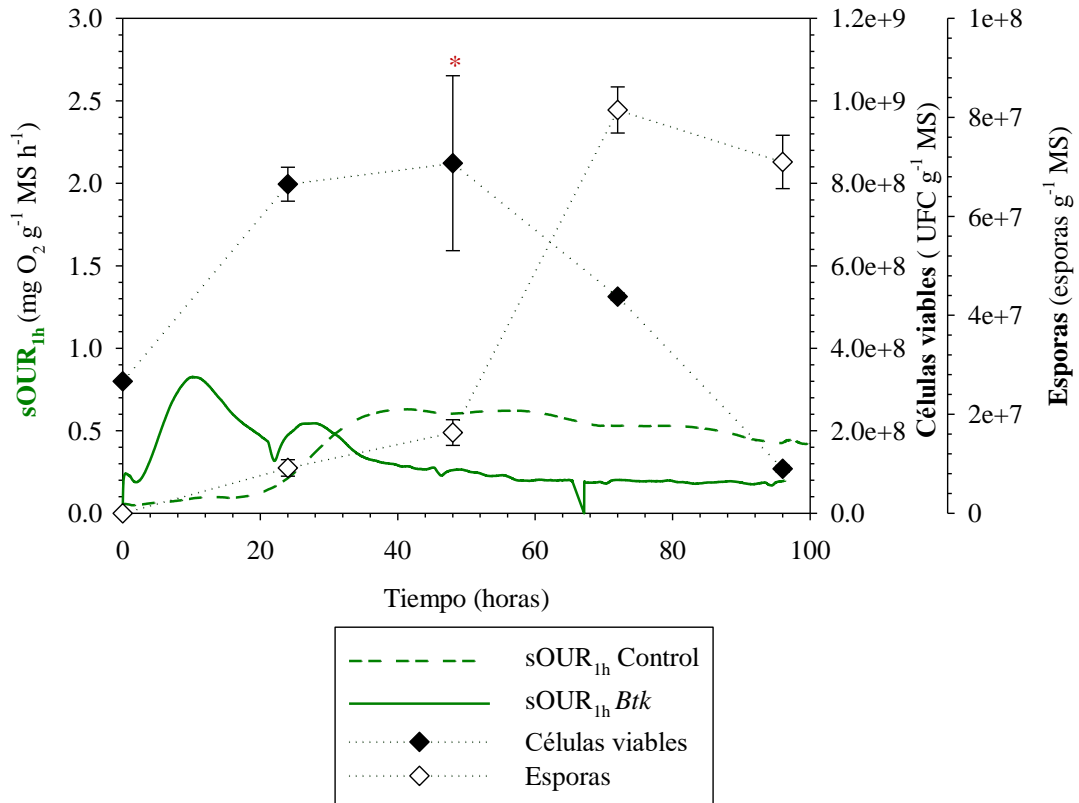


Figura 4.3. Perfiles de sOUR y células viables y esporas obtenidos en reactores FES de 0.5 L utilizando digestato estéril como sustrato para la producción de biopesticidas. Los valores representados corresponden a la media de 3 fermentaciones idénticas. Los puntos experimentales con un asterisco indican una desviación alta ($p > 0.05$).

El bajo contenido en compuestos fácilmente metabolizables del digestato en una fermentación no estéril parece que se consumiría rápidamente, tal y como demostraron Martínez et al. (2017) con otro tipo de microorganismo. Estos investigadores determinaron que cuando se utiliza un sustrato con alto contenido de azúcar soluble (30% bs), tal como la melaza de remolacha azucarera en un proceso no estéril de FES, el contenido de azúcar se reduce en casi 80% en 24 h. Las fermentaciones representadas en la Figura 4.3 comienzan sin presencia de esporas en la matriz sólida, siendo solo detectadas a partir de la primera muestra a las 24 horas de la fermentación, con un máximo a las 72 horas con valores de $8.15 \pm 0.04 (10^7)$ esporas g^{-1} MS. Después de ese período, el recuento de esporas se mantuvo casi estable hasta el final de la fermentación. Esto se puede explicar con la hipótesis de que en ese momento se alcance un estado estable. Es

decir, parte de las esporas producidas pueden germinar formándose de nuevo células viables si el microentorno es favorable en el reactor y parte de las células viables inician el proceso de esporulación debido a situaciones estresantes de otras actividades no favorables o al propio ciclo de vida del *Bt*.

Otros estudios utilizando diferentes sustratos, trabajando en condiciones similares, observaron un recuento de células final de 6.6 (10^{10}) UFC g⁻¹ MS (Devi et al., 2005), 1.0 (10^{10}) UFC g⁻¹ MS (Zhuang et al., 2011) y 6.2 (10^{11}) UFC g⁻¹ MS (Ballardo et al., 2016), que son más altos que los obtenidos en el presente estudio utilizando el digestato como sustrato. Por otra parte, los recuentos de esporas informados por los mismos autores oscilaron entre 10^7 y 10^9 UFC g⁻¹ MS, que indica que los resultados obtenidos en este trabajo están en el rango medio de los reportados en otras publicaciones, siendo los sustratos utilizados por Devi et al. (2005) y Ballardo et al. (2016) salvado de trigo y fibra de soja, respectivamente. Estos materiales presentan baja variabilidad en su composición y fueron, en el caso de Devi et al. (2005) suplementados con fuentes de carbono externo y nitrógeno. En este contexto, se puede afirmar que el digestato presenta una cantidad limitada de nutrientes que provoca la esporulación del *Bt* de forma rápida.

La Figura 4.4. presenta los resultados obtenidos utilizando digestato no estéril, después de un proceso de higienización. La actividad biológica observada en este caso aumentó más rápidamente y fue más alta que en condiciones estériles, probablemente por la mayor presencia de poblaciones microbianas en los reactores, tanto en el caso del control como en el de los reactores con *Btk*. El valor máximo de sOUR se encontró a las 4 horas con un valor promedio de 2.53 ± 0.83 mg O₂ g⁻¹ MS h⁻¹. La no esterilidad de la fermentación implicó un mayor número de microorganismos capaces de colonizar la matriz sólida, que genera un aumento global de la actividad biológica y mayor desviación entre las réplicas.

En contraste con lo observado en los experimentos con digestato estéril, el *Btk* no se desarrolló en el mismo orden de magnitud en el digestato no estéril únicamente higienizado. En este sentido, el máximo crecimiento celular se observó a las 48 h con un recuento de células viables de 1.70 ± 0.51 (10^8) UFC g⁻¹ MS, que representa un aumento de 1.34 veces del recuento celular inicial. Después de ese momento, las células viables disminuyeron hasta final de la fermentación hasta valores de 6.02 ± 0.56 (10^7) UFC g⁻¹ MS. En cuanto a la producción de esporas, la fermentación comenzó también sin esporas.

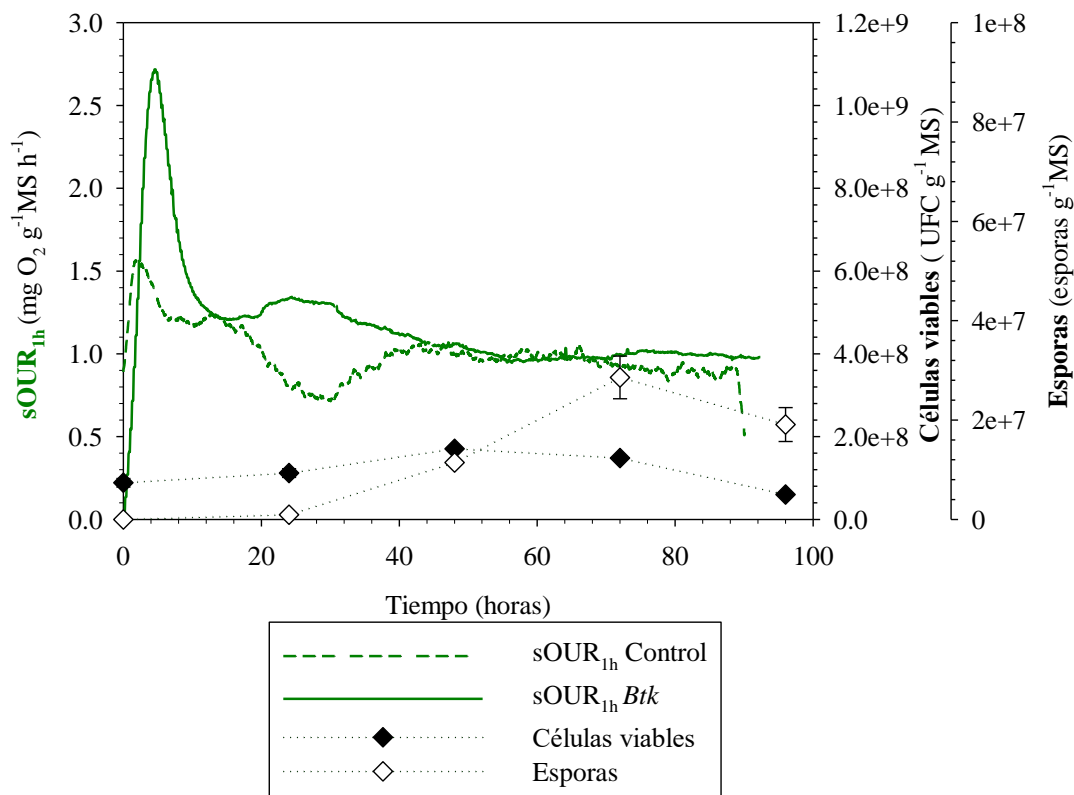


Figura 4.4. Perfiles de sOUR y células viables y esporas obtenidos en reactores FES de 0.5 L utilizando digestato higienizado no estéril como sustrato para la producción de biopesticidas. Los valores representados corresponden a la media de 3 fermentaciones idénticas.

Después de las primeras 24 h de operación, cuando las células viables comenzaron a disminuir, las esporas comenzaron a aumentar. El número de esporas alcanzó su máximo a las 72 h de fermentación, como en el caso del digestato estéril, con un valor de 2.85 ± 0.22 (10^7) esporas g^{-1} MS.

La investigación previa realizada en las mismas condiciones estériles utilizando fibra de soja y FORM como sustratos presentaron un mayor recuento de células viables de 3.8 (10^{11}) UFC g^{-1} MS (Ballardo et al., 2016) pero un recuento de esporas de 2.1 (10^7) esporas g^{-1} MS (Ballardo et al., 2017), que está en el rango de lo obtenido en esta investigación. Los sustratos utilizados (FORM y fibra de soja) tenían más nutrientes disponibles, por lo tanto, proporcionaron un ambiente más adecuado para el crecimiento de *Bt*. Los mismos autores confirmaron que los recuentos finales de células y esporas dependían del inóculo

agregado a la matriz sólida. En este sentido, afirmaron que cuando el *Bt* se añadió en un 7 %, 9 % y 12 % al sustrato de FORM no estéril al final los recuentos de células viables obtenidos fueron 9.9 (10⁵) UFC g⁻¹ MS, 1 (10⁷) UFC g⁻¹ MS y 2.5 (10⁷) UFC g⁻¹ MS, respectivamente (Ballardo et al., 2017). Todos estos valores son más bajos que los observados en el presente trabajo, mostrando que las condiciones desfavorables para el crecimiento de *Bt* promueven su esporulación.

Del presente estudio también se puede afirmar que es posible el uso de digestato como único sustrato para la producción de biopesticidas. *Btk* pudo crecer y esporular sobre la matriz sólida utilizando digestato higienizado a temperatura controlada. Esto será de gran importancia para el desarrollo del proceso y la valoración de los costes asociados. El uso de digestato como sustrato para su bioconversión en un producto con un valor añadido, contribuirá a cerrar el ciclo de la materia orgánica, optimizando su gestión en un enfoque circular. Los resultados positivos obtenidos en este trabajo abren nuevas alternativas para la valorización del digestato como sustrato para la producción de biopesticidas.

4.3.3. Fracción sólida del digestato: producción de proteasas a partir de *Bacillus thuringiensis*

El *Bt* es conocido por su actividad biopesticida, pero también se conoce que es un microorganismo que puede producir otras enzimas, como proteasas. Las proteasas se consideran claves en una amplia gama de procesos biológicos, como la regulación del ciclo celular, el crecimiento celular, la diferenciación y la esporulación (Brar et al., 2007). Éstas tienen una correlación con la toxicidad de *Bt* y el recuento de células producidas en los experimentos de FmS con *Bt* en el medio convencional, aguas residuales y lodos de aguas residuales, siempre en condiciones estériles (Brar et al., 2007; Yezza et al., 2006b).

Después de analizar los resultados de la producción de biopesticida y proteasas en el digestato por medio del proceso FES, se evaluó la actividad de la proteasa cuando el residuo era inoculado con *Btk* tanto en condiciones estériles como no estériles, y comparando los valores de proteasas con un control sin *Btk*.

En la Figura 4.5. se muestra la producción de proteasas, realizando el análisis en el mismo reactor que el digestato en condiciones estériles, inoculado con *Btk* y sin inocular. Se

observa durante la fermentación que la actividad de proteasas inicial del residuo sin inocular con *Btk* tiene unos valores muy inferiores a los que se producen cuando el *Btk* está inoculado (residuo estéril). Esta actividad comienza a aumentar en los dos casos hasta llegar a un máximo a las 72 horas, con un valor de 112 U g⁻¹ MS en el control y de 117.6 U g⁻¹ MS en el digestato con *Btk*, aunque al final del proceso se observa una disminución.

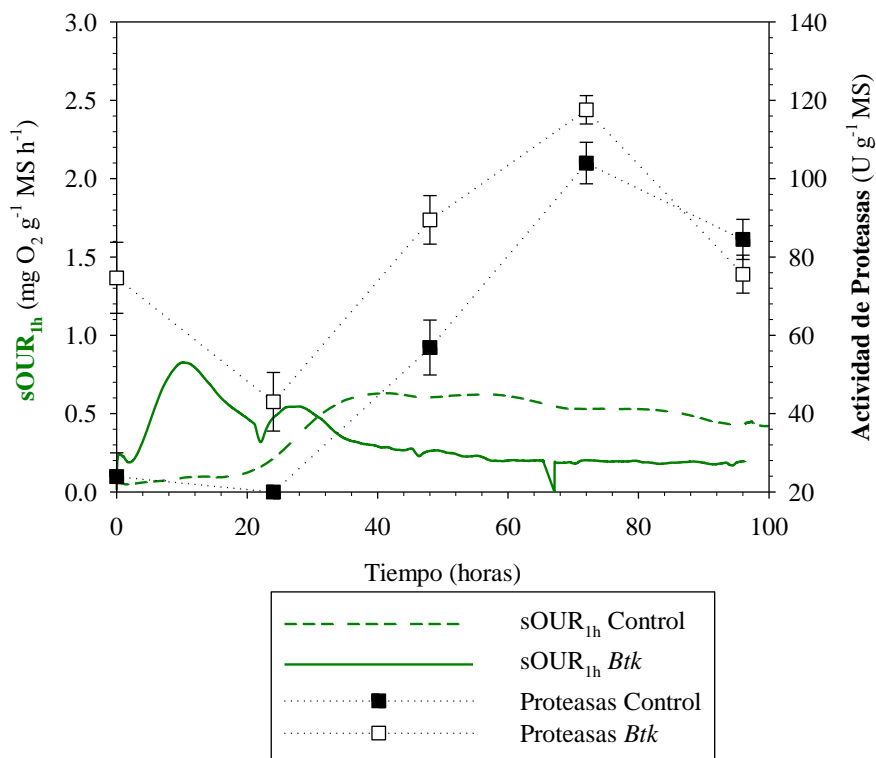


Figura 4.5. Perfiles operacionales de FES realizados por triplicado utilizando digestato estéril como sustrato en un reactor de 0.5 L para la producción de enzimas hidrolíticas. Se presentan la producción de proteasa del control (negro) y de proteasa del digestato inoculado con *Btk* (blanco).

Los mayores valores de proteasas del residuo inoculado con *Btk*, pueden ser debidos a la lisis celular del *Btk* durante las fases de crecimiento post-exponencial (Brar et al.,2007), llegando a su máximo a las 72 horas con un valor de 117.59 U g⁻¹ MS. Este valor se debe a la hidrólisis de las proteínas complejas residuales para satisfacer las necesidades nutricionales, de modo que a medida que el *Btk* evoluciona y crece formando la espora y el cristal condiciona también su acción biopesticida (Brar et al., 2007). Posteriormente, el valor de proteasas disminuye debido a la carencia de nutrientes en el digestato.

De hecho, en el digestato estéril no se debería observar actividad alguna, por lo que la esterilización inicial no es 100% efectiva y alguna población microbiana se desarrolla produciendo las proteasas.

En la Figura 4.6. se presentan los resultados obtenidos con digestato no estéril higienizado control e inoculado con *Btk*. Se puede observar que los valores de proteasas del control, excepto al inicio, son ligeramente superiores a las que se producen con *Btk*. Esto puede ser debido a la competencia de microorganismos presentes en el digestato que evolucionan de forma diferente, dependiendo de si el digestato se encuentra inoculado con *Btk* o no.

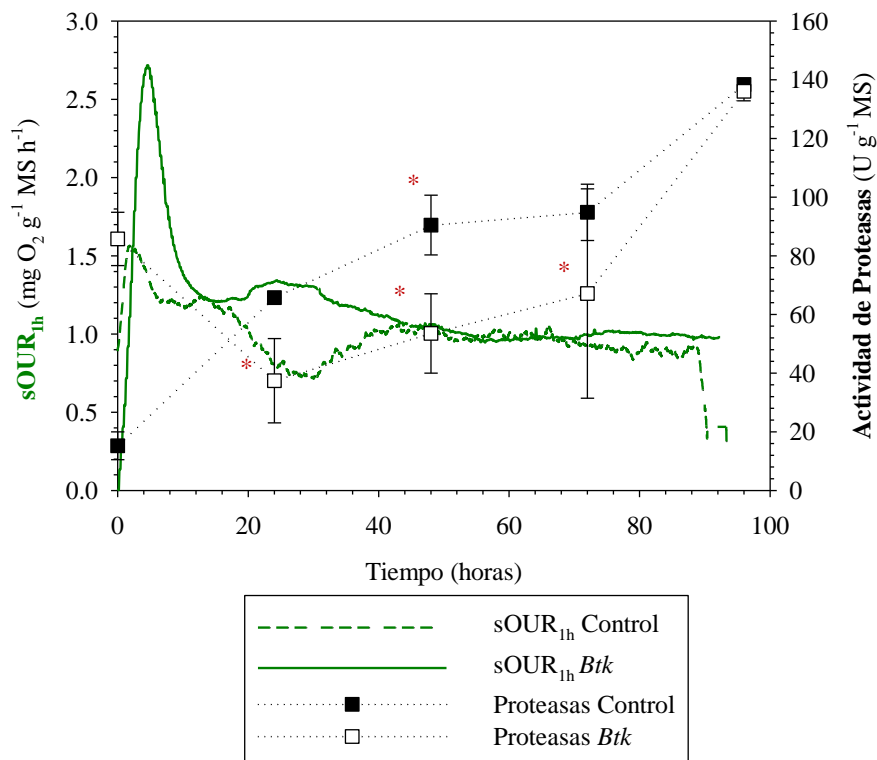


Figura 4.6. Perfiles operacionales de FES realizados por triplicado utilizando digestato no estéril como sustrato en un reactor de 0.5 L para la producción de enzimas hidrolíticas. Se presentan la producción de proteasa de control y proteasas de digestato inoculado con *Btk*. Los puntos experimentales con un asterisco indican una desviación alta ($p > 0.05$).

Cuando el *Btk* es inoculado en el digestato no estéril higienizado, ya se ha observado que el número de colonias y esporas es menor en comparación con el digestato esterilizado.

Las proteasas iniciales en el digestato no estéril sin inocular son superiores a las del digestato estéril, teniendo un valor inicial de actividad de proteasas de $15.23 \text{ U g}^{-1} \text{ MS}$ que van aumentando hasta el final del proceso donde se obtiene un valor de $138.39 \text{ U g}^{-1} \text{ MS}$, 1.6 veces superior al digestato estéril. En el caso de digestato inoculado con *Btk* las proteasas son muy elevadas al comienzo de la fermentación con un valor de $85.77 \text{ U g}^{-1} \text{ MS}$, pero conforme evoluciona la fermentación van disminuyendo hasta $67.15 \text{ U g}^{-1} \text{ MS}$ a las 72 horas, dando su máximo a las 96 horas de $136.09 \text{ U g}^{-1} \text{ MS}$. Esto se justifica porque el *Btk* consume materia fácilmente biodegradable para asegurar el crecimiento en la primera fase, por lo que se demuestra un aumento lento de proteasas que va incrementándose hasta la fase estacionaria (Zouari y Jaoua 1999). Esta investigación de la producción de proteasas es interesante para comprender mejor la evolución de *Btk* y su producción. Se ha confirmado que las proteasas extracelulares de *Btk* son determinantes directos de su crecimiento y también sirven como indicador potencial de entomotoxicidad (Tyagi et al., 2002). Por lo tanto, los esfuerzos de investigación futuros deben concentrarse en obtener conocimientos fundamentales sobre la activación, mecanismo de degradación y resistencia de diferentes proteínas cristalinas intercedidas por proteasas *Btk*. En estudios de Ballardo et al. (2016) con residuo de soja no estéril se observó que inoculando *Btk* el valor de proteasas fue hasta $497 \pm 17 \text{ U g}^{-1} \text{ MS}$ a los 6 días, por lo que los valores obtenidos con digestato no estéril inoculado con *Btk* se consideran inferiores y, por lo tanto, el digestato no se considera óptimo para la producción de proteasas a partir de *Btk*.

4.3.4. Fracción sólida del digestato: producción de otros bioproductos

En referencia a la producción de otros bioproductos como son las celulasas y los soforolípidos, se muestran únicamente las conclusiones, ya que estos procesos fueron desarrollados por otras compañeras del grupo GICOM, como ya se ha mencionado anteriormente.

4.3.4.1. Celulasas

En el caso de las celulasas los valores de actividad obtenidos fueron de 0.5 y $1.5 \text{ FPU g}^{-1} \text{ MS}$, que se encuentran en el rango inferior obtenido a escala de laboratorio en condiciones similares en trabajos del grupo con otros residuos (Cerdeja et al., 2017a) e incluso menores,

en comparación con FES utilizando sustratos estériles o agregando una sola cepa (Dhillon et al., 2012; El-Bakry et al., 2015). El escaso valor de celulasas puede ser debido a que éstas necesitan para su producción un medio ácido, mientras que el pH del digestato presenta valores entre 8-9 y, además, el cambio de condiciones anaerobias del digestato a las condiciones aerobias de la FES puede influir en el incremento de población microbiana que modificará las características de la estructura del sustrato (contenido de proteínas, lípidos o hidratos de carbono) que no son asequibles para la producción de celulasas. Como conclusión del estudio sobre producción de celulasas, ésta no parece viable sin un proceso previo de optimización del medio y de las condiciones del experimento. Se pueden evaluar varias opciones para un estudio adicional, tales como la optimización de la relación de extracción (Pirota et al., 2013), la adaptación de los microorganismos nativos utilizando una estrategia de operación por lotes secuencial (Cerdeira et al., 2017a) o la inoculación con cepas específicas.

4.3.4.2. Soforolípidos

El estudio para la producción de soforolípidos se realizó con *Starmerella bombicola* considerando la incorporación de fuentes externas de grasa y azúcar, como glucosa y ácido oleico, en digestato estéril y digestato higienizado durante 5 días.

El cultivo de *S. bombicola* se asocia con una fuerte caída inicial del pH para una producción óptima de soforolípidos, donde el pH se debe mantener en 3.5 después de una disminución espontánea (Göbber et al., 1984). En todas las fermentaciones con digestato el pH aumentó ligeramente de 8.8 a 9.2 ± 0.2 , no siendo adecuado para el crecimiento de *S. bombicola*.

El único resultado positivo obtenido fue en la fermentación de digestato con glucosa y ácido oleico, donde el rendimiento de producción de soforolípidos fue de $0.020 \text{ g g}^{-1} \text{ MS}$. Es un valor bajo en comparación con lo reportado por Jiménez-Peñalver et al. (2016). Estos autores informaron un rendimiento de $0.19 \text{ g g}^{-1} \text{ MS}$ utilizando residuos de torta de aceite y melaza de remolacha azucarera con inóculo de *S. bombicola*. Por otra parte, el rendimiento de la producción de los experimentos complementados con azúcar y fuentes de grasa fue menor que el obtenido por Vishal y Aniruddha (2012), que observaron $38 \text{ g g}^{-1} \text{ MS}$ utilizando salvado de trigo complementado con ácido oleico y glucosa.

Los resultados generales para la producción de soforolípidos con digestato como sustrato principal demostraron que ésta no es adecuada sin una optimización exhaustiva. Una de las mejoras que podrían realizarse sería la de cubrir requerimientos nutricionales para el adecuado crecimiento de *S. bombicola* modificando el contenido de azúcar y grasa hasta valores óptimos para la producción de soforolípidos, además evidentemente, de regular el pH.

4.3.5. Fracción líquida del digestato: sustitución de medio sintético por digestato líquido para producir inóculo de *Bacillus thuringiensis* para la FES.

Como ya se ha comentado, el objetivo de este estudio fue determinar si la fracción líquida de digestato podía sustituir al medio comercial (nutriente Broth) en la preparación del inóculo de *Btk* para posteriores experimentos de FES.

La caracterización de la fracción líquida de digestato se detalla en la Tabla 4.1. Se observa que las concentraciones de metales son bajas en comparación con las publicadas por Zhuang et al., (2013), por lo que se cree, a priori, que ninguno de ellos podría inhibir el proceso de crecimiento de *Btk*.

Se realizan distintos ensayos de crecimiento de *Btk* en reactores de 0.5-L con el digestato líquido (DL) estéril (DLE), higienizado (DLH) y suplementado con nutriente Broth estéril (DLB). En el apartado 4.2.4 se muestra el esquema de todas las pruebas realizadas.

La Tabla 4.2 resume todas las condiciones operacionales de las pruebas con digestato líquido, considerando de mayor relevancia los parámetros de densidad óptica, pH, CE, células viables y esporas.

En comparación con el control (crecimiento de *Btk* en medio comercial), los valores de densidad óptica fueron más elevados en DLE y DLB. Se estima que en el caso de DLE, estos valores se deben a un crecimiento de *Btk* únicamente, pues el proceso de esterilización del digestato líquido habría eliminado los microorganismos previos a la inoculación con *Btk*. En el caso de DLB, al estar en condiciones no estériles y suplementado con nutriente Broth, permitiría el crecimiento de otros microorganismos aerobios además de *Btk*.

Otro de los parámetros importantes para el crecimiento del *Btk* es el pH que debe estar entre valores de 6 y 7.5. En este caso, el nutriente Broth siempre se ajusta a 7.2, mientras

Tabla 4.2. Principales parámetros en el crecimiento de *Btk* en fracción líquida del digestato durante 48 h.

Parámetro	Unidades	Control	DLB	DLBp	DLE	DLEp	DLH	DLHp
DO	-	3.83±0.13	10.30±0.06	10.30±0.06	9.62±0.01	1.61±0.07	2.88±0.03	4.20±0.05
ST	(g L ⁻¹)	3.01±0.02	1.95±0.26	1.95±0.26	2.36±0.23	4.68±0.04	2.55±0.07	4.66±0.03
SV	(g L ⁻¹)	44.89±0.41	-	-	-	-	-	-
SST	(g L ⁻¹)	1.66±0.50	-	-	-	-	-	-
SSV	(g L ⁻¹)	1.48±0.49	-	-	-	-	-	-
pH Inicial (1:5)	-	7.21±0.01	9.07±0.11	7.07±0.11	10.84±0.03	7.07±0.11	8.84±0.02	7.18±0.04
pH Final (1:5)	-	7.01±0.01	9.71±0.02	9.31±0.02	8.83±0.05	5.48±0.06	9.50±0.08	9.08±0.07
CE Inicial	(mS cm ⁻¹)	8.84±0.01	12.12±0.02	15.22±0.02	7.90±0.03	15.22±0.02	14.94±0.08	16.67±0.59
CE Final	(mS cm ⁻¹)	9.30±0.01	14.37±0.06	13.87±0.06	9.99±0.02	14.20±0.06	10.65±0.11	12.05±0.01
Células viables	(UFC g ⁻¹ MS)	2.20±0.18(10 ⁸)	1.34±0.28(10 ⁶)	2.70±0.25(10 ⁶)	1.11±0.34(10 ⁵)	3.33±0.23(10 ⁷)	1.23±0.30(10 ⁵)	3.78±0.53(10 ⁶)
Esporas	(esporas g ⁻¹ MS)	4.20±0.25(10 ⁸)	1.26±0.29(10 ⁵)	1.76±0.59(10 ⁵)	2.22±0.67(10 ⁵)	NA	NA	NA

DLE: Digestato líquido Estéril

DLEp: Digestato líquido Estéril ajustado el pH a 7.

DLH: Digestato líquido higienizado

DLHp: Digestato líquido higienizado ajustado el pH a 7.

DLB: Digestato líquido suplementado con Broth

DLBp: Digestato líquido suplementado con Broth ajustado el pH a 7.

DO: Densidad óptica (600 nm)

ST: Sólidos totales

SV: Sólidos volátiles

SST: Sólidos suspendidos totales

SSV: Sólidos suspendidos volátiles

CE: Conductividad eléctrica

UFC: Unidades formadoras de colonias

NA: No aparece

que el digestato líquido tiene un pH básico de 10.2 y puede inhibir el crecimiento de *Btk*. Por eso, se ajustaron dos muestras (DLEp y DLHp) a un pH de 7.0 ± 0.5 con HCl. En estas pruebas no se observó esporulación del *Btk*, aunque los valores de células viables son más elevados que en aquellas en las que no se ajustó pH. Las causas de la inhibición de la esporulación en estas muestras no han sido determinadas, pero podría estar relacionada con la cantidad de HCl necesario para el ajuste de pH (Behle et al., 1997).

Los valores de conductividad eléctrica ya son superiores a los que existen en la fracción sólida del digestato (2.84 ± 0.1) teniendo valores hasta 16.67 ± 0.59 mS cm^{-1} , al ajustar el pH estos valores tienden a elevarse como ya observó Sarrafzadeh et al., (2005). En este caso, los valores de conductividad disminuyen, lo cual concordaría con la no presencia de esporas en las condiciones de DLEp, DLH y DLHp, ya que durante la esporulación el *Bt* tiende a incrementar la conductividad debido a los cristales proteicos (Barbarán-Vilela et al., 2015).

En la Tabla 4.2 también se muestran los valores de células viables y esporas a las 48 horas del proceso. El valor de células viables del control es de 2.20 ± 0.18 (10^8) UFC mL^{-1} mientras que en el resto de las pruebas los valores están en el orden de 10^5 - 10^6 UFC mL^{-1} , siendo ligeramente superiores en las condiciones en las que se ajusta el pH. En cambio, el valor de esporas del control es de 4.20 ± 0.25 (10^8) esporas mL^{-1} , pero en el resto de las condiciones solo se puede destacar el DLE donde las esporas han crecido un valor de 2.20 ± 0.67 (10^5) esporas mL^{-1} , debido a valores altos de pH y valores similares de conductividad al nutriente Broth.

Si se comparan los valores obtenidos con el control (*Btk* crecido en nutriente Broth), los valores de células viables y esporas son menores en todas las condiciones establecidas para el digestato líquido, lo que quiere decir que en ningún caso el digestato líquido es óptimo para el crecimiento de *Btk* a partir de una crioperla.

4.3.6. Fracción líquida del digestato: producción de biopesticidas a partir de *Bacillus thuringiensis* a través de FmS

La Tabla 4.3 muestra los parámetros más destacables obtenidos en la FmS al final del proceso (4 días) utilizando digestato líquido como medio de cultivo inoculado con *Btk*. Se observa que los valores de densidad óptica son más elevados que en el experimento

Tabla 4.3. Principales parámetros del proceso de FmS de digestato líquido con *Btk*.

Parámetro	Unidades	Control	DLB	DLBp	DLE	DLEp	DLH	DLHp
DO	-	4.26±0.13	11.56±0.75	11.16±0.25	8.26±0.13	7.16±0.15	4.66±0.15	4.16±0.15
ST	(g L ⁻¹)	5.01±0.06	6.40±0.04	5.13±0.03	6.01±0.02	3.03±0.03	2.03±0.03	4.13±0.05
SV	(g L ⁻¹)	64.89±0.32	-	-	-	-	-	-
SST	(g L ⁻¹)	2.67±0.50	-	-	-	-	-	-
SSV	(g L ⁻¹)	2.50±0.37	-	-	-	-	-	-
pH Inicial (1:5)	-	7.18±0.01	10.15±0.11	7.15±0.11	10.84±0.03	7.10±0.09	9.14±0.04	7.02±0.05
pH Final (1:5)	-	7.12±0.01	9.31±0.04	8.31±0.04	8.97±0.05	5.34±0.02	8.90±0.07	9.08±0.02
CE Inicial	(mS cm ⁻¹)	7.84±0.06	16.53±0.08	15.53±0.09	6.90±0.03	10.22±0.05	14.34±0.07	14.97±0.51
CE Final	(mS cm ⁻¹)	9.20±0.06	14.01±0.02	13.21±0.03	8.99±0.02	12.40±0.08	10.64±0.11	9.87±0.05
Células viables	(UFC g ⁻¹ MS)	1.20± 0.16(10 ⁹)	2.45±0.31(10 ⁴)	2.31±0.13(10 ⁴)	5.56±0.72(10 ⁴)	3.89±0.24(10 ⁵)	3.33±0.50(10 ⁵)	5.67±0.52(10 ⁵)
Esporas	(esporas g ⁻¹ MS)	3.60±0.24(10 ⁸)	1.98±0.34(10 ⁵)	2.22±0.67(10 ⁵)	1.00±0.16(10 ⁵)	1.00±0.18(10 ⁵)	1.33±0.24(10 ⁵)	4.44±0.10(10 ⁴)

DLE: Digestato líquido Estéril

DLEp: Digestato líquido Estéril ajustado el pH a 7.

DLH: Digestato líquido higienizado

DLHp: Digestato líquido higienizado ajustado el pH a 7.

DLB: Digestato líquido suplementado con Broth

DLBp: Digestato líquido suplementado con Broth ajustado el pH a 7.

DO: Densidad óptica (600nm)

ST: Sólidos totales

SV: Sólidos volátiles

SST: Sólidos suspendidos totales

SSV: Sólidos suspendidos volátiles

CE: Conductividad eléctrica

UFC: Unidades formadoras de colonias

NA: No aparece

anterior, y de nuevo que el DLBp tiene el valor más alto de densidad óptica (11.56 ± 0.75), aunque no se corresponde con un aumento en las células viables y esporas de *Btk*, lo que implica que existen otros microorganismos más adecuados para desarrollarse en el digestato líquido.

Los valores de pH y CE se comportan de la misma manera que en el experimento anterior. En cambio, como puede verse en la Tabla 4.3 los valores de células viables tienden a disminuir en todas las situaciones respecto al inóculo inicial crecido con nutriente Broth con un valor de células viables de $2.40 \pm 0.34 (10^7)$ UFC mL⁻¹, llegando a un valor mínimo de $2.31 \pm 0.13 (10^4)$ UFC mL⁻¹ con DLBp. En cambio, en todas las condiciones existen una cantidad de esporas mayor que en la prueba anterior, *Btk* crecido a partir de la crioperla, en el que no se observó crecimiento de esporas. Los valores de esporas en el control son de $3.60 \pm 0.24 (10^8)$ UFC mL⁻¹, mientras que en el resto de las condiciones disminuyen 3 órdenes de magnitud.

Estos resultados se deben a la difícil disponibilidad de nutrientes y la complejidad del digestato líquido, la época del año en el que se toma la muestra de digestato y los métodos utilizados para su generación hace que las características de estos varíen de uno a otro (Vidyarthi et al., 2002; Tirado-Montiel et al., 2001; Krogmann et al., 1997). Si se comparan las concentraciones de esporas con los valores obtenidos con residuos de agricultura, éstas son del orden de 10^9 esporas mL⁻¹ (Jouzani et al., 2015), como los obtenidos con lodos de aguas residuales que son de 10^6 y 10^9 UFC mL⁻¹ (Yezza et al., 2006a; Vu et al., 2010), son valores superiores hasta 4 órdenes de magnitud que los obtenidos con digestato líquido.

En algunos estudios de FmS las concentraciones de metales pueden tener un efecto negativo en el crecimiento de *Bt*, pero si se observa la Tabla 4.1, los valores de metales en el digestato líquido son inferiores a los publicados para otros estudios como el de Yao et al. (2003) que explica que una cantidad excesiva de Cu puede actuar adversamente sobre los grupos mercapto de macromoléculas biológicas y, en consecuencia, destruir las proteínas y la proliferación, lo cual afectaría al cristal proteico de *Bt* y su efecto biopesticida. El factor más limitante del crecimiento de *Bt* es la relación de C/N del digestato líquido (1.26) de ahí que se explique el bajo crecimiento en todas las condiciones probadas con digestato líquido, ya que los nutrientes necesarios para el

crecimiento son muy limitados, por lo que se necesitaría suplementar el digestato con nutrientes como aquellos que pueden proporcionar, por ejemplo, las melazas.

Por lo tanto, el digestato líquido no es un sustrato óptimo para producir biopesticidas debido a su baja cantidad de nutrientes, la variabilidad de pH y la cantidad de microorganismos presentes en él que hace difícil poder optimizar su producción.

4.4. Conclusiones

El digestato se evaluó como un sustrato para la producción de diferentes bioproductos a través de FES en el marco de una nueva estrategia de gestión de residuos. El intento de producir celulasas, biosurfactantes y proteasas reportó bajos rendimientos de producción. En el caso de obtener proteasas a partir de *Btk* también dio valores inferiores a los recogidos en la bibliografía y, por lo tanto, se descartó esta posibilidad, porque requerirían estudios adicionales para mejorar la productividad.

Los mejores resultados de producción se obtuvieron para el biopesticida producido por *Btk*. Este microorganismo fue capaz de crecer y esporular usando digestato higienizado. La producción de esporas obtenida se encontraba en el rango medio de los valores reportados en otras referencias. Se realizarán estudios adicionales para la optimización, escalado y ensayos de campo de acción biopesticida.

La fracción líquida de digestato se demostró no adecuada para producir un inóculo de *Btk* y para sustituir el medio sintético Broth. También se concluyó que usando la fracción líquida como medio de cultivo en una FmS se obtienen valores de concentración de células viables y esporas menores que los que se obtienen con la FES, y además los valores son inferiores a los recogidos con otros residuos orgánicos. Esto se puede deber a que el digestato líquido presenta valores elevados de pH y bajos de nutrientes para producir un biopesticida a partir de *Btk*.

CAPÍTULO 5

*Estrategias de operación en FES para la
producción de biopesticidas con *Bacillus
thuringiensis**

5.1. Introducción

Observando los resultados obtenidos del crecimiento de *Btk* en digestato como sustrato en los reactores a escala laboratorio, en este capítulo se estudian las posibles estrategias de operación en reactores aislados de 10-L.

En primer lugar, se ha querido aumentar la escala a reactores aislados térmicamente, en los cuales la temperatura aumenta según la actividad microbiológica del proceso de FES. Por ello, se ha estudiado el proceso en reactores de 4.5-L con una capacidad de 1.5 kg de sustrato total para observar la temperatura que se alcanza. Posteriormente, se aumentó la cantidad de material hasta 3.5 kg en los reactores aislados de 10-L, donde se realizó un experimento para conocer la temperatura máxima y así poder comprobar si *Btk* es capaz de sobrevivir y colonizar toda la matriz sólida.

Una vez conocidas las temperaturas que se alcanzan en cada uno de los reactores, se plantean una serie de estrategias de operación en los reactores térmicamente aislados de 10-L para disminuir el incremento de temperatura que se produce en el proceso de FES y los costes de inóculo inicial. Las estrategias que se han seguido son las siguientes:

- Estrategia 1: Inocular *Btk* en el digestato al comienzo de la FES.
- Estrategia 2: Inocular *Btk* en el digestato a las 48 horas del proceso de FES.
- Estrategia 3: Inocular *Btk* en el digestato al comienzo de la FES utilizando una cantidad de inóculo menor ($0.015 \text{ g } Bt \text{ g}^{-1}$ digestato).
- Estrategia 4: Inocular *Btk* en el digestato al comienzo de la FES utilizando la mitad de la capacidad de los reactores.

Otra estrategia seguida ha sido trabajar con una operación secuencial (SBR) para producir biopesticida disminuyendo los costes de inóculo inicial, ya que, una vez producido el primer lote, parte se utiliza como inóculo para el siguiente lote. Esta estrategia se realiza primero en reactores de 0.5-L (escala laboratorio) y posteriormente en los reactores aislados térmicamente de 10-L. Así se efectúan cinco estrategias diferentes de operación.

En paralelo se ha realizado un análisis microbiológico del proceso de FES para comprobar que el digestato no contenía *Bt* en su inicio, que el proceso de higienización eliminaba parte de los microorganismos y que se producía *Bt* mediante FES.

Por último, se envió material fermentado al Instituto de Investigación y Tecnología Agroalimentarias (IRTA) y a ReFarmers (colaborador en el proyecto DECISIVE) para

evaluar su potencial como biopesticida sobre dos plagas diferentes y con métodos de cuantificación distintos. Una de las plagas analizadas fue la de *Plodia interpunctella* (*Lepidoptero*) de la familia *Pyralidae* originaria de Europa, es una polilla india de la harina y polilla de la fruta seca (Mohandass et al., 2007). Atacan a los alimentos almacenados y puede encontrarse sobre todo en frutos secos como nueces o almendras, aunque también se alimentan de cacao y a veces de cereales (Nansen y Phillips, 2004). Además, existe evidencia de que *P. interpunctella* ha desarrollado resistencia al pesticida comercial Dipel® que contienen *Bt* (Mohandass et al., 2007). Por estas razones, existe la necesidad de desarrollar insecticidas alternativos y que no dañen el medio ambiente para el control de *P. interpunctella*.

Por otro lado, la otra plaga analizada fue *Pieris brassicae* (mariposa blanca grande) es una plaga que afecta al cultivo de la col. En su etapa como oruga es cuando afecta al cultivo pudiendo observar su efecto debido a las hojas mordidas por las orugas. Esta afección se produce porque los huevos son depositados en las hojas y lo utilizan como alimento en su nacimiento y primeras fases de desarrollo. La aplicación del biopesticida se realiza en forma de spray líquido o un polvo blanco sobre las hojas (Lacey et al., 2001). Para ambas plagas se utilizan tratamientos de insecticidas comerciales de superficie con *Btk* (Arthur y Phillips, 2003) como referencia.

Así, el objetivo principal de este capítulo es determinar la mejor estrategia de operación para la producción de biopesticida y así evaluar el material por medio de dos bioensayos diferentes por parte de otras instituciones y conocer su efecto real. Como objetivo secundario se comprueban los microorganismos presentes en el digestato y en el material final fermentado concluyendo que no existen patógenos y se obtiene un material estable.

5.2. Metodología

5.2.1. Microorganismo

En este capítulo todos los experimentos para la obtención del biopesticida han sido realizados con la cepa *Btk*.

5.2.2. Sistema de fermentación II: reactores aislados térmicamente de 4.5-L

Todas las fermentaciones se llevan a cabo en condiciones no estériles durante 4 días usando una mezcla inicial de sólido consistiendo en digestato higienizado y astillas de

madera, como agente estructurante. La relación de sustrato y astillas de madera es de 1:1 (v:v). Cada experimento consiste en un reactor control (digestato sin inocular *Btk*) y un duplicado de digestato inoculando *Btk*. En todos los experimentos el digestato ha sido higienizado como se ha explicado en el Capítulo 3, apartado 3.1.1. Sustratos y acondicionamiento.

En las fermentaciones con los reactores aislados de 4.5-L se usa la ratio de 0.0030 g *Bt* g⁻¹ digestato y una cantidad de muestra total de 1.2 kg de matriz sólida. El caudal de aire está controlado entre 200 y 400 mL min⁻¹.

5.2.3. Estrategias de operación en Sistema de fermentación II: reactores aislados térmicamente de 10-L

Las estrategias de operación en los reactores de 10-L se estudiaron en condiciones no estériles, con digestato higienizado a 70°C. En la Tabla 5.1 se indican las condiciones de operación utilizadas en cada una de las opciones. Las variaciones que se han realizado fueron cantidad de material, momento de inoculación y cantidad de inóculo.

Tabla 5.1. Condiciones de operación para cada una de las estrategias analizadas en los reactores de 10-L.

Estrategias	Cantidad muestra (kg)	Tiempo de inoculación (h)	Inóculo (g <i>Bt</i> g ⁻¹ digestato)	Caudal de aire (mL min ⁻¹)	Duración proceso (días)
Estrategia 1	3.5	0	0.0030	400 - 800	4
Estrategia 2	3.5	48	0.0030	400 - 800	6
Estrategia 3	3.5	0	0.0015	400 - 800	4
Estrategia 4	1.5	0	0.0030	400 - 800	4
Estrategia 5	3.5	0	0.0030	400 - 800	12

La mezcla sólida inicial consistía en digestato higienizado y astillas de madera como agente estructurante en una proporción de 1:1 (v:v). Cada conjunto de experimentos consistió en un reactor control (digestato sin inoculación de *Btk*) y un duplicado de digestato inoculado con *Btk*. Todas las estrategias se realizan con un caudal de aire de controlado entre 400 y 800 mL min⁻¹.

La estrategia 1 consiste en inocular *Btk* (0.0030 g *Bt* g⁻¹ digestato) al comienzo de la fermentación con una cantidad de muestra total de 3.5 kg y una duración del proceso de 4 días. Esta estrategia se utilizará para compararla con el resto de las operaciones, y así evaluar si se produce mayor cantidad de biopesticida con esta u otra alternativa.

La estrategia 2 se realiza para evitar someter a *Btk* a las temperaturas termófilas al principio del proceso de FES, por lo que se trata de inocular *Btk* (0.0030 g *Bt* g⁻¹ digestato) a las 48 horas de la fermentación con una cantidad de muestra total de 3.5 kg y una duración del proceso de 6 días.

La estrategia 3 se desarrolla por diversos motivos, el principal es para reducir la cantidad de inóculo inicial necesario para las fermentaciones y así disminuir los costes asociados. Esta estrategia consiste en inocular menor cantidad de *Btk* (0.0015 g *Bt* g⁻¹ digestato) al comienzo de la fermentación con una cantidad de muestra total de 3.5 kg y una duración del proceso de 4 días.

La estrategia 4 consiste en inocular *Btk* (0.0030 g *Bt* g⁻¹ digestato) al comienzo de la fermentación con una cantidad de muestra total de 1.5 kg, es decir con menor cantidad de material que la estrategia 1 y una duración del proceso de 4 días. Este caso se realiza también para evitar las altas temperaturas en el proceso de FES: disminuyendo la cantidad de material se intentó disminuir la temperatura a alcanzar, y que ésta pueda limitar el crecimiento y esporulación de *Btk*.

La estrategia 5 se propone para poder utilizar el sustrato convertido en biopesticida como inóculo para el siguiente proceso y así disminuir los costes de producción del inóculo y de operación en general, generando biopesticida por lotes (en el siguiente apartado se amplía la explicación correspondiente a esta estrategia).

5.2.4. Estrategia 5: operación secuencial por lotes (SBR)

En este caso, se realizó una primera aproximación a escala laboratorio (0.5-L) de una operación secuencial por lotes (SBR) y para probarla posteriormente en reactores de 10-L.

5.2.4.1. Sistema de Fermentación I: reactores de 0.5-L (escala laboratorio)

La fermentación se llevó a cabo en condiciones no estériles durante 12 días usando una mezcla sólida inicial que consistía en digestato higienizado y palillos de madera como agente estructurante en una proporción de 1:1 (v:v). Cada conjunto de experimentos consistió en un reactor control (digestato sin inoculación de *Btk*) y un duplicado de digestato inoculado con *Btk*.

Se ajustaron dos reactores de 0.5-L utilizando una relación de 0.0035 g *Bt* g⁻¹ digestato y utilizando el inóculo obtenido a escala laboratorio. Se utilizó un flujo de aire fijo de 20 mL min⁻¹ y una temperatura fija de 30°C.

La Estrategia 5 utilizando un SBR se realizó a partir de la máxima obtención de esporas en condiciones no estériles, según los resultados anteriores a escala laboratorio del Capítulo 4, es decir, a las 72 horas. La operación secuencial se basó pues en un tiempo de retención de sólidos de 72 horas, momento en el que finaliza el primer lote de la operación secuencial. Se efectúa el cambio de material, es decir se retiran del reactor el 50% de los sólidos fermentados húmedos con propiedades biopesticidas y el otro 50% restante del sólido fermentado se usa como inóculo para comenzar un nuevo lote, con la adición de 50% de digestato higienizado fresco y estructurante. El material eliminado se usa para todos los análisis elementales, conteo de células viables y esporas.

En todos los experimentos, el muestreo se realizó después de una homogeneización manual completa de los sólidos fermentados para obtener una muestra representativa completa y antes de alimentar el reactor con sustrato fresco. Se midieron las células viables y las esporas, índices respirométricos y otros parámetros rutinarios tales como humedad, materia orgánica, pH y CE.

5.2.4.2. Sistema de fermentación II: reactores aislados térmicamente de 10-L

La operación SBR en reactores de 10-L corresponde a la Estrategia 5 introducida en el apartado anterior.

La fermentación se realizó igual que la escala de laboratorio (apartado 5.2.4.1) pero utilizando astillas de madera como agente estructurante en una proporción de 1:1 (v:v). Cada conjunto de experimentos consistió en un reactor control (digestato higienizado sin inoculación de *Btk*) y un duplicado de digestato higienizado inoculado con *Btk*.

Se utilizó un inóculo inicial a una ratio de 0.0030 g *Bt* g⁻¹ digestato y un caudal de aire controlado entre 400 y 800 mL min⁻¹.

La estrategia SBR se realizó a partir de la máxima producción de esporas obtenida en la estrategia 1. Esta máxima actividad de esporas se observó a las 72 horas, donde se decidió realizar el cambio de lote. La operación secuencial por lotes se realiza en la misma proporción de material fermentado y material fresco (50:50). Se debe realizar una buena

homogeneización de ambos materiales, fresco y ya fermentado, para que *Btk* colonice toda la matriz sólida.

El material sustraído se utiliza para medir las células viables y las esporas para conocer si se superan o mantienen, ya que lo que se quiere es llegar a un estado estacionario en el que se mantengan constantes las producciones de *Btk*. También se midió el índice respirométrico y otros parámetros rutinarios tales como humedad, materia orgánica, pH y CE.

5.2.5. Microorganismos presentes en el proceso de FES con digestato

Este análisis se realizó en colaboración con el Laboratorio de Microbiología Aplicada y Medioambiental de la UAB. El análisis completo de resultados se muestra en el Anexo I. Este análisis se realizó por medio de las metodologías utilizadas tradicionalmente en microbiología.

Se analizaron los siguientes microorganismos: enterobacteriaceae totales, coliformes totales, *escherichia coli*, *staphylococcus aureus*, *salmonella spp.*, *clostridium perfringens*, *listeria spp.*, bacterias lácticas, bacterias anaerobias totales, bacterias aerobias totales, hongos miceliares y levaduras.

Las muestras analizadas fueron digestato inicial, digestato higienizado, digestato inoculado, digestato inoculado a 24 horas de la fermentación, digestato inoculado a 6 días del proceso de FES.

5.2.6. Bioensayos

Las muestras finales de la estrategia 1 del reactor de 10-L se enviaron a dos instituciones diferentes. Uno de los análisis se realizó en el centro de Cabrils del Instituto de Investigación y Tecnología Agroalimentarias (IRTA), en concreto, dentro del Programa de Producción Vegetal Sostenible y el otro en la empresa de agricultura urbana ReFarmers (Lyon, Francia) que forma parte del consorcio del proyecto DECISIVE y se encarga de determinar los efectos del bioproducto conseguido en la FES.

En el caso del IRTA el ensayo se realizó sobre larvas jóvenes de *Plodia interpunctella* (*Lepidoptera: Pyralidae*) evaluando el efecto *Btk* producido sobre digestato, así como de extractos de este y el inóculo inicial de la cepa *Btk*. Se incluyó además un control comercial de *Btk* a la dosis máxima recomendada y un control blanco tratado con agua. El efecto biopesticida se evaluó incorporando las muestras a la dieta de *P. interpunctella*.

En el caso de ReFarmers el ensayo se realizó sobre *caulis* (coles) variedad Belot en contenedores hortícolas y se les aplicó la plaga *Pieris brassicae* (*Lepidoptera: Pieridae*) (mariposa blanca grande), en las primeras etapas de crecimiento. Este ensayo se realizó en contenedores hortícolas, depositando en ellos las larvas y rociándolas con los extractos de digestato con propiedades biopesticidas, digestato fresco y un *Btk* comercial, y posteriormente con el conteo de larvas muertas y vivas comparándolos entre sí.

Los extractos de biopesticida producidos y enviados en ambos casos para los ensayos se consiguieron con una extracción del digestato fermentado en relación sólido:líquido de 1:10 con la solución salina de Ringer®, explicada en el Capítulo 3 apartado 3.6.2. Estimación de colonias y esporas.

5.2.7. Análisis estadístico

Se realizó un análisis estadístico utilizando la prueba de la t de Student con técnicas básicas de ANOVA con Minitab Software versión 15.1. En un nivel de probabilidad de $p < 0.05$ se basó en la prueba de Tukey que se seleccionó para determinar diferencias estadísticamente significativas en incrementos de células viables e incrementos de esporas, al comparar las diferentes estrategias de FES en todos los reactores.

5.3. Resultados y discusión

Conocidos los datos de los capítulos anteriores, los parámetros característicos para tener en cuenta en este apartado son principalmente la temperatura que alcanza el proceso y su máxima productividad de células viables y esporas. Por eso, en todas las estrategias se realizarán controles, es decir, experimentos con el digestato sin inocular con *Btk* para conocer el incremento de temperatura, sin inóculo añadido y el efecto de la variabilidad del digestato.

5.3.1. Crecimiento de *Btk* en reactores aislados térmicamente de 4.5-L

El principal objetivo de los experimentos fue determinar el efecto de la temperatura en el crecimiento de *Btk* utilizando reactores con aislamiento térmico de lecho compacto. El calor liberado debido a la actividad metabólica de los microorganismos se acumula en la matriz sólida derivando en un incremento de temperatura. Se realizó un experimento sin inoculación de *Btk* (reactor control) para obtener el perfil de temperatura durante la degradación del digestato que influirá en el crecimiento de *Btk*, que está altamente

condicionado por la temperatura alcanzada. La temperatura máxima alcanzada con digestato sin inoculación fue de 41.34°C (Figura 5.1a). Esto significa que la temperatura es superior al óptimo para el crecimiento de *Bt* que es de 30°, pero este valor es positivo porque crea condiciones estresantes para que el *Btk* pueda esporular.

En la Figura 5.1b (digestato inoculado con *Btk* a tiempo 0) se observa que la temperatura máxima se alcanza a las 20 h con un valor de 39.51±0.5°C manteniéndose alrededor de este valor durante todo el proceso. En este sentido, los resultados son positivos porque *Btk* tiene la capacidad, no solo de sobrevivir en la matriz sólida, sino también de resistir con la esporulación y, en consecuencia, aumentar el efecto biopesticida.

La Figura 5.1b muestra también el perfil sOUR obtenido en un reactor de 4.5-L inoculado con *Btk* durante 96 h, con un máximo a las 12 h de 3.67±0.17 mg O₂ g⁻¹MS h⁻¹; después de ese período, la actividad biológica disminuyó a valores por debajo de 1.06 mg O₂ g⁻¹MS h⁻¹. Simultáneamente, el reactor control (Figura 5.1a) mostró un perfil de sOUR con un valor de 3.12 mg O₂ g⁻¹MS h⁻¹ a las 12 h. Esto significa que el reactor inoculado con *Btk* tenía una actividad biológica de 1.18 veces la obtenida en el control. El COC de la fermentación control fue de 108.10 mg O₂ g⁻¹MS, mientras que el FES inoculado con *Btk* mostró un valor de 198.93±0.83 mg O₂ g⁻¹MS, un valor 1.84 veces superior en el control. Los resultados confirman un incremento en la actividad biológica asociada al crecimiento de *Btk* (Zhuang et al., 2011).

La Figura 5.1b también muestra la tendencia de las células viables y las esporas durante la fermentación. En los reactores de 4.5-L, el recuento de células viables inicial fue de 6.64±0.27 (10⁸) UFC g⁻¹ MS. La concentración de células viables se mantuvo más o menos constante durante el proceso con valores alrededor de 9.93±0.77 (10⁸) UFC g⁻¹ MS. Las esporas iniciales fueron 3.28±0.15 (10⁶) esporas g⁻¹ MS. Se observa un rápido crecimiento a las 48 horas, incrementándose ligeramente hasta las 96 horas, obteniendo un valor de esporas finales de 8.51±0.61 (10⁸) esporas g⁻¹ MS. Eso significa que la mayoría de las colonias están presentes en una forma esporulada que podría atribuirse a la baja presencia de carbohidratos y nitrógeno disponibles en el digestato al final de la fermentación, lo que podría reducir la fase de crecimiento exponencial (Yezza et al., 2006a). Otros autores como Ozcan et al. (2010) informaron que al usar medios sintéticos el mayor número de esporas alcanzadas fue de 2.0±0.6 (10⁸) esporas g⁻¹ MS en 96 h de tiempo de incubación, que es similar al observado en el presente estudio.

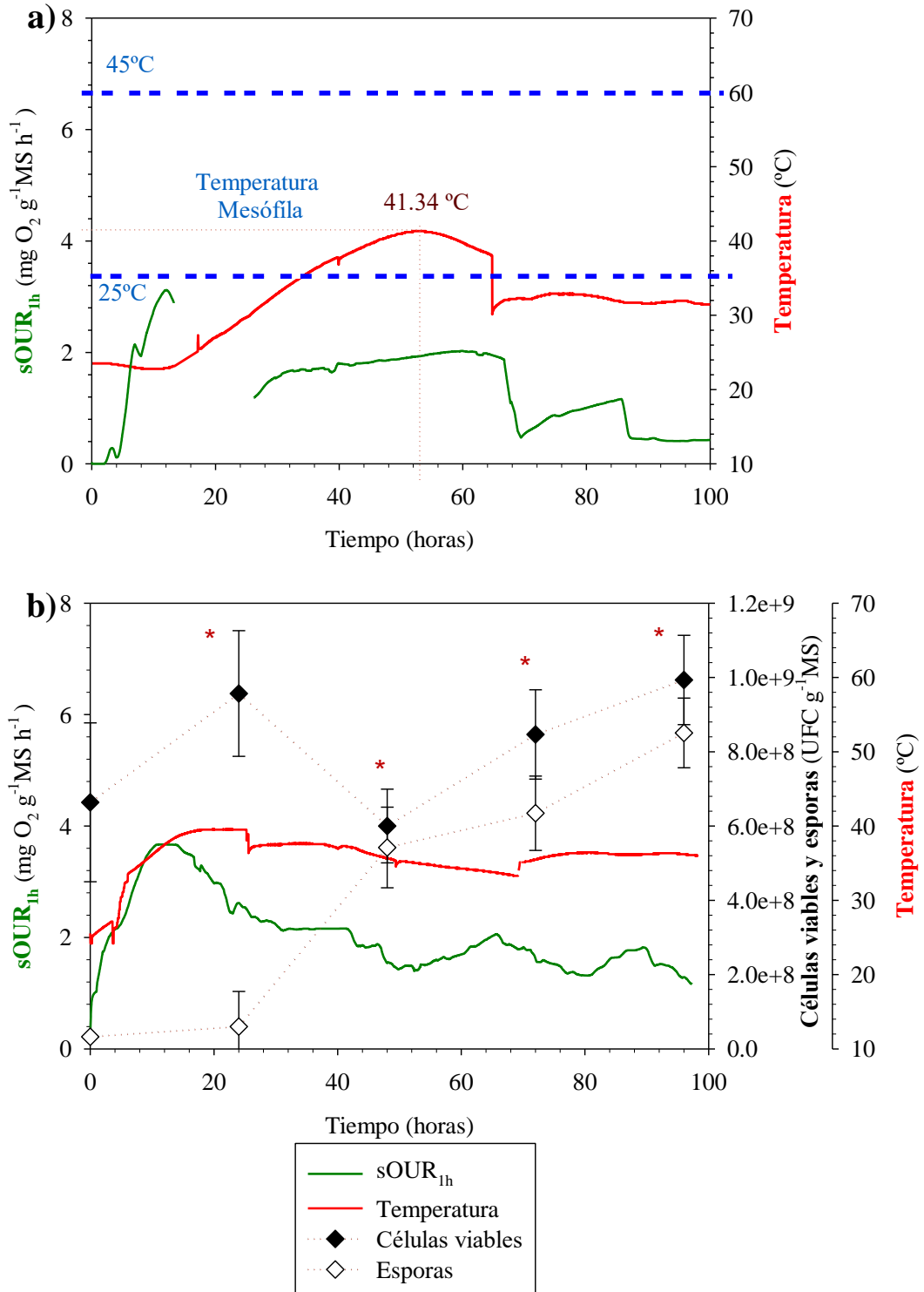


Figura 5.1. Perfil de sOUR, temperatura, células viables y esporas en el proceso de FES de digestato higienizado en un reactor aislado térmicamente de 4.5-L. Los puntos experimentales con un asterisco indican desviación alta ($p > 0.05$). Los valores representados corresponden a la media de 2 fermentaciones independientes. a) Reactor control. b) Reactor inoculado a las 0 h con *Btk*.

5.3.2. Estrategias de operación en reactores aislados térmicamente de 10-L para el crecimiento de *Btk*

5.3.2.1. Estrategia 1: Inoculación al comienzo del proceso de FES

Esta estrategia sigue los mismos criterios que la realizada en los reactores de 4.5-L, en relación con la cantidad de material y de inóculo. Además, los reactores de 4.5-L y de 10-L tienen las mismas características, por lo que se espera que muestren un mismo patrón con respecto al efecto de la temperatura, aunque en los reactores de 10-L se alcancen valores más elevados (mayor masa en la fermentación).

En la Figura 5.2a se observa la evolución de los parámetros de un control sin *Btk* para conocer la evolución del digestato utilizado. La temperatura máxima alcanzada es de 55.85°C que asciende rápidamente y se mantiene hasta las 50 horas del proceso aproximadamente en temperaturas termófilas. La máxima actividad biológica tiene una sOUR de 3.86 mg O₂ g⁻¹MS h⁻¹ que corresponde con la máxima temperatura alcanzada en el proceso, a partir de este momento la actividad comienza a disminuir de forma rápida como la temperatura, llegando a las 140 horas del proceso a un valor de sOUR de 0.98 mg O₂ g⁻¹MS h⁻¹ y una temperatura de 38.6°C. Esto implica que la actividad microbiana ha disminuido teniendo un material estable.

La Figura 5.2b muestra el perfil sOUR de los reactores inoculados con *Btk*, observándose dos picos. El primero se produjo a las 5 horas y el segundo a las 20 h, con un valor de alrededor de 3.80±0.72 mg O₂ g⁻¹MS h⁻¹ (4 h) y 5.07±0.69 mg O₂ g⁻¹MS h⁻¹ a las 20 h. Esto podría deberse a la existencia natural de otros microorganismos en el digestato, pero a medida que pasa el tiempo, *Btk* logra aclimatarse y comienza a crecer, produciendo el segundo pico. Luego, la sOUR disminuyó gradualmente con el tiempo y a las 96 horas alcanza un valor de 0.98±0.58 mg O₂ g⁻¹MS h⁻¹. Los valores obtenidos en el control solo muestran un pico con un valor de 3.86 mg O₂ g⁻¹MS h⁻¹ a las 17 horas del proceso de FES, disminuyendo hasta 96 horas con un valor final de 0.61 mg O₂ g⁻¹MS h⁻¹. Comparando el reactor inoculado con *Btk* y el control, se observa una mayor actividad en el reactor inoculado con *Btk*, que se atribuye al crecimiento de *Btk* en la matriz sólida. El oxígeno total consumido durante todo el proceso de fermentación fue de 190.09 mg O₂ g⁻¹MS en el control y 310.20±25.04 mg O₂ g⁻¹MS en el inoculado. De nuevo, esto implica que el consumo es mayor debido a la presencia de *Btk*, como se observó en otros estudios previos (Smitha et al., 2013).

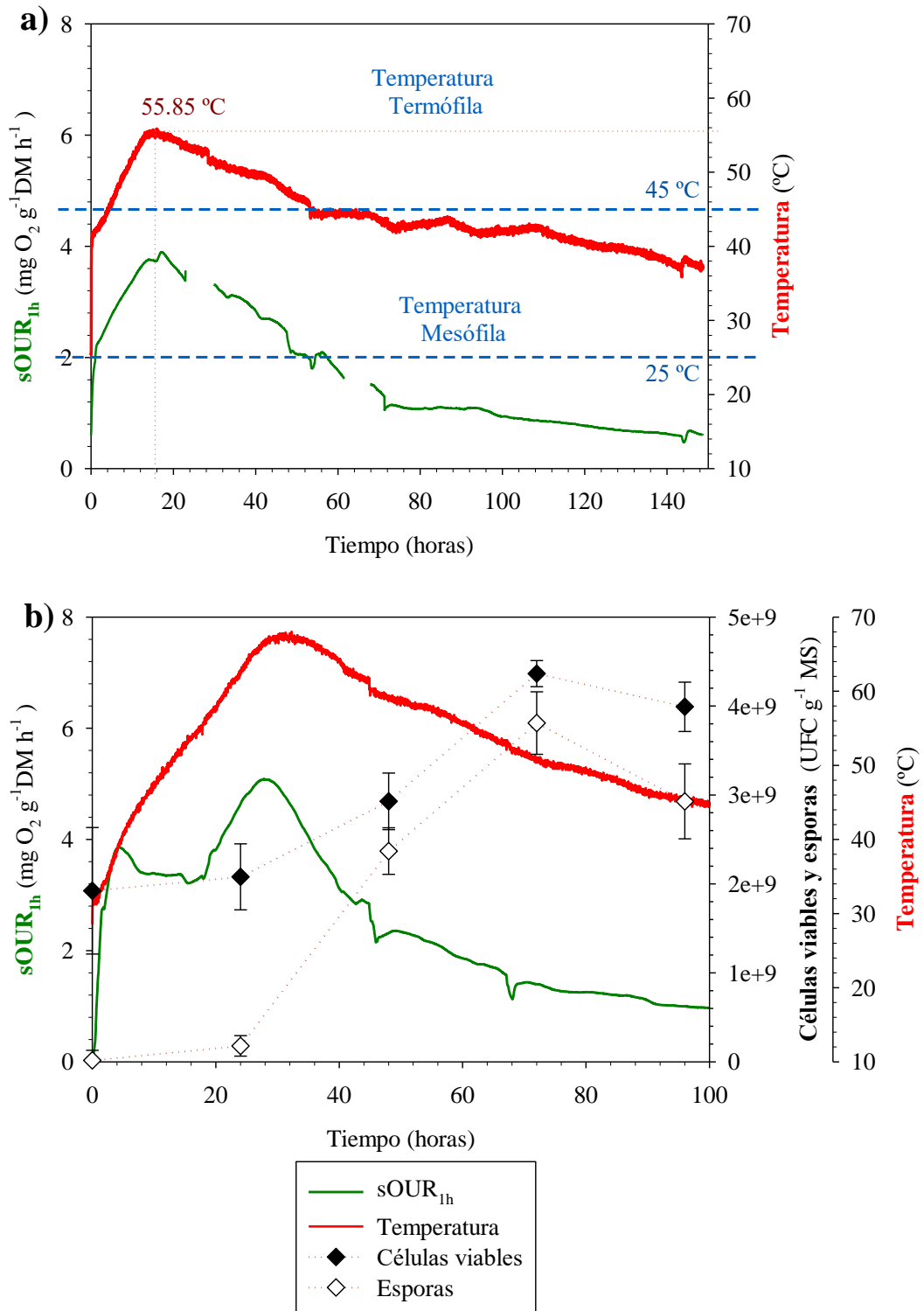


Figura 5.2. Estrategia 1: perfil de $sOUR$, temperatura, células viables y esporas en FES de digestato higienizado e inoculado a las 0 h con *Btk* en un reactor aislado térmicamente de 10-L. Los valores representados corresponden a la media de 2 fermentaciones independientes. a) Reactor control. b) Reactor inoculado a las 0 h con *Btk*.

Con respecto a las células viables y las esporas (Figura 5.2b), el comportamiento presentó la misma tendencia que en los reactores de 4.5-L. Los valores iniciales de células viables y esporas fueron $1.92 \pm 0.30 (10^9)$ UFC g^{-1} MS y $1.67 \pm 0.15 (10^7)$ esporas g^{-1} MS, respectivamente. Las células viables mostraron un perfil constante durante todo el proceso, a las 96 horas, el valor se mantuvo alrededor de $3.99 \pm 0.77 (10^9)$ UFC g^{-1} MS. En contraste, los valores de las esporas aumentaron rápidamente hasta 72 horas con un valor de $3.80 \pm 0.52 (10^9)$ esporas g^{-1} MS, que se mantuvo a las 96 horas con un valor de $2.92 \pm 0.61 (10^9)$ esporas g^{-1} MS. Este perfil de crecimiento de *Btk* puede deberse a la evolución de la temperatura o a la falta de nutrientes, lo que causó condiciones adversas que provocaron la esporulación de *Btk*. Como se observa, la temperatura se mantuvo en el rango termófilo durante todo el proceso (de 10 a 96 horas). Este aumento de temperatura se refleja tanto en un aumento en el consumo de oxígeno como en un aumento en las esporas de *Btk*. Después del máximo de temperatura, ésta comienza a disminuir coincidiendo con el consumo de oxígeno y crecimiento de esporas de *Btk*. Experimentos previos utilizando fibra de soja como sustrato (Ballardo et al., 2017) mostraron una disminución de *Bt* cuando se compararon con las células viables iniciales de la mezcla sólida. En ese caso, el valor inicial de las células viables fue de $9.5 (10^7)$ UFC g^{-1} MS y después de 20 días de fermentación se redujo a $1.8 (10^7)$ UFC g^{-1} MS, lo que representa una disminución en casi el 80% de las células viables, que se puede atribuir al aumentar la temperatura (Alvés et al., 1997).

El nivel de recuento de esporas obtenido en el presente estudio es comparativamente más alto que los reportados por un método económicamente más rentable para producir biopesticidas a base de *Btk*, utilizando lodos de aguas residuales como materia prima bajo FES (Zhuang et al., 2011). La mezcla de lodo y salvado de trigo dio el mayor rendimiento de células viables $5.98 \cdot (10^{10})$ UFC g^{-1} MS en los experimentos de Devi et al. (2005). Con residuos agrícolas o lodos se obtuvieron alrededor de células viables de 10^{10} UFC g^{-1} MS (Jouzani et al., 2015). En todos los trabajos comentados se utilizó un sustrato previamente esterilizado.

5.3.2.2. Estrategia 2: Inoculación a las 48 horas del proceso de FES

Esta estrategia se ha desarrollado para inocular *Btk* pasado el pico de temperatura termófila y así propiciar que *Btk* pueda colonizar toda la matriz sólida, creciendo a temperaturas a priori, más favorables.

Según el control de 10-L de digestato higienizado la temperatura máxima es de 55.85°C (Figura 5.2a), por lo que se decide inocular una vez se haya pasado la temperatura termófila (48h). Los resultados obtenidos se presentan en la Figura 5.3. La temperatura máxima se produce antes de inocular el *Btk* llegando a ser de 54.51±0.70°C. Posteriormente, existe un descenso de temperatura y sOUR debido a la inoculación de *Btk*, ya que el reactor necesita vaciarse para realizar un mezclado completo con el inóculo de *Btk*. A partir de ese punto, la temperatura comienza a aumentar de nuevo al igual que el sOUR obteniendo un máximo de actividad de 2.07±0.42 mg O₂ g⁻¹MS h⁻¹ a las 62 horas y a partir de ahí comienza a disminuir de forma lenta, probablemente debido al agotamiento de nutrientes llegando al final del proceso con valores de sOUR de 0.72±0.36 mg O₂ g⁻¹MS h⁻¹ y una temperatura de 39.8°C.

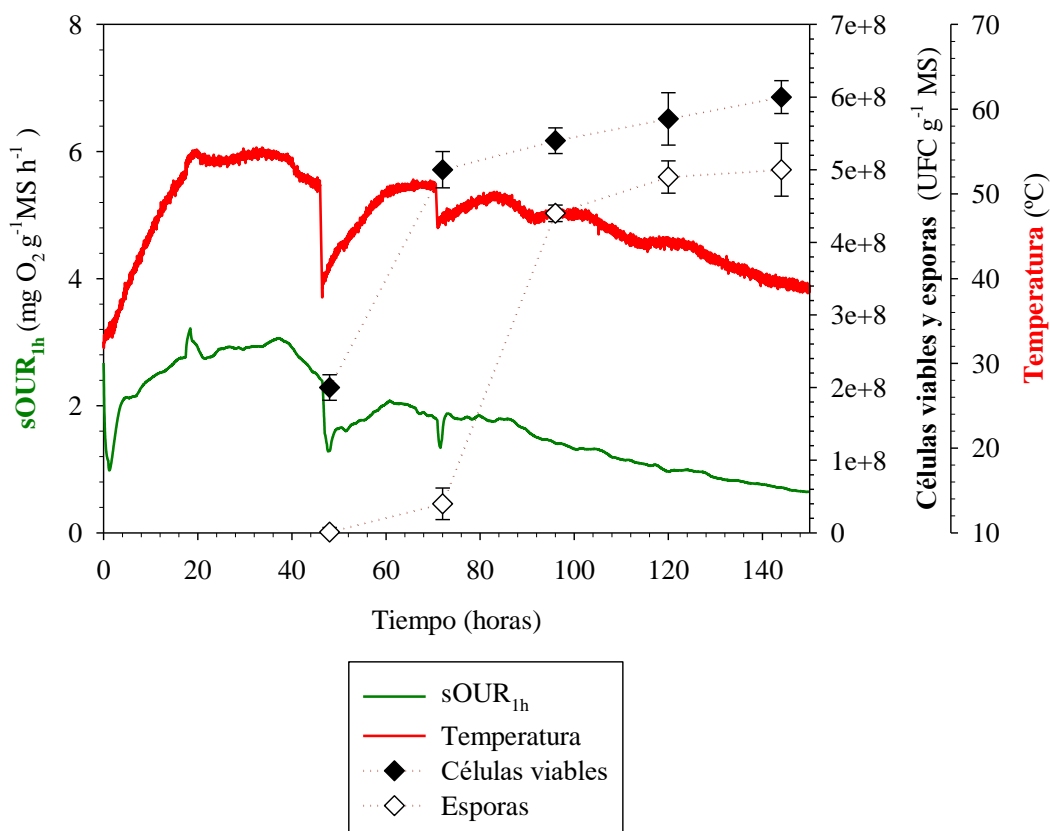


Figura 5.3. Estrategia 2: perfil de sOUR, temperatura, células viables y esporas en FES de digestato higienizado e inoculado a las 48 horas con *Btk* en un reactor aislado térmicamente de 10-L. Los valores representados corresponden a la media de 2 fermentaciones independientes.

Si se compara con el control los valores máximos de sOUR y temperatura cuando se inocula *Btk* son inferiores con valores de 0.54 y 0.91. En cambio, el proceso completo de FES incrementa el COC hasta 1.1 veces con respecto al control, siendo los valores de COC del control y el inoculado de *Btk* de 190.09 y 209.25 ± 35.36 mg O₂ g⁻¹MS, respectivamente.

En la Figura 5.3 se observan las células viables y esporas a partir de las 48 horas, momento de la inoculación. Los valores iniciales de colonias fueron de 2.00 ± 0.74 (10⁸) UFC g⁻¹ MS, ascienden de forma rápida las primeras 24 horas después de la inoculación (72 horas del proceso de FES) y a partir de ahí aumentan de forma lenta hasta un valor de 6.00 ± 0.24 (10⁹) UFC g⁻¹ MS incrementándose 3 veces respecto al valor inicial. En cambio, las esporas siguen un comportamiento diferente, al comienzo de la inoculación se carece de esporas, y a las 48 horas de la inoculación (96 horas del proceso de FES) se observa un fuerte incremento hasta 4.40 ± 0.14 (10⁸) esporas g⁻¹ MS. Esta esporulación se debe posiblemente a la falta de nutrientes para que el *Btk* siga creciendo, siendo su valor final de 50 veces superior a la inicial. A la hora de determinar las células viables y las esporas en las placas estos valores resultaron complejos y en más de una ocasión difícil de cuantificar debido a la cantidad de microorganismos presentes en el digestato.

El digestato es un sustrato con diversidad de microorganismos y, cuando se somete a un proceso de FES, aquellos que mejor se adaptan a las condiciones del proceso consiguen desarrollarse. En el momento de inocular *Btk*, es decir a las 48 horas, ya existen otros microorganismos más desarrollados que han ido consumiendo gran parte de los nutrientes, haciendo difícil la adaptación de *Btk*. En la Figura 5.4 se pueden observar las placas de conteo de colonias correspondientes al inicio de inoculación de *Btk* a las 48 horas del proceso de FES en el digestato (Figura 5.4a y 5.4b), tanto de células viables como esporas donde resulta complejo determinar el *Btk* debido a la presencia de otras colonias de microorganismos. Pasadas las 24 horas de su inoculación, 72 horas del proceso de FES, se puede observar que la mayor parte de colonias en las placas son de células viables de *Btk* (Figura 5.4c) y concentración de esporas de *Btk* (Figura 5.4d). De esta fermentación se realizó un análisis microbiológico que se encuentra detallado en el Anexo I de esta tesis, y estudiado en el apartado 5.3.8 de este capítulo.

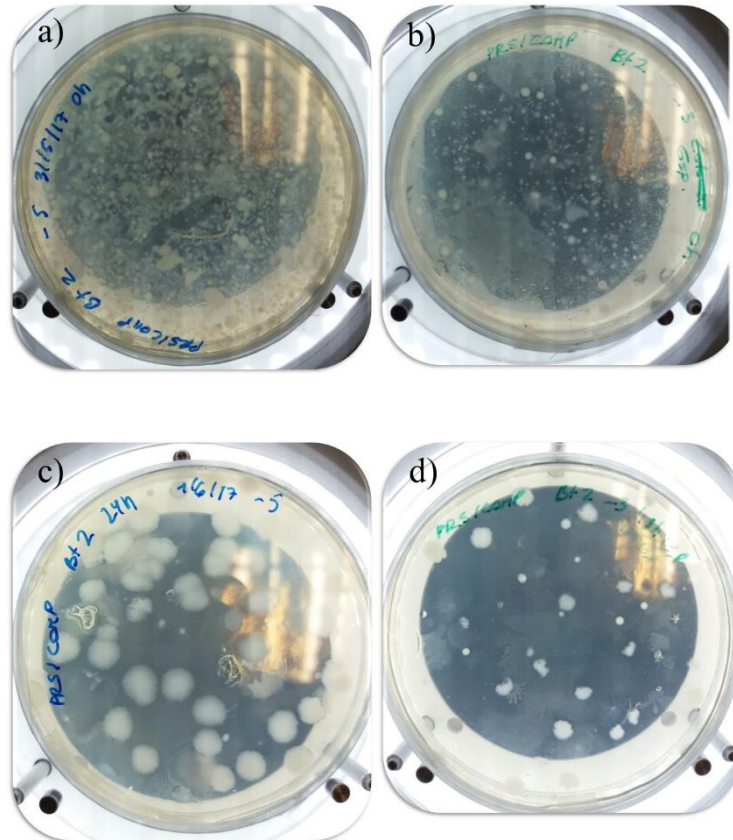


Figura 5.4. Placas petri para determinación de células viables y esporas del proceso de FES inoculando *Btk* a las 48 horas del proceso. a) Placas petri de células viables en el momento que se inocula *Btk* en el digestato. b) Placas petri de esporas en el momento que se inocula *Btk* en el digestato. c) Placas Petri de células viables a las 24 horas de inocular *Btk* (72 horas del proceso de FES). d) Placas Petri de esporas a las 24 horas de inocular *Btk* (72 horas del proceso de FES).

Si se compara esta estrategia con la Estrategia 1, los valores de temperatura disminuyen ayudando a que el valor de colonias se incremente 1.6 veces con respecto a la estrategia 1, pero el valor de esporas disminuye hasta 3.4 veces lo cual disminuye la cantidad de cristal proteico con acción biopesticida. De esta forma se descarta la Estrategia 2 como una estrategia para la producción de biopesticida a partir de *Btk*.

5.3.2.3. Estrategia 3: Variación de la cantidad de inóculo en el proceso de FES

En este caso, como se muestra en la Figura 5.5 el valor de actividad biológica aumentó lentamente en comparación con otras estrategias alcanzando un valor de sOUR de $2.23 \pm 0.15 \text{ mg O}_2 \text{ g}^{-1} \text{MS h}^{-1}$ hasta las 22 horas, en ese punto se incrementa rápidamente hasta un valor de sOUR de $4.09 \pm 0.54 \text{ mg O}_2 \text{ g}^{-1} \text{MS h}^{-1}$ a las 30 horas del proceso y después cae rápidamente hasta el final del proceso a $0.87 \pm 0.14 \text{ mg O}_2 \text{ g}^{-1} \text{MS h}^{-1}$. Este incremento se puede explicar con el aumento ligero que se produce de células viables y en consecuencia a partir de las 48 horas éstas disminuyen, produciéndose la esporulación.

En esta estrategia la temperatura se mantiene a partir de las 40 horas alrededor de su temperatura máxima, $42.95 \pm 0.90^\circ\text{C}$, siendo 0.77 veces inferior al control. El COC consumido a lo largo del proceso fue de $287.70 \pm 15.20 \text{ mg O}_2 \text{ g}^{-1} \text{MS}$, inferior al que se produce cuando se utiliza el inóculo de una ratio de $0.0030 \text{ g Bt g}^{-1} \text{ digestato}$. Si se comparan con el control (Figura 5.4) éstos son ligeramente superiores, concretamente el valor de sOUR y COC es de 1.07 y 1.21 veces superior al control, debido a la actividad de *Btk*.

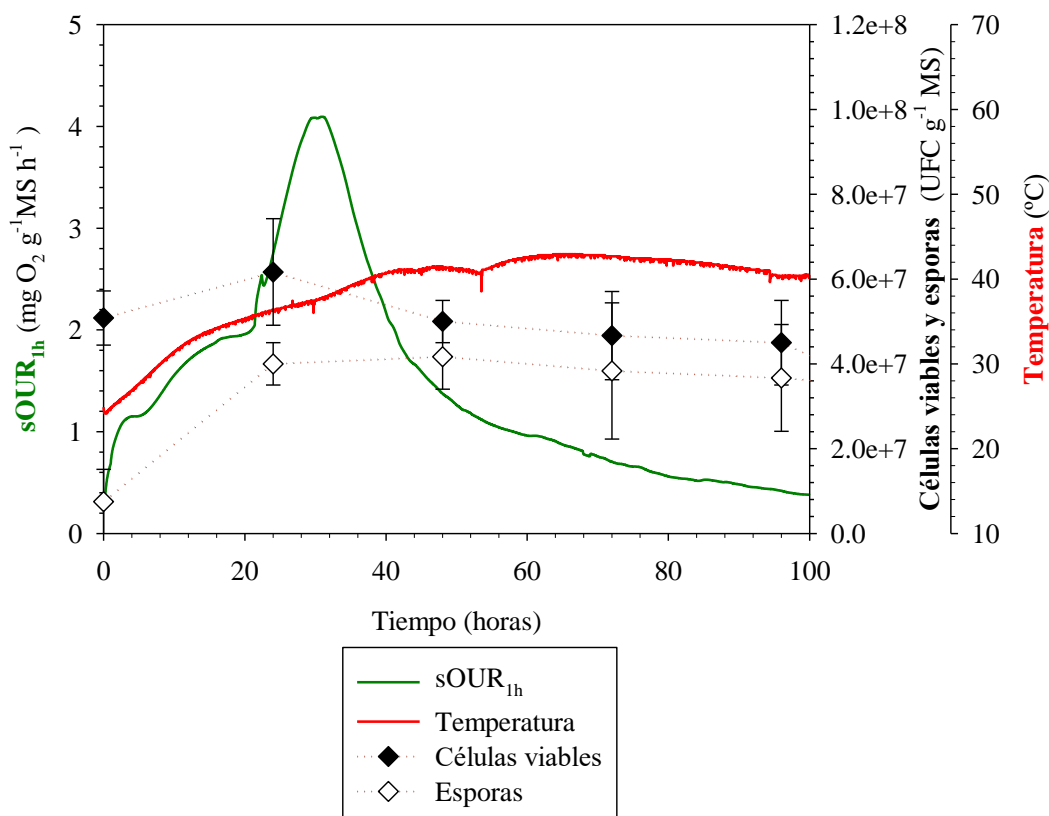


Figura 5.5. Estrategia 3: perfil de sOUR, temperatura, células viables y esporas en FES de digestato inoculado con $0.0015 \text{ g Bt g}^{-1} \text{ digestato}$ higienizado a las 0 h en un reactor aislado térmicamente de 10-L. Los valores representados corresponden a la media de 2 fermentaciones independientes.

En la Figura 5.5 se puede observar cómo los valores de células viables al comienzo de la fermentación fueron de $5.08 \pm 0.64 (10^7) \text{ UFC g}^{-1} \text{ MS}$, detectándose un pequeño incremento a las 24, pero disminuyendo hasta un valor final de $4.50 \pm 0.10 (10^7) \text{ UFC g}^{-1} \text{ MS}$. En cambio, las esporas comienzan con un valor de $7.05 \pm 0.76 (10^6) \text{ esporas g}^{-1} \text{ MS}$ y estas comienza a aumentar desde el primer momento, de ahí que se explique el menor

valor de células viables, pues todas las existentes comienzan a esporular, teniendo su máximo a las 48 horas de $4.16 \pm 0.76 (10^7)$ esporas g^{-1} MS, manteniéndose estable hasta el final. Por lo que, las células viables se reducen hasta 0.89 y las esporas se incrementan 5.20, esto puede deberse al agotamiento de nutrientes, por lo que las células viables existentes comienzan a esporular, disminuyendo el número de células viables y aumentando el de esporas.

Si se comparan los valores de la Estrategia 3 con la Estrategia 1, estos valores son inferiores a los que se producen con una ratio de inóculo de $0.0030 g Bt g^{-1}$ digestato, siendo en la Estrategia 1 de 2.1 veces superior el incremento de células viables y de 33 veces superior el incremento de esporas. Esta información será útil para estudiar la inoculación de reactor de 100-L en el momento del escalado del proceso cuando las necesidades de inóculo serán mayores. Zou et al. (2016) evaluaron la proporción de inóculo, indicando que cuanto mayor sea el tamaño del inóculo más rápido se degrada el azúcar reductor, estableciendo que no necesariamente a mayor cantidad de inóculo se produce una mayor cantidad de toxina, pero si es necesaria una cantidad apropiada porque el *Bt* entra en competición con otros microorganismos.

5.3.2.4. Estrategia 4: Variación de la cantidad de sustrato en el proceso de FES

La estrategia 4 tiene por objetivo evitar las altas temperaturas que se producen en este tipo de reactor, para disminuirlas se deja un espacio libre en el reactor que permita el paso de aire a través de la matriz sólida disminuyendo la temperatura. Con esta estrategia se quiere observar si la cantidad de células viables, y en consecuencia de esporas, se incrementa al final del proceso de FES, ayudando a incrementar la cantidad de cristal proteico.

En la Figura 5.6a se muestra un control sin inocular *Btk* con la mitad de material, es decir de 1.5 kg en un reactor de 10-L. La máxima temperatura fue de $37.31^{\circ}C$ manteniéndose en el rango mesófilo durante todo el proceso. Este control presenta una temperatura inferior a los controles analizados anteriormente debido a que la cantidad de sustrato en el reactor es la mitad y la actividad biológica disminuye con un sOUR de $1.09 mg O_2 g^{-1} MS h^{-1}$. En la Figura 5.6b, digestato inoculado con *Btk*, se distingue un pico de sOUR discreto de $1.18 \pm 0.75 mg O_2 g^{-1} MS h^{-1}$ produciéndose a las 12 horas del proceso de FES, y posteriormente este se incrementa ligeramente a las 72 horas con un valor de sOUR de $1.14 \pm 0.28 mg O_2 g^{-1} MS h^{-1}$, a partir de ahí disminuye hasta el final del proceso

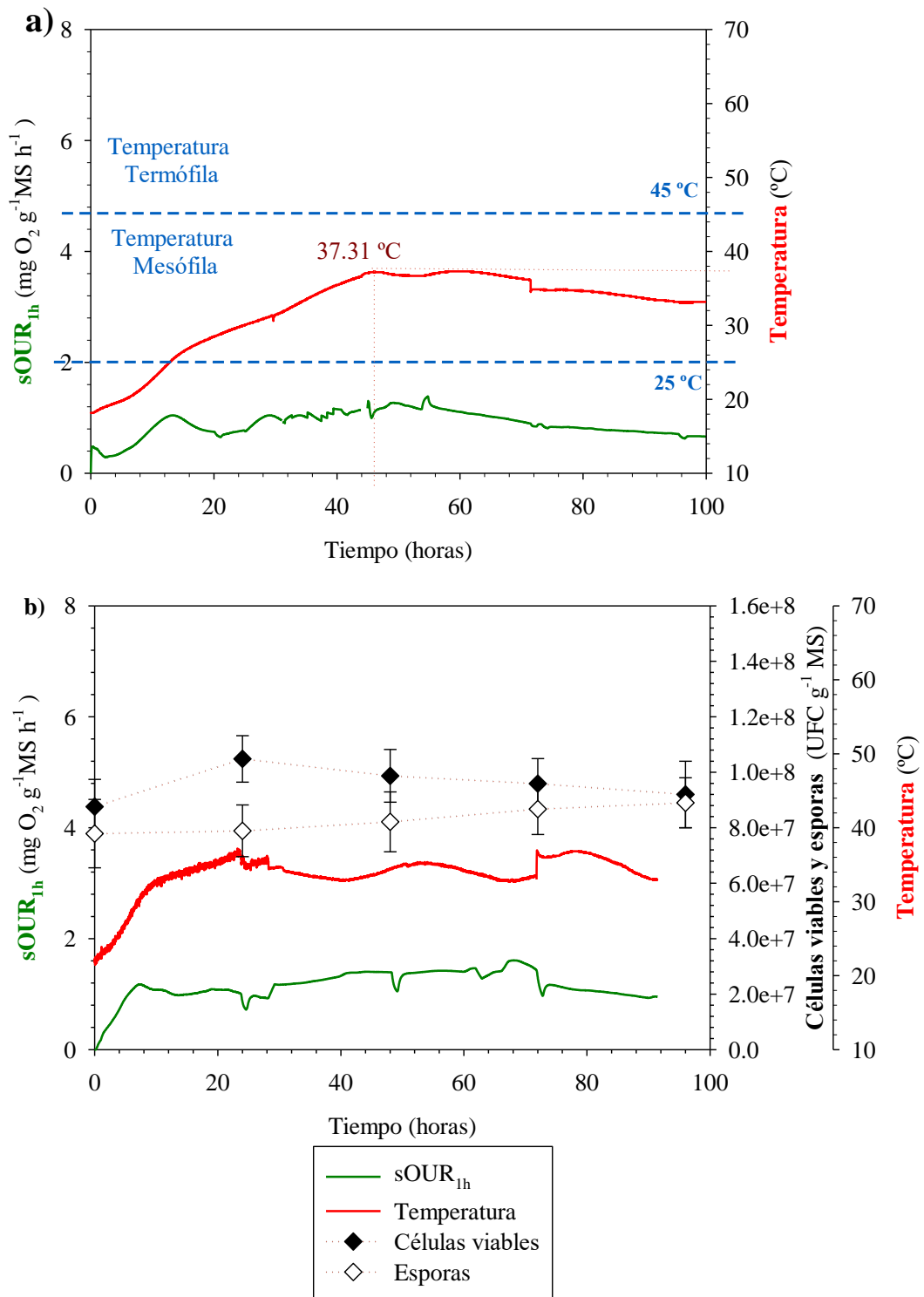


Figura 5.6. Estrategia 4: perfil de sOUR, temperatura, células viables y esporas en FES de digestato higienizado en reactores aislados térmicamente de 10-L con 1.5 kg de sustrato. Los valores representados corresponden a la media de 2 fermentaciones independientes. a) Reactor control. b) Reactor inoculado a las 0 h con *Btk*.

. El COC en la fermentación fue de 87.70 ± 12.10 mg O₂ g⁻¹MS para el reactor inoculado con *Btk*, mientras que el del control fue de 69.25 mg O₂ g⁻¹MS. La temperatura es igual al control de 36.95 ± 0.50 °C. Uno de los objetivos a conseguir, es que la temperatura no alcance el rango termófilo, así en el gráfico ésta fluctúa durante todo el proceso entre valores de 33 y 38°C, lo cual favorece la colonización de la matriz sólida por *Btk*, ya que su temperatura óptima de crecimiento es de 30°C. Comparándolo con el control sin inocular *Btk* se observan unos incrementos de sOUR y COC de 1.08 y 1.27 veces respectivamente en el reactor inoculado.

En la Figura 5.6b también se muestran la evolución de células viables y esporas durante todo el proceso, y esos incrementos producidos de sOUR, temperatura y COC se relacionan con la actividad microbiológica de *Btk*. Al comienzo de la fermentación los valores de células viables y esporas son de 8.76 ± 0.98 (10^7) UFC g⁻¹ MS y 7.78 ± 0.12 (10^7) esporas g⁻¹ MS. Los valores de células viables se incrementan ligeramente hasta un máximo de 1.05 ± 0.83 (10^8) UFC g⁻¹ MS a las 24 horas, comenzando a disminuir hasta el final del proceso.

Las esporas aumentan de forma paulatina incrementándose al final del proceso con un valor de 8.90 ± 0.90 (10^7) esporas g⁻¹ MS, estos valores son inferiores a los que se producen en otras estrategias, aunque tanto las células viables como las esporas se incrementan en 1 y 1.1, respectivamente, observando una esporulación al final del proceso del 97 %.

Si se compara con la Estrategia 1, los valores de células viables y esporas son superiores en la Estrategia 1 con valores de 1.9 veces de incremento de células viables y de 152.3 veces el incremento de esporas.

5.3.2.5. Comparación de estrategias

La Tabla 5.2 resume los valores de los parámetros del proceso obtenidos de cada una de las estrategias analizadas. Además, la Figura 5.7 analiza los incrementos de células viables y esporas a lo largo de la fermentación (final respecto al inicial de células viables y esporas) para cada una de las estrategias. Se observa que el mayor incremento de esporas se produce con la Estrategia 1 con un valor de 174.3. En cambio, el mayor incremento de células viables se produce con la Estrategia 2 hasta 3 veces más que la inicial.

Como el efecto biopesticida ha sido asociado a la producción de esporas se realiza una comparación de cada una de las estrategias estudiadas con la Estrategia 1, donde el

incremento de esporas es superior y se espera, por tanto, una mayor cantidad de cristales proteicos que son los que tienen el efecto biopesticida (Zhuang et al., 2011). Como ya se ha comentado el incremento de células viables en la Estrategia 2 (inoculando *Btk* a las 48 horas) es de 1.6 veces superior respecto al incremento que se produce con la Estrategia 1. Pero, el valor de esporas en la Estrategia 2 es de 0.3 veces menos que la Estrategia 1. En la Estrategia 3 (reduciendo la cantidad de inóculo de *Btk* a 0.015 g *Bt* g⁻¹ digestato) los incrementos de células viables como de esporas son inferiores a los de la Estrategia 1, esto puede ser debido a la existencia de otros microorganismos en mayor cantidad en el digestato impidiendo un crecimiento de células viables de *Btk* superior, promoviendo a las existentes a esporular, incrementando el valor de esporas hasta 5.2 veces, ya que es su forma de resistencia. Por lo que esta estrategia puede ser óptima para el escalado en un reactor de 100-L en el cual la cantidad de inóculo inicial podría ser inferior.

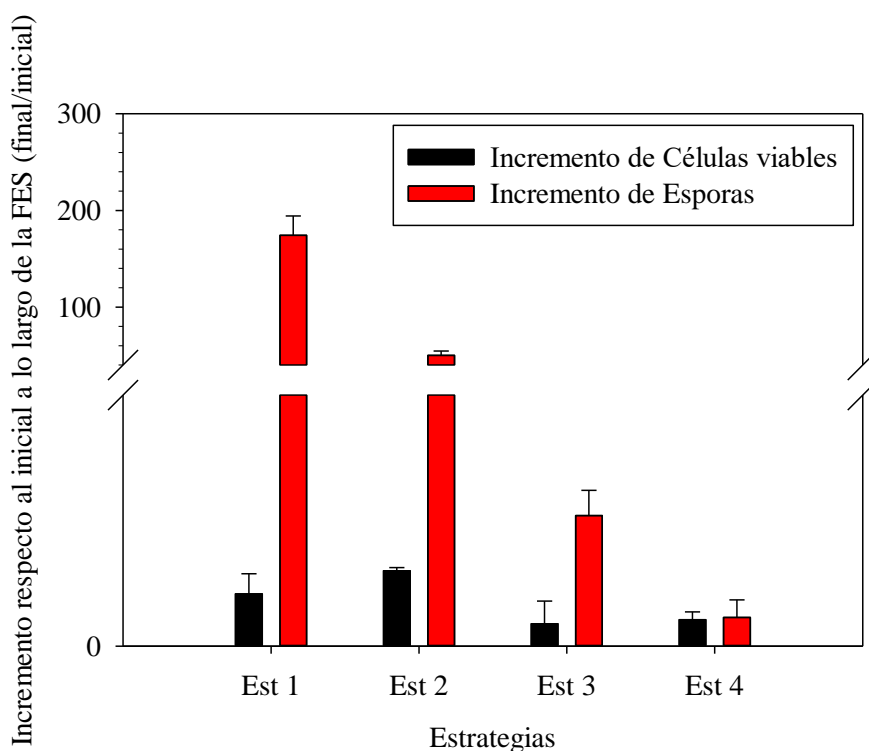


Figura 5.7. Incremento de células viables y esporas de las diferentes estrategias estudiadas en los reactores aislados térmicamente de 10-L.

La última estrategia analizada es la Estrategia 4, de ella se obtienen valores de células viables y esporas inferiores a los que se consiguen cuando se utiliza la Estrategia 1,

aunque el valor de temperatura es inferior. Por eso, esta Estrategia 4 indica que se puede trabajar con menor cantidad de material para evitar las temperaturas termófilas, pero se deberá suplementar el digestato con mayor cantidad de nutrientes. Una de las formas puede ser utilizar un sustrato con mayor porcentaje de materia fácilmente biodegradable como, por ejemplo, un sustrato mixto de digestato y FORM higienizada para que *Btk* tenga los nutrientes necesarios para incrementar su producción. Esta estrategia será utilizada en el Capítulo 7 de esta tesis para comprobar si la hipótesis de utilizar un sustrato con mayor cantidad de materia fácilmente biodegradable incrementa la producción de *Bt*.

Los porcentajes de esporulación que se producen al final del proceso también son un indicador de un buen bioproducto con efecto biopesticida a partir de digestato, ya que el cristal proteico habrá sido liberado cuando las células viables liberan las esporas (Soberón y Bravo, 2007). En todas las estrategias los valores de esporulado que se producen van del 97 al 73%, por lo que se puede decir que el bioproducto conseguido con digestato puede tener un buen efecto biopesticida. En otros estudios con aguas residuales se llegan a porcentajes de esporulación del 88.2 %, similares a los conseguidos con la primera estrategia (Zhuang et al., 2011).

En la Tabla 5.2 se muestran en las dos últimas filas la relación de incrementos entre células viables y esporas con respecto a la Estrategia 1, es decir valor de incremento de células viables de la Estrategia 1 dividido entre el incremento de células viables de la Estrategia 2. Así se puede observar que el incremento en todos los casos es superior en la Estrategia 1.

Tabla 5.2. Principales parámetros del proceso de FES para cada una de las estrategias estudiadas (valores finales a las 96h).

Parámetro	Unidades	Estrategia 1	Estrategia 2	Estrategia 3	Estrategia 4
Cantidad muestra	(kg)	3.5	3.5	3.5	1.5
Tiempo de inoculación	(h)	0	48	0	0
Ratio inóculo	(g <i>Bt</i> g ⁻¹ digestato)	0.0030	0.0030	0.0015	0.0030
Duración proceso	(días)	4	6	4	4
Humedad inicial	(%, bh)	67.0±0.2	62.5±0.4	65.9±0.3	59.1±0.8
Humedad final	(%, bh)	69.9±0.8	71.9±0.7	67.0±0.2	67.2±0.7
Materia orgánica inicial	(%, bh)	75.0±0.5	60.3±0.7	64.3±0.2	77.5±0.5
Materia orgánica final	(%, bh)	61.0±0.7	65.0±0.5	55.8±0.9	60.3±1.5
pH inicial (1:5)	-	8.85±0.01	8.83±0.01	8.90±0.01	8.23±0.01
pH final (1:5)	-	8.76±0.01	8.81±0.01	8.72±0.01	8.84±0.01
CE inicial	(mS cm ⁻¹)	1.92±0.01	1.84±0.01	1.93±0.01	2.84±0.01
CE final	(mS cm ⁻¹)	2.15±0.01	2.10±0.01	2.32±0.01	2.07±0.01
Cantidad de material	(kg)	3.5	3.5	3.5	1.5
sOURmax	(mg O ₂ g ⁻¹ MS h ⁻¹)	5.07±0.69	2.07±0.42	4.09±0.54	1.15±0.28
COC	(mg O ₂ g ⁻¹ MS)	310.20±25.04	209.25±35.36	287.71±15.20	87.70±12.10
Tmáx	(°C)	68.80±0.50	50.93±0.50	42.95±0.90	36.95±0.80
Células viables iniciales	(UFC g ⁻¹ MS)	1.92±0.30·(10 ⁹)	2.00±0.74·(10 ⁸)	5.08±0.64·(10 ⁷)	8.75±0.98·(10 ⁷)
Células viables finales	(UFC g ⁻¹ MS)	3.99±0.77·(10 ⁹)	6.00±0.24·(10 ⁸)	4.50±0.10·(10 ⁷)	9.20±0.12·(10 ⁸)
Esporas iniciales	(esporas g ⁻¹ MS)	1.67±0.15·(10 ⁷)	1.00±0.64·(10 ⁷)	7.50±0.76·(10 ⁸)	7.78±0.12·(10 ⁷)
Esporas finales	(esporas g ⁻¹ MS)	2.92±0.61·(10 ⁹)	5.00±0.36·(10 ⁸)	3.66±0.76·(10 ⁹)	8.90±0.90·(10 ⁷)
Esporulación	(%)	73	83	81	97
Incremento células viables	-	2.08±0.80	3.00±0.12	0.89±0.09	1.05±0.31
Incremento esporas	-	174.33±20.00	50.00±4.50	4.89±1.00	1.14±0.70
Relación células viables	-	-	0.69	2.34	1.98
Relación esporas	-	-	3.49	35.66	152.53

5.3.3. Estrategia 5: Operación secuencial por lotes en reactores de 0.5-L y 10-L

5.3.3.1. Reactores de 0.5-L (escala laboratorio)

El resultado obtenido de la operación secuencial en reactores de 0.5-L se presenta en las Figuras 5.8 y 5.9. Se realizaron 4 lotes secuenciales (12 días de operación) como se observa en la Figura 5.8, mostrando los valores de células viables y esporas al final de cada lote. La fermentación inicial fue de 72 horas, donde se alcanza un promedio máximo de sOUR de $1.7 \pm 0.1 \text{ mg O}_2 \text{ g}^{-1} \text{ MS h}^{-1}$, para los siguientes tres lotes se tuvieron unos valores de máximos estables de sOUR, siendo de $1.5 \pm 0.1 \text{ mg O}_2 \text{ g}^{-1} \text{ MS h}^{-1}$, $1.4 \pm 0.2 \text{ mg O}_2 \text{ g}^{-1} \text{ MS h}^{-1}$ y $1.8 \pm 0.3 \text{ mg O}_2 \text{ g}^{-1} \text{ MS h}^{-1}$ en el segundo, tercer y cuarto lote, respectivamente. El valor del COC al final de la fermentación (12 días) de $45.5 \pm 0.5 \text{ mg O}_2 \text{ g}^{-1} \text{ MS}$.

Al realizar una producción por lotes se busca el total de células viables y esporas al final de la fermentación, es decir, al sumatorio de cada cantidad de células viables y esporas de cada lote. Esto quiere decir que la cantidad de células viables y esporas que se producen es la suma de todas las células viables y esporas producidas por cada uno de los lotes. Para ello, además de realizar un seguimiento de la cantidad que se produce en cada lote, se realiza un balance de material (células viables y esporas) para comprobar si se incrementa la producción de *Bt*. En este caso, cuando se acaba el primer lote el 50% de material fermentado se retira y el otro 50% se mantiene en el reactor mezclándolo con otro 50% de material fresco. Así, se puede evaluar la cantidad de células viables y esporas totales de la fermentación a partir de la materia seca y la cantidad de muestra en el reactor, 42% y 120 g. Como se puede ver en la Figura 5.9, las fermentaciones comenzaron con un número de células viables de $5.52 \pm 0.02 (10^8) \text{ UFC g}^{-1} \text{ MS}$ y al final del primer lote las células viables disminuyen hasta $3.44 \pm 0.15 (10^8) \text{ UFC g}^{-1} \text{ MS}$, es decir 0.7 veces la inicial pudiendo deberse a la limitación de los nutrientes en el digestato. Mientras, el perfil de esporas se incrementa en este primer lote hasta un valor de $5.05 \pm 0.45 (10^8) \text{ esporas g}^{-1} \text{ MS}$, es decir, el *Btk* adquiere su forma resistente como espora para mantener su supervivencia en la matriz sólida (Khedher et al., 2011).

La cantidad de células viables totales iniciales es de $2.78 \pm 0.28 (10^{10}) \text{ UFC}_T$ y de esporas totales de $2.26 \pm 0.52 (10^{10}) \text{ esporas}_T$. Los valores de células viables y esporas se mantienen constantes al final de cada lote como se muestra en la Figura 5.8. El cálculo

de balance de material de células viables y esporas totales dan como resultado valores de $4.25 \pm 0.58 (10^{10})$ UFC_T y $5.52 \pm 0.92 (10^{10})$ esporas_T, respectivamente. Indicando que con un Sistema de fermentación I se obtiene una producción de células viables y esporas de *Btk* de 1.53 y 2.44 veces la inicial de la fermentación. Si se compara con el proceso a escala laboratorio de digestato higienizado (resultados del Capítulo 4, apartado 4.3.2) el valor de células viables y esporas totales son de $3.03 \pm 0.98 (10^9)$ UFC_T y $9.60 \pm 1.42 (10^8)$ esporas_T, inferiores al que se produce con la estrategia SBR.

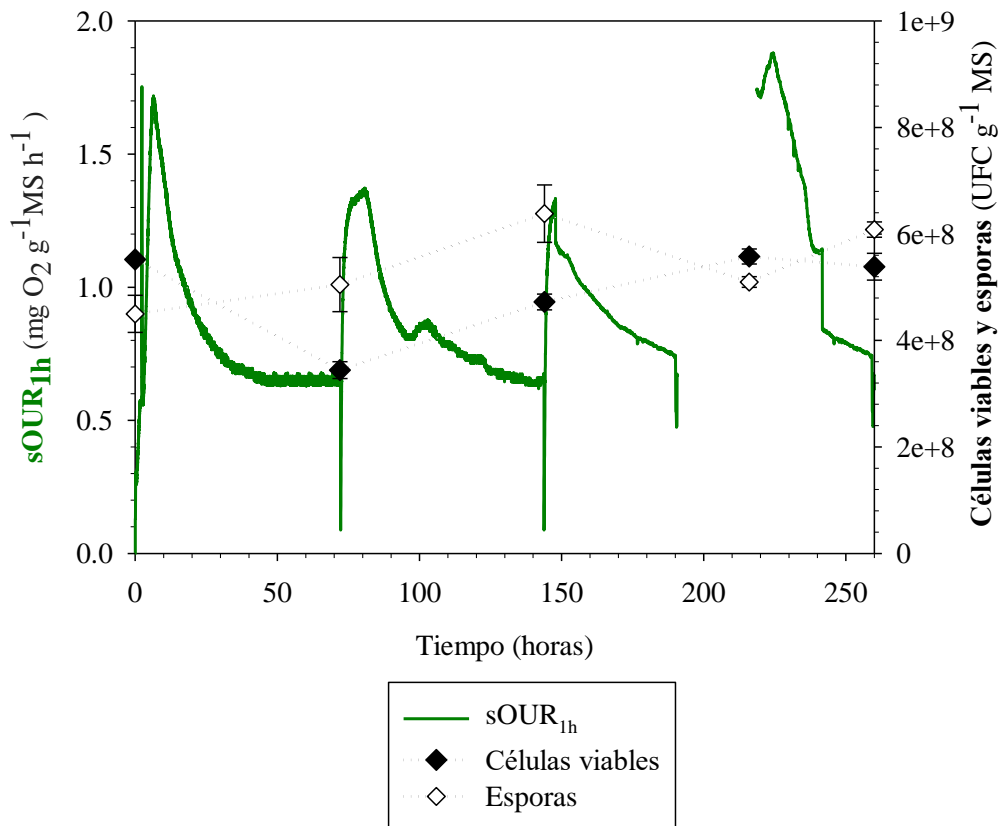


Figura 5.8. Perfil de sOUR, células viables y esporas de la estrategia SBR para la producción de biopesticida a partir de *Btk* como inóculo y digestato como el sustrato en el proceso de FES en reactores de 0.5-L (escala de laboratorio). Los valores representados corresponden a la media de 2 fermentaciones independientes.

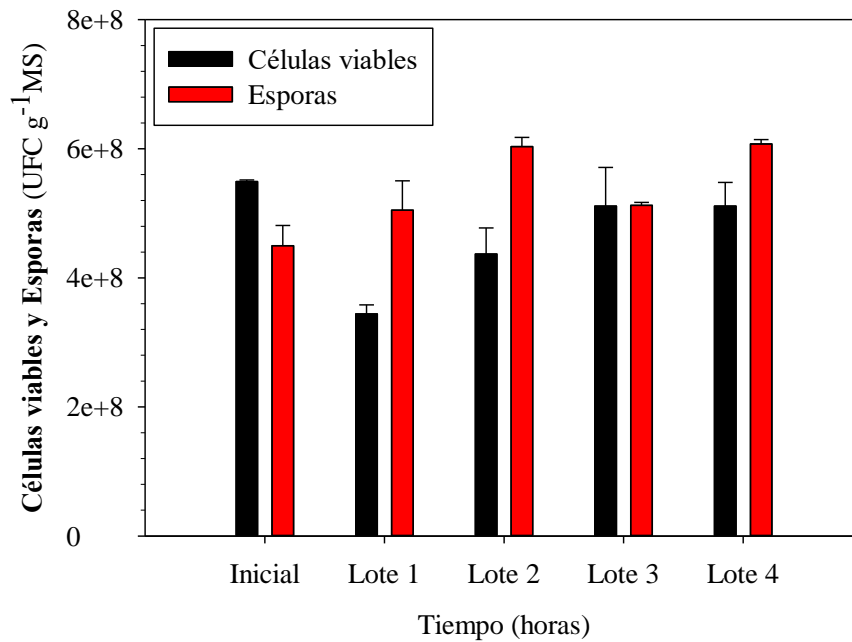


Figura 5.9. Promedio de células viables y esporas finales de cada lote observados durante la estrategia SBR para la producción de biopesticida a partir de *Btk* como inóculo y digestato como el sustrato en el proceso de FES en los reactores de 0.5-L (escala laboratorio).

Concluyendo que el *Btk* es capaz de colonizar y sobrevivir en estas condiciones haciendo posible una operación por lotes secuencial para la producción de biopesticidas utilizando digestato como único sustrato. Además, permite no solo la producción continua de un sólido fermentado enriquecido con *Btk*, sino también evitar la continua producción de inóculo por FmS.

Estas condiciones operativas, aún no han sido optimizadas, sin embargo, esta relación de intercambio ha demostrado ser útil en operaciones de SBR similares para la generación de otros bioproductos (Cerde et al., 2017a). Yezza et al. (2005) estudiaron la producción por lotes de *Bt* con lodos de aguas residuales en fermentación sumergida donde se observaron incrementos de esporas de 5.62 (10^8) hasta 8.6 (10^8) esporas mL⁻¹ de más de un 150%.

5.3.7.2. Reactores aislados térmicamente de 10-L: Operación por lotes secuenciales

Conocidos los resultados de las estrategias en reactores de 10-L y la evidencia de datos satisfactorios para la producción por lotes de biopesticida a partir de *Btk* en reactores de

0.5-L se decide aplicar la misma estrategia en los reactores aislados térmicamente de 10-L, en los cuales la temperatura no está controlada y puede ser uno de los factores clave para el desarrollo del *Btk*.

La Figura 5.10 muestra la evolución del proceso SBR en el que se puede observar cuatro picos diferenciados en los perfiles de sOUR y temperaturas correspondientes a cada uno de los lotes. El primer pico muestra una sOUR máxima de $7.26 \pm 0.32 \text{ mg O}_2 \text{ g}^{-1} \text{ MS h}^{-1}$ a las 12 horas del proceso, y con éste un incremento rápido de temperatura hasta 68.53°C que después comienza a disminuir, tal y como ocurría en la Estrategia 1. A las 72 horas del proceso se inicia el segundo lote, dejando el 50% de material ya fermentado mezclándose con otro 50% de digestato higienizado fresco. En este momento los valores de células viables y esporas al mezclarse con digestato higienizado fresco disminuyen hasta $4.02 \pm 0.12 (10^8) \text{ UFC g}^{-1} \text{ MS}$ y $4.22 \pm 0.19 (10^8) \text{ esporas g}^{-1} \text{ MS}$, 0.8 y 0.9 veces la inicial.

En este segundo lote se observa que el incremento de actividad biológica es menor disminuyendo la sOUR máxima hasta $5.32 \pm 0.32 \text{ mg O}_2 \text{ g}^{-1} \text{ MS h}^{-1}$ a las 96 horas, se vuelve a observar que el material fresco proporciona nutrientes para que el *Btk* pueda seguir colonizando toda la matriz sólida. Pero los valores finales de células viables de *Btk* disminuyen hasta un valor de $1.04 \pm 0.57 (10^7) \text{ UFC g}^{-1} \text{ MS}$ y el valor de esporas es de $3.57 \pm 0.12 (10^6) \text{ esporas g}^{-1} \text{ MS}$ reduciéndose hasta en dos órdenes de magnitud el valor de las esporas. Esto quiere decir que *Btk* no es capaz de aclimatarse y sobrevivir en la matriz sólida pues existen otros microorganismos en el material fresco que tienen un mayor potencial, y los nutrientes no están disponibles para el desarrollo del *Btk*.

Se realiza un tercer lote para comprobar si con digestato higienizado fresco *Btk* puede aclimatarse y utilizar los nutrientes para volver a colonizar la matriz sólida. Este cambio se produce a las 144 horas del proceso, pero el incremento de sOUR es menor de $3.56 \pm 0.15 \text{ mg O}_2 \text{ g}^{-1} \text{ MS h}^{-1}$ y alcanza una temperatura de 40°C , la cual está 10 grados por encima de la óptima para el crecimiento del *Bt*. Se utilizó un último lote a las 216 horas para comprobar la evolución del proceso y se observó que la actividad continuaba disminuyendo. El COC final del proceso fue de $345.13 \pm 25.23 \text{ mg O}_2 \text{ g}^{-1} \text{ MS}$, muy superior al que se produce a escala de laboratorio, pero debiéndose a otros microorganismos presentes en el digestato fermentado.

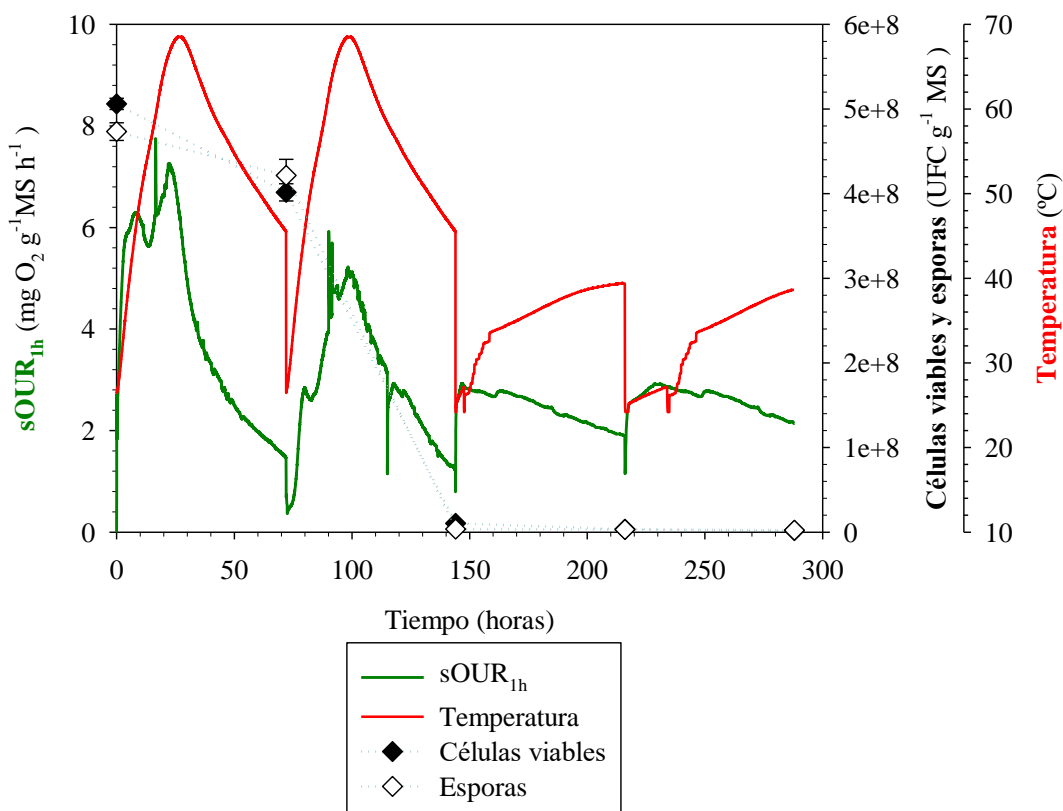


Figura 5.10. Perfil de sOUR, células viables y esporas de la estrategia SBR al para la producción de biopesticida a partir de *Btk* como inóculo y digestato como el sustrato en el proceso de FES en los reactores aislados térmicamente de 10-L. Los valores representados corresponden a la media de 2 fermentaciones independientes.

Se observó que el valor de células viables y esporas a partir del tercer lote desciende, por lo que *Btk* no ha podido utilizar los nuevos nutrientes del digestato higienizado fresco para colonizar la matriz. Al final del proceso los valores de células viables y esporas disminuyen en dos órdenes de magnitud hasta $1.92 \pm 0.59 (10^6)$ UFC g^{-1} MS y $2.22 \pm 0.76 (10^6)$ esporas g^{-1} MS, respectivamente (Figura 5.10). Este descenso de esporas se puede deber que al retirar el 50% del material fermentado se retire con él gran parte de las esporas de *Btk*. Si se tuvieran las condiciones óptimas de crecimiento, temperatura a 30°C y nutrientes disponibles, se podrían convertir las esporas en células viables para generar mayor cantidad de esporas y cristal proteico con efecto biopesticida. Pero se observa tanto en el conteo de células viables, como de esporas que en el digestato fermentado existen

otros microorganismos que se han adaptado mejor a la matriz sólida consumiendo éstos los nutrientes disponibles, y no permitiendo que el *Btk* se desarrolle.

Se realizó un balance de materia de células viables y esporas a partir de la cantidad de sustrato (3.5 kg) y la materia seca (38%). Se observó que el valor de células viables y esporas totales iniciales fue de $6.73 \pm 0.57 (10^{11})$ UFC_T y $6.30 \pm 0.46 (10^{11})$ esporas_T, respectivamente. Como ya se ha explicado las células viables y esporas van disminuyendo en cada lote, obteniendo un valor final de 0.41 y 0.45 veces la inicial si se realiza el sumatorio de todas las células viables y esporas producidas en cada lote, tal y como se puede observar en la Tabla 5.3.

El nuevo aumento de temperatura entre el primer y segundo lote puede tener también influencia en el desarrollo de *Btk*. Por lo tanto, esta estrategia de operación por lotes en reactores de 10-L sin control de temperatura con este tipo de sustrato para *Btk* resulta compleja por la cantidad de microorganismos presentes en el digestato, la falta de nutrientes en él y el aumento de temperatura. Aunque debido a la carga microbiológica del digestato esta operación no es efectiva porque otros microorganismos son más aptos para sobrevivir y hacen que se produzca un aumento de ellos y no del *Btk*.

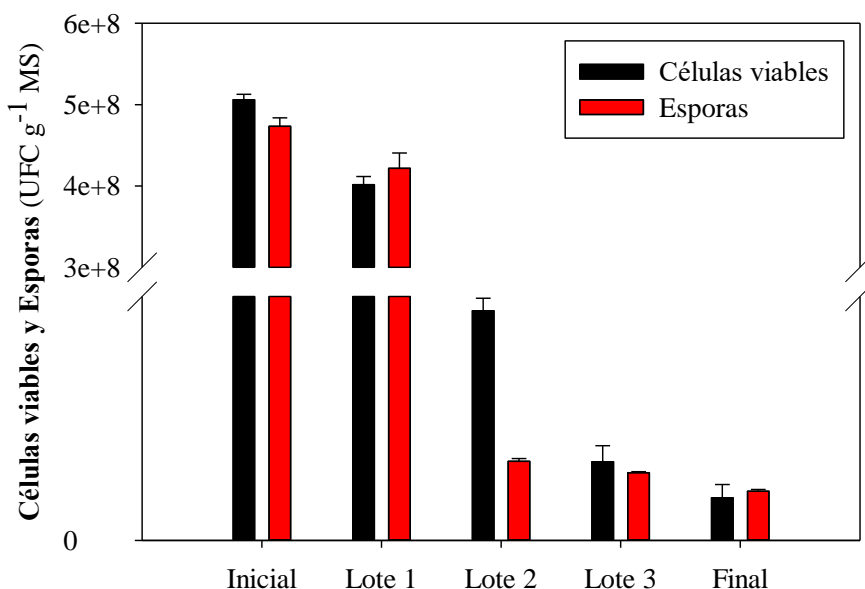


Figura 5.11. Promedio de células viables y esporas observados durante la estrategia SBR para la producción de biopesticida a partir de *Btk* como inóculo y digestato como sustrato en el proceso de FES en los reactores aislados térmicamente de 10-L.

La Tabla 5.3 resume todos los parámetros característicos del proceso en cada una de las escalas analizadas. En ella se puede observar que el cambio de temperatura sí que afecta de forma negativa cuando se trabaja con una producción en SBR y dificulta el crecimiento y la esporulación de *Btk*, además de la competencia existente con otros microorganismos.

Tabla 5.3. Resultados finales de la estrategia SBR en reactores de 0.5-L (escala laboratorio) y reactores aislados térmicamente de 10-L a los 12 días del proceso de FES (4 lotes secuenciales).

Parámetro	Unidades	Escala laboratorio	Escala 10-L
sOUR	(mg O ₂ g ⁻¹ MS h ⁻¹)	1.7 ±0.1	7.3 ±0.3
COC	(mg O ₂ g ⁻¹ MS)	45.5 ±0.5	124.9 ±0.2
Temperatura	(°C)	30	68.53
Células viables iniciales	(UFC g ⁻¹ MS)	5.49±0.02 (10 ⁸)	5.06±0.64 (10 ⁸)
Células viables finales	(UFC g ⁻¹ MS)	5.11±0.03 (10 ⁸)	1.92±0.59 (10 ⁶)
Esporas iniciales	(esporas g ⁻¹ MS)	4.50±0.31 (10 ⁸)	4.73±0.10 (10 ⁸)
Esporas finales	(esporas g ⁻¹ MS)	6.07±0.68 (10 ⁸)	2.22±0.76 (10 ⁶)

Mientras que la operación en SBR funcionó a escala laboratorio aumentando la cantidad de células viables y esporas, en el intento de ampliar la escala a reactores aislados térmicamente de 10-L se observó una disminución de éstas a medida que se realizaban los progresivos lotes sustituyendo el 50% de material, por lo que esta estrategia necesitaría una optimización más compleja o plantearse el uso de otro tipo de residuo para poder aplicarla en la producción de biopesticida a partir de *Bt*.

5.3.8. Análisis microbiológico del digestato durante el proceso de FES

El análisis microbiológico del digestato se realizó con el material procedente de la Estrategia 2 (inoculando *Btk* a las 48 horas) estudiada con el Sistema de fermentación II de reactores aislados térmicamente de 10-L. Se evaluó el contenido de microorganismos del digestato inicial, el digestato higienizado y el digestato durante diferentes tiempos de fermentación para determinar la presencia o ausencia de *Bt* en el digestato y otros microorganismos que puedan ser perjudiciales para la salud.

Como se puede observar en el Anexo I: Análisis microbiológico, en todas las muestras analizadas no hay evidencia de *E.coli*, *S.aureus*, *Salmonella*, *Listeria* ni *C. perfringers*. Estos microorganismos se consideran patógenos y su límite para el uso de materiales fertilizantes se encuentra recogido en el Reglamento (UE) 2019/1009 debido a que son perjudiciales para el ser humano, incrementando el potencial del digestato debido a la ausencia de éstos para producir biopesticida sin riesgo para la salud humana y ambiental.

En la Tabla 5.4 se presentan los resultados para el género *Bacillus*, bacterias y hongos detectados en las diferentes muestras analizadas. Los detalles de cada uno de los microorganismos se recogen en el Análisis microbiológico realizado en el laboratorio de microbiología de la Facultad de Veterinaria de la UAB, en el Anexo I de esta tesis.

Tabla 5.4. Evaluación de las muestras de digestato en diferentes condiciones determinando bacterias, hongos y diferentes cepas del género *Bacillus*.

Muestras	M1	M2	M3	M4	M5	M6
Cepas del género <i>Bacillus</i>						
<i>Bacillus subtilis</i>	X			X	X	X
<i>Bacillus stearothermophilus</i>	X	X	X	X	X	X
<i>Bacillus thuringensis</i>				X	X	X
Bacterias						
<i>Bacillus spp.</i>	X	X	X	X	X	X
<i>Kocuria spp.</i>	X	X		X	X	X
<i>Pseudomonas spp.</i>	X					
<i>Streptomyces sp.</i>	X	X		X	X	X
<i>Thermus sp.</i>	X	X	X	X	X	X
<i>Staphylococcus spp.</i>	X					
<i>Lactobacillus spp.</i>	X	X	X	X	X	X
<i>Lactococcus spp.</i>	X	X	X	X	X	X
<i>Clostridium spp,</i>	X	X	X	X	X	X
<i>Serratia sp.</i>	X					
Hongos						
<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>Saccharomyces sp.</i>	X	X	X	X		X
<i>Fusarium sp.</i>			X	X	X	X

M1: residuo inicial. M2: residuo higienizado (70°C, 1 hora). M3: tras 48h fermentacion. M4: muestra inoculada. M5: muestra tras 24h inoculada. M6: muestra tras 6 días inoculada.

De la Tabla 5.4 se puede observar que el digestato inicial no contiene *Bt*, por lo que todo lo que aparece en el proceso de fermentación se debe al inóculo de *Btk*.

Si se compara el digestato inicial (M1) y digestato higienizado (M2) se puede decir que la higienización a 70°C durante 1 hora permite disminuir las concentraciones de todos los microorganismos analizados dejando un material con menor carga microbiológica.

El análisis de las enterobacterias totales a lo largo de todo el proceso de FES disminuye hasta dos órdenes de magnitud, con el tratamiento de higienización los valores disminuyen hasta 10^2 UFC g⁻¹, incrementándose al final de los 6 días de la fermentación 10^6 UFC g⁻¹.

Las coliformes totales son una amplia variedad de bacterias anaerobias facultativas, lo que quiere decir que pueden desarrollarse tanto en presencia como en ausencia de oxígeno. Este tipo de bacterias son indicadores de la contaminación del agua y los alimentos, gracias a la higienización se consigue disminuir la concentración hasta 10^2 UFC g⁻¹.

En el caso de bacterias anaeróbicas y aeróbicas, las primeras disminuyen cuando se someten al proceso de FES, mientras que las aeróbicas aumentan hasta valores de 10^9 UFC g⁻¹, lo cual confirma que en ningún momento en la fermentación se han dado condiciones anaerobias y que el *Btk* esporula debido a la limitación de los nutrientes en el digestato.

El material final fermentado que se obtiene (M6) contiene tres tipos de cepas de *Bacillus*, ninguna de ellas es perjudicial para el ser humano y todas ellas se encuentran en el suelo. Los hongos presentes en el análisis degradan materiales lignocelulósicos recalcitrantes, además de ser grandes solubilizadores de elementos como el fósforo, hierro, nitrógeno para el uso del digestato como fertilizante (Vargas et al., 2014). Otro de los hongos a destacar es el *Penicillium* tiene un gran potencial enzimático que permite producir enzimas para hidrolizar la pared celular vegetal e incorporar los productos a su metabolismo, degradando materia orgánica (Anastasi et al., 2015).

Con este análisis se puede concluir que todo el *Bt* presente al final de la FES procede del inóculo inicial que se integró en el digestato y que el tratamiento de higienización cumple con la normativa establecida para eliminar microorganismos perjudiciales. Además, los

microorganismos presentes al final de la FES caracterizan al digestato con *Btk* como un sustrato óptimo como fertilizante, ya que contiene bacterias y hongos que ayudan a mejorar las condiciones del suelo, además de tener propiedades biopesticidas gracias al *Btk*.

5.3.5. Bioensayos

Las muestras que fueron enviadas a IRTA se evaluaron contra *Plodia interpunctella* y no hubo ningún efecto de mortalidad, en cambio el *Btk* comercial utilizado como control obtuvo un 100% de efecto biopesticida. Esto puede deberse a varios motivos, que la dosis suministrada a las larvas fuera insuficiente y por tanto se necesitaría mayor cantidad, o bien que el biopesticida producido contenga una cantidad de *Btk* en estado vegetativo y, por lo tanto, no hubiese completado su ciclo esporulando y generando el cristal proteico que es donde recae la acción biopesticida. Para el caso de la dosis suministrada en este ensayo se asimilaron células viables a unidades de toxicidad y se diluyó según las instrucciones del producto comercial Delfin® con el que se realizó el ensayo y que se demostró más concentrado. Las cantidades suministradas en el experimento a *P.interpunctella* fueron a partir de un extracto de digestato con una cantidad de células viables de $1(10^8)$ UFC mL⁻¹. Este valor se relacionó con el comercial Delfin® $3.2(10^4)$ UFC mL⁻¹ para 1 L de agua, obteniendo un valor de dosis de extracto de digestato de 320 µL diluido en 1 L de agua. Este valor de dosis se consideró insuficiente, ya que no tuvo efecto en la plaga *P. interpunctella*.

En cambio, el efecto como biopesticida en la plaga de *Pieris brassicae* sobre coles, prueba realizada por ReFarmers, tuvo una mortalidad del 76% utilizando el bioproducto obtenido mediante FES. Aunque fue menos eficiente y más lento que la solución comercial, se puede considerar que el biopesticida obtenido por medio de la FES tiene un buen potencial de acción contra la plaga de *Pieris brassicae*. Quedan pendientes optimizar estudios para su aplicación sobre las plagas. Por ejemplo: estudiar diferentes dosis en las plantas, determinar la cantidad de toxina presente en el producto final de FES, que es difícil de comparar con el comercial. Otros análisis que se detallaran más adelante están relacionados con los experimentos realizados en el Capítulo 8 de esta tesis. Es decir, la mejora de extracción del biopesticida para concentrar la toxina, bien con diferente agente

extractante o implementando una lisis celular del producto fermentado para liberar las toxinas del *Bt* y por lo tanto obtener un producto más concentrado.

5.4. Conclusiones

Como conclusión, la temperatura es un factor clave para el desarrollo de un biopesticida a partir de *Btk*. Después de comprobar diferentes estrategias de operación en los reactores de 10-L la opción más apropiada requiere una cantidad de material de 3.5 kg y una ratio de inóculo de 0.0030 g *Bt* g⁻¹ digestato inoculado al comienzo del proceso para que pueda ser capaz de aclimatarse y sobrevivir durante todo el proceso con valores de células viables de 4.06±0.70 (10⁹) UFC g⁻¹ MS y de esporas de 3.40±0.61 (10⁸) esporas g⁻¹ MS. La operación SBR requiere un estudio más detallado sobre proporciones y momento de cambio del material de un lote a otro, puesto que aplicando esta alternativa a escala de 10-L se observa una importante disminución de la población de *Btk*.

Del análisis microbiológico llevado a cabo, se comprobó que el digestato fresco no contiene *Btk* ni tampoco otros microorganismos patógenos como *E.coli*, *S.aureus*, *Salmonella*, *Listeria* ni *C. perfringers* pudiendo ser utilizado como fertilizante. El proceso de higienización ayuda a eliminar microorganismos perjudiciales para el proceso de FES, obteniendo un producto final con una cantidad de *Bt* de 10⁸ UFC g⁻¹ MS y libre de patógenos.

Los bioensayos realizados en diferentes plagas, *P. interpunctella* y *Pieris brassicae*, demuestran que el bioproducto obtenido con *Bt* a partir de digestato tiene propiedades biopesticidas en *Pieris brassicae*, pero no en *P. interpunctella* bajo las condiciones ensayadas. Por lo que su efecto como biopesticida depende del tipo de plaga a la que se aplique el *Bt* y de la dosis suministrada del bioproducto.

CAPÍTULO 6

*Escalado del proceso de FES para la producción de biopesticida con *Bacillus thuringiensis**

Parte de este capítulo está publicado en Rodríguez, P., Cerda, A., Font, X., Sánchez, A., Artola, A., 2019. Valorisation of biowaste digestate through solid state fermentation to produce biopesticides from *Bacillus thuringiensis* Waste Management. 93, 63-71.

6.1. Introducción

Como se ha determinado en el Capítulo 4, el digestato es un buen sustrato para la producción de biopesticidas a partir de *Btk* a escala de laboratorio. A esta escala los reactores se encontraban sumergidos en un baño con temperatura regulada a 30°C, que es la óptima para el crecimiento de *Bt*. En cambio, cuando se produce un aumento de escala (Capítulo 5) y al no poder controlar la temperatura mediante un baño, ésta asciende hasta valores de rango termófilo, lo que supone una condición adversa para el crecimiento de *Bt*, además de un riesgo de menor efecto biopesticida, ya que la temperatura puede afectar al cristal proteico.

El principal objetivo de este capítulo es evaluar el escalado de la producción de biopesticidas a partir de *Btk* por medio de FES hasta una escala de 100-L, a partir de la estrategia óptima de operación determinado en el reactor aislado térmicamente de 10-L. Los principales desafíos asociados al escalado son la transferencia de oxígeno y la eliminación de calor. Se proponen, para evitar estos problemas estudiar dos tipos de reactores y posteriormente un escalado a planta piloto con uno de ellos. Los dos tipos de reactores estudiados serán los reactores aislados y los no aislados térmicamente con agitación para evitar gradientes de temperatura en la matriz sólida y añadir una mejor homogeneización del sustrato dentro del reactor. La agitación ayuda, en este caso, a distribuir los nutrientes y al paso de aire por toda la matriz disminuyendo la temperatura, los condensados en la parte superior del reactor y la compactación por secado en la inferior. Sin embargo, hay que tener en cuenta que la agitación debe estar en un rango en el cual no compacte la matriz sólida y provoque condiciones adversas para el crecimiento de *Bt*. Además de los problemas conocidos en el escalado como los gradientes de temperatura, el otro inconveniente de la investigación es el sustrato. Las características desfavorables del digestato son el exceso de agua y la falta de nutrientes y porosidad para el crecimiento de microorganismos por medio de FES.

Al final del proceso de FES el sustrato obtenido con propiedades biopesticidas, requiere almacenarse de forma que no se pierdan esas características como bioproducto. Por ello, en la última parte de este capítulo se evalúan diferentes condiciones de conservación hasta pasado un mes desde su producción para evaluar la viabilidad de su uso como biopesticida.

6.2. Metodología

6.2.1. Microorganismos

En este capítulo todos los experimentos para la obtención del biopesticida han sido realizados con la cepa *Btk*.

6.2.2. Reactores aislados térmicamente

Todas las fermentaciones se llevan a cabo durante 4 días con el Sistema de Fermentación II en reactores aislados térmicamente de 10-L, explicados en el Capítulo 3 apartado 3.2.2.

Las fermentaciones se realizan en condiciones no estériles, con un pretratamiento de higienización del digestato, usando una mezcla inicial de sólido consistente en digestato y astillas de madera como agente estructurante en una relación 1:1 (v:v). Cada experimento consiste en un reactor control (digestato sin inocular *Btk*) y un duplicado de digestato inoculando *Btk*. En todos los experimentos, el digestato ha sido higienizado de acuerdo con el punto 3.1.1.

En estos experimentos se usó una proporción de 0.0030 g *Btk* g⁻¹ digestato en peso seco y una cantidad de material total de 3.5 kg de matriz sólida. El caudal de aire está controlado entre 400 y 800 mL min⁻¹.

6.2.3. Reactores no aislados térmicamente

En los experimentos realizados en reactor no aislado de 22-L, con agitación la proporción usada para inocular fue de 0.0030 g *Btk* g⁻¹ digestato con 4 kg de matriz sólida estando compuesta de digestato (previamente higienizado) y astillas de madera en una relación 1:1 (v:v). El caudal de aire fue de 1000 mL min⁻¹ con un régimen de agitación de 12 rpm durante 15 minutos cada 24 horas. La agitación se controla específicamente para reducir la compactación de la mezcla, para promover la transferencia de oxígeno y para una adecuada homogeneización de la matriz sólida, rompiendo también gradientes de temperatura. Cada experimento consiste en un reactor control (digestato sin inocular *Btk*) y un duplicado de digestato inoculando *Btk*.

Los reactores no aislados térmicamente de 22-L se encuentran explicados en el Capítulo 3 apartado 3.2.3.

6.2.4. Reactor escala piloto

En las fermentaciones en el reactor de 100-L no aislado con agitación se utiliza la proporción de 0.001 g *Btk* g⁻¹ digestato con 20 kg de matriz sólida, es decir digestato (previamente higienizado) y astillas de madera en relación 1:1 (v:v). El caudal de aire suministrado a la matriz sólida es de 3000 mL min⁻¹ con un régimen de agitación de 12 rpm durante 15 minutos cada 24 horas. Cada experimento consiste en un reactor control (digestato sin inocular *Btk*) y un duplicado de digestato inoculando *Btk*.

Los valores de caudal de aire para el escalado se basan en experiencias previas operando con reactores similares y diferentes residuos (Mejias et al., 2017). Al trabajar a escala de laboratorio, no se observó diferencia cuando se trabajaba con caudales de aire entre 15 y 30 mL min⁻¹, por lo que una relación directa de cantidad de sustrato y aireación puede ser extrapolada en el momento de escalar el proceso.

El reactor a escala piloto de 100-L se encuentra explicado en el Capítulo 3 apartado 3.2.4.

6.2.5. Almacenamiento y conservación

Después del proceso de FES se plantean dos alternativas con diferentes condiciones para almacenar y conservar el bioproducto y conocer si las propiedades biopesticidas se mantienen con el tiempo.

Las dos alternativas que se plantean de almacenamiento son en estado sólido o líquido. Para cada una de ellas se contemplan dos temperaturas diferentes: en cámara fría (CF) a 4°C o a temperatura ambiente (TA) a 20°C. El esquema presentado en la Figura 6.1 muestra las cuatro alternativas de almacenamiento de biopesticida consideradas en el estudio.

En el caso de conservación en estado líquido se extrae el bioproducto de la matriz de fermentación sólida. Para extraerlo se estudiaron diferentes proporciones sólido:líquido que fueron 1:10, 1:5 y 1:2, utilizando la solución salina de Ringer®. En estas extracciones, sólido y líquido se sometieron a agitación a 220 rpm durante 20 minutos en un incubador. Posteriormente, se midió el pH, la CE, las células viables y las esporas para cada una de las alternativas planteadas. Se almacenaron tal y como se ha descrito, cuantificando de nuevo a los 7 y 30 días el pH, la CE, las células viables y las esporas de *Btk*.

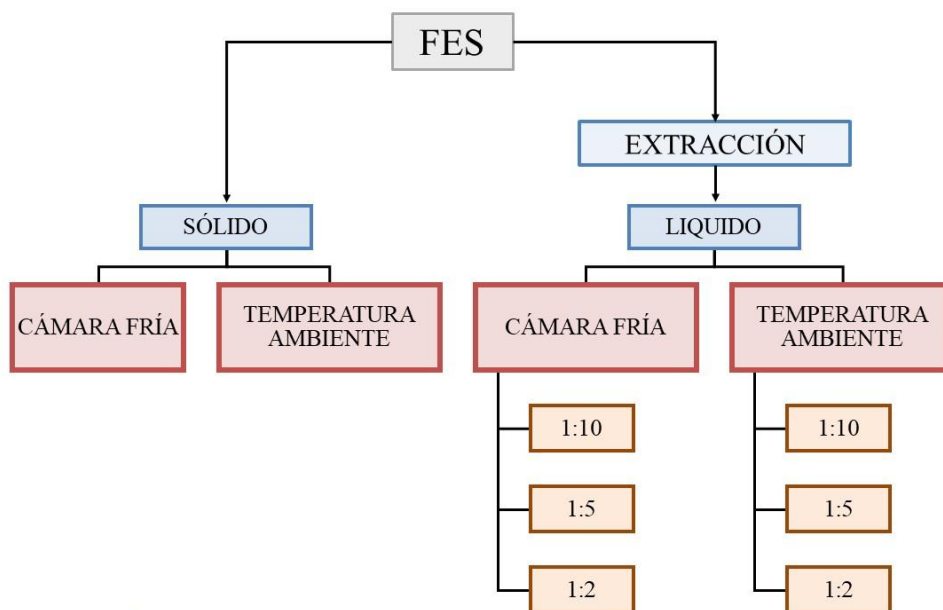


Figura 6.1. Diseño experimental de la configuración de conservación del biopesticida.

Los resultados de conservación de la actividad biopesticida se expresan como el porcentaje de variación en el recuento de células viables y esporas en comparación con la muestra inicial. Si el porcentaje es positivo implica que las células viables y esporas aumentan en comparación con las iniciales. Si los porcentajes son negativos, implica que los valores de células viables y esporas disminuyen en comparación con el contenido inicial, al principio del almacenamiento.

6.2.6. Análisis estadístico

Se realizó un análisis estadístico utilizando la prueba de la t de Student con técnicas básicas de ANOVA con Minitab Software versión 15.1. La prueba de Tukey se realizó para determinar diferencias estadísticamente significativas en incrementos de células viables e incrementos de esporas con un nivel de probabilidad de $p < 0,05$, al comparar experimentos de FES en todos los reactores.

6.3. Resultados y discusión

6.3.1. Reactores aislados térmicamente

La Figura 6.2a presenta el resultado de una fermentación control en un reactor de 10-L y la Figura 6.2b muestra el rendimiento general del proceso de fermentación del digestato inoculado con *Btk* en este mismo tipo de reactor. La Tabla 6.1 resume los valores iniciales y finales de los parámetros principales en el proceso FES en el caso de los reactores con

Btk, los valores de temperatura y sOUR a las 24 h de fermentación. El sistema presenta la mayor actividad biológica medida como mayor sOUR y temperatura. Estos parámetros alcanzaron valores de $7.88 \pm 0.15 \text{ mg O}_2 \text{ g}^{-1} \text{MS h}^{-1}$ y 68.2°C , respectivamente.

El sistema mantuvo este comportamiento durante casi 24 horas para después disminuir hasta condiciones estables por debajo de $1 \text{ mg O}_2 \text{ g}^{-1} \text{MS h}^{-1}$. El consumo acumulado de oxígeno durante cuatro días (COC) fue de $332 \pm 28.83 \text{ mg O}_2 \text{ g}^{-1} \text{MS}$. Estos resultados son más altos que los observados en la fermentación control (Figura 6.2a) donde los valores de sOUR, COC y temperatura alcanzados fueron $4.49 \text{ mg O}_2 \text{ g}^{-1} \text{MS h}^{-1}$, $190.02 \text{ mg O}_2 \text{ g}^{-1} \text{MS}$ y 55.8°C , respectivamente. Al comparar los valores de sOUR, temperatura y COC en el reactor con *Btk* y el reactor de control, se observan incrementos de 1.7, 1.2 y 1.7 veces, respectivamente. Estos valores confirman una mayor actividad biológica en los reactores inoculados con *Btk* que puede deberse a la acción combinada de los microorganismos existentes en el digestato y el *Btk* inoculado. Así, en el reactor inoculado, *Btk* es capaz de crecer y colonizar la matriz sólida, aumentando la temperatura y la actividad biológica.

La Figura 6.2b también muestra la evolución del recuento total de células y esporas durante el curso de la fermentación. Los valores iniciales de células viables y esporas fueron $2.14 \pm 0.27 (10^9) \text{ UFC g}^{-1} \text{MS}$ y $1.98 \pm 0.15 (10^7) \text{ esporas g}^{-1} \text{MS}$, respectivamente. Las células viables aumentaron durante todo el proceso, alcanzando un máximo de $4.69 \pm 0.46 (10^9) \text{ UFC g}^{-1} \text{MS}$ a las 72 h de operación. Al final de la fermentación, el valor fue de $4.06 \pm 0.46 (10^9) \text{ UFC g}^{-1} \text{MS}$, un aumento de 1.9 veces con respecto al inicio del proceso. En contraste, la producción de esporas comenzó a las 24 horas y mostró un comportamiento más rápido, alcanzando un máximo de $3.41 \pm 0.15 (10^9) \text{ esporas g}^{-1} \text{MS}$ a las 48 h, con un incremento de 171.6 veces al final de la fermentación. La rápida generación de esporas puede ser una consecuencia de las condiciones estresantes en la matriz sólida, probablemente asociadas a parámetros como la falta de nutrientes o las condiciones termofílicas alcanzadas (Nicholson et al., 2000).

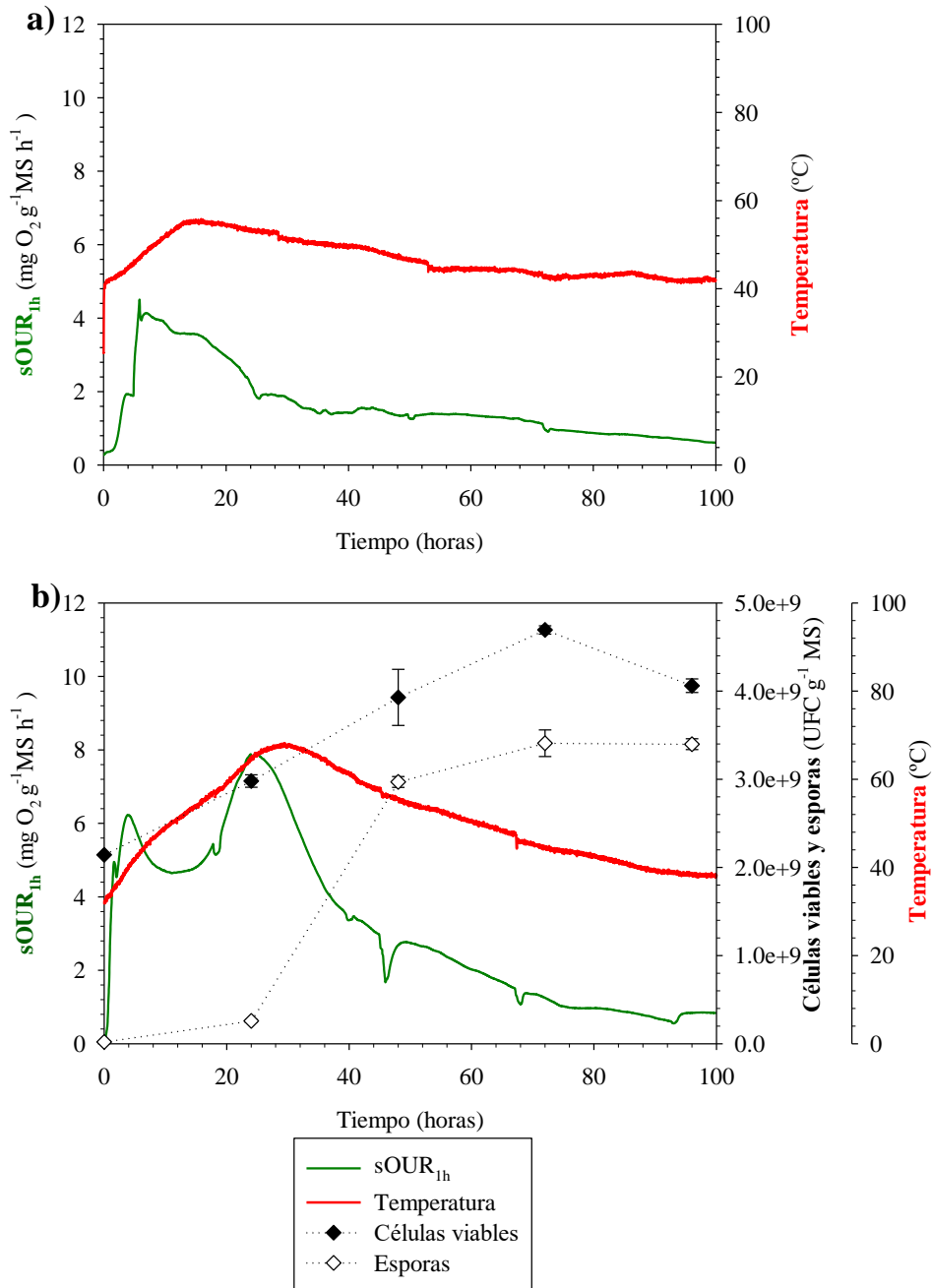


Figura 6.2. Evolución media de sOUR, temperatura, células viables y esporas en FES de digestato higienizado en condiciones no estériles en un reactor aislado térmicamente de 10-L. a) Reactor control. b) Reactor inoculado con *Btk*.

Tabla 6.1. Valores iniciales y finales para los principales parámetros en la FES de digestato inoculado con *Btk* en los diferentes reactores estudiados.

Parámetro	Unidades	10-L		22-L		100-L	
		Aislado térmicamente		No aislado térmicamente y agitado		No aislado térmicamente y agitado	
Tipo de reactor	-	Control	<i>Btk</i>	Control	<i>Btk</i>	Control	<i>Btk</i>
Humedad inicial	(%, bh)	65.7±0.2	67.0±0.2	58.3±1.3	57.2±2.3	60.0±0.6	60.0±0.6
Humedad final	(%, bh)	71.2±0.9	69.9±0.8	59.4±1.4	60.4±1.1	65.3±0.9	60.4±1.1
Materia orgánica inicial	(%, bh)	74.3±1.1	75.0±0.5	71.8±0.7	79.7±0.7	76.5±0.6	77.8±0.6
Materia orgánica final	(%, bh)	73.2±0.9	61.0±0.7	72.3±0.4	67.9±0.5	76.3±0.7	72.3±0.4
pH inicial (1:5)	-	8.86±0.01	8.85±0.01	8.98±0.01	8.78±0.01	8.71±0.01	8.67±0.01
pH final(1:5)	-	8.70±0.01	8.76±0.01	9.92±0.01	8.92±0.01	8.91±0.01	8.76±0.01
CE inicial	(mS cm ⁻¹)	1.82±0.01	1.92±0.01	1.68±0.01	2.68±0.01	1.38±0.01	1.68±0.01
CE final	(mS cm ⁻¹)	2.09±0.01	2.15±0.01	2.53±0.01	3.13±0.01	1.90±0.01	2.10±0.01
sOUR	(mg O ₂ g ⁻¹ MS h ⁻¹)	4.49	7.88	1.04	1.72	1.70	0.90
COC	(mg O ₂ g ⁻¹ MS h ⁻¹)	190.02	332.17	126.21	150.24	90.02	63.92
Tmax	(°C)	55.8	68.17	21.05	27.43	26.00	28.23
Células viables iniciales	(UFC g ⁻¹ MS)	-	2.14±0.27·(10 ⁹)	-	7.40±0.76·(10 ⁹)	-	1.60±0.34·(10 ⁹)
Células viables finales	(UFC g ⁻¹ MS)	-	4.06±0.70·(10 ⁹)	-	5.93±0.26·(10 ⁹)	-	1.87±0.21·(10 ⁹)
Esporas iniciales	(esporas g ⁻¹ MS)	-	1.98±0.15·(10 ⁷)	-	2.96±0.59·(10 ⁹)	-	4.44±0.12·(10 ⁸)
Esporas Finales	(esporas g ⁻¹ MS)	-	3.40±0.61·(10 ⁹)	-	5.72±0.95·(10 ⁹)	-	1.67±0.45·(10 ⁹)
Esporulación	(%)	-	84	-	97	-	89

En este contexto, Yezza et al. (2006a) observaron una alta esporulación y un bajo crecimiento de células viables cuando se usan sustratos de bajo contenido en carbohidratos y que en estas circunstancias se consume nitrógeno contenido en el residuo. Estos resultados muestran que *Btk* fue capaz de prosperar y esporular en las condiciones proporcionadas. Sin embargo, otros autores han informado de una disminución en las células viables de *Btk* relacionadas con un aumento de la temperatura en el reactor. Este es el caso de Ballardo et al. (2016), utilizando residuos de fibra de soja como sustrato donde se alcanzaron temperaturas superiores a 60°C, mientras que el valor inicial de las células viables fue de 9.5 (10⁷) UFC g⁻¹ MS, disminuyendo después de 20 días de fermentación a 1.1 (10⁷) UFC g⁻¹ MS, lo que representa una disminución de casi el 80%. Ballardo et al. (2017) y Zhuang et al. (2011) también observaron aumentos de temperatura utilizando un sustrato altamente biodegradable, como la FORM o lodos de aguas residuales, perdiendo así viabilidad celular.

6.3.2. Reactores no aislados térmicamente y agitados

Para superar el posible efecto del aumento de la temperatura y mejorar la homogenización de la matriz, se utilizó un reactor de 22-L sin aislamiento y con agitación. La agitación se utilizó para mejorar la homogenización de la matriz orgánica y la tasa de transferencia de oxígeno (Luna-Finkler y Finkler, 2012). Estos autores también señalan que la agitación es útil para eliminar el CO₂ y el calor metabólico producido durante la fermentación. Los resultados obtenidos en el control se presentan en la Figura 6.3a donde se observan valores de sOUR, COC y temperatura alcanzados de 1.04 mg O₂ g⁻¹ MS h⁻¹, 126.21 mg O₂ g⁻¹ MS h⁻¹ y 31.05±1°C. En la Figura 6.3b y en la Tabla 6.1 se muestran los valores del fermentado de digestato inoculado con *Btk*. Este sistema mostró un crecimiento rápido, con una sOUR de 1.72±0.12 mg O₂ g⁻¹ MS h⁻¹ después de 15 h de fermentación. La tendencia general de sOUR fue estable en valores en el rango de 1.3 y 1.8 mg O₂ g⁻¹ MS h⁻¹ durante los 4 días de operación. Los picos observados en la Figura 6.3b están relacionados con la agitación, asociados con una mejora en la transferencia de oxígeno en los reactores y la homogeneización de la matriz poniendo de nuevo los nutrientes al alcance del *Bt*. Adicionalmente, la temperatura se mantuvo estable en un valor alrededor de 27±2°C. El oxígeno acumulado durante cuatro días (COC) fue de 150.24±10.45 mg

O_2 $g^{-1}MS$. Estos valores con *Btk* son más altos que los observados en la fermentación control con incrementos de 1.6, 1.3 y 1.2 veces, respectivamente.

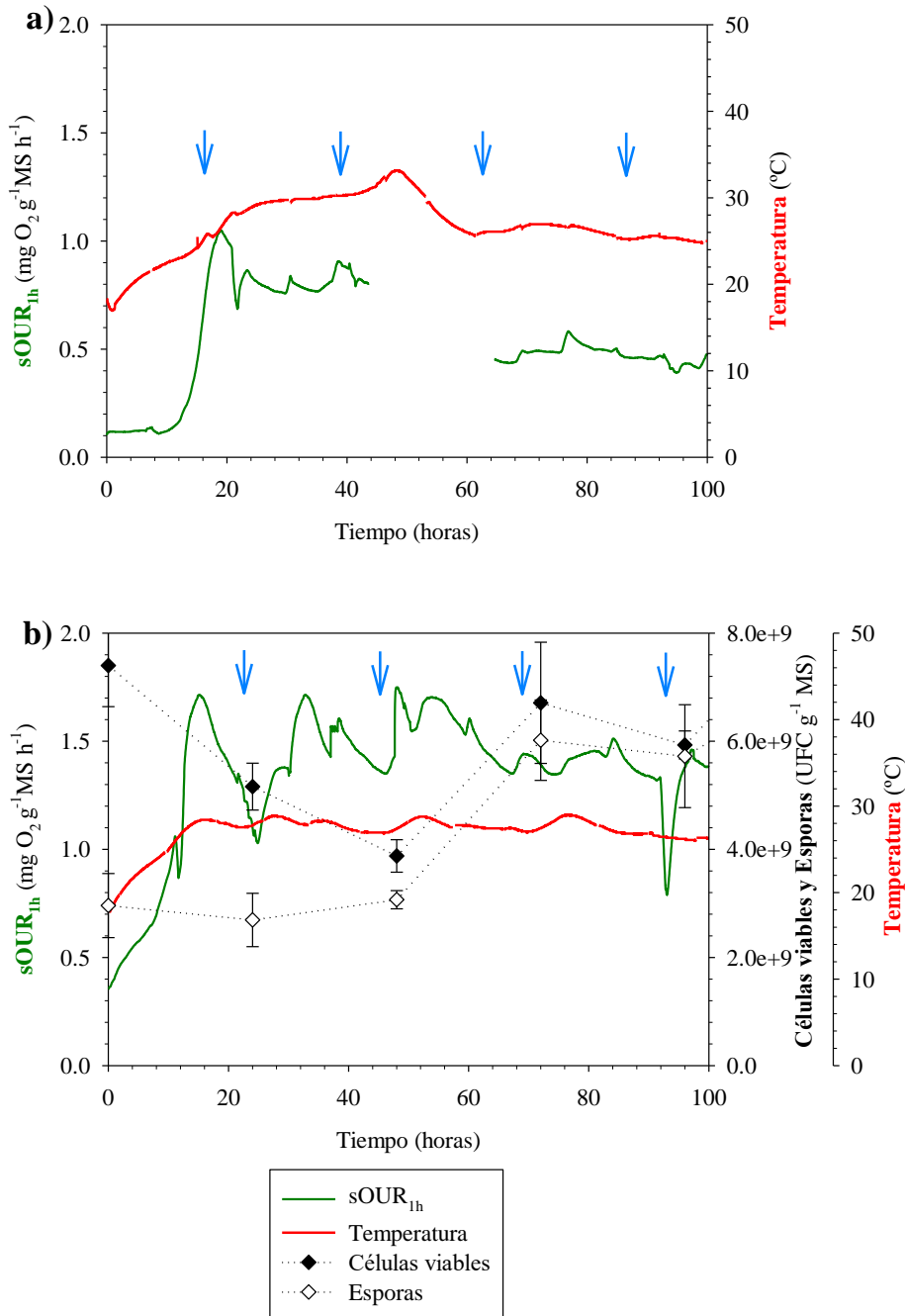


Figura 6.3. Evolución media de sOUR, temperatura, células viables y esporas en FES de digestato higienizado en condiciones no estériles en un reactor no aislado con agitación diaria de 22-L. Las flechas muestran los momentos de agitación. a) Reactor control. b) Reactor inoculado con *Btk*.

Los valores iniciales de células viables y esporas fueron $7.40 \pm 0.76 (10^9)$ UFC g^{-1} MS y $2.96 \pm 0.59 (10^9)$ esporas g^{-1} MS, respectivamente, como se muestra en la Figura 6.3b. Las células viables presentaron una disminución constante durante las primeras 48 h de fermentación. Después de ese momento el contenido de células viables aumenta llegando a valores estables hasta el final de la fermentación, pero inferiores a las iniciales. En contraste, el contenido de esporas se mantuvo estable alrededor del valor inicial durante las primeras 48 h, después comenzó a aumentar. Probablemente, esto se debe al hecho de que el digestato presenta una cantidad limitada de nutrientes que provoca la esporulación de *Btk* en poco tiempo. Esto es de gran importancia ya que la esporulación está relacionada con la liberación del cristal que tiene el efecto biopesticida (Bravo et al., 2011). Los valores finales de las células viables y las esporas fueron $5.93 \pm 0.26 (10^9)$ UFC g^{-1} MS y $5.72 \pm 0.95 (10^9)$ esporas g^{-1} MS, respectivamente, una disminución de 0.8 y un aumento de 1.93 veces con respecto a los recuentos iniciales. Si estos incrementos se comparan con los obtenidos en reactores aislados de 10-L, se puede concluir que las temperaturas más altas alcanzadas contribuyen a un mayor aumento en los recuentos de esporas (169.7 veces más que en los no aislados). Pero se debe señalar que el valor absoluto final de concentración de esporas fue mayor en los reactores de 22-L que en los de 10-L pues se parte de una concentración inicial mayor.

El recuento de esporas se ha utilizado como un indicador de la producción de biopesticida derivado de *Bt*, ya que la toxina de *Btk* se ha asociado al proceso de esporulación (Tirado-Montiel et al., 2001). Varios autores han desarrollado procesos para la producción de biopesticidas derivados de *Bt*, con contajes de esporas que van desde 10^7 a 10^{10} en condiciones de laboratorio utilizando sustratos altamente biodegradables como el salvado de trigo o FORM, entre otros (Patil et al, 2013; Zou et al., 2016; Ballardo et al., 2017). En este sentido, los resultados obtenidos en el presente trabajo se encuentran en el rango medio de los valores reportados en la literatura científica. Sin embargo, debe considerarse que las condiciones no fueron estériles, por lo que la competencia con otros microorganismos ha de tenerse en cuenta al realizar estas comparaciones, puesto que el digestato es un sustrato menos biodegradable con una población microbiana autóctona compleja.

En general, este es el primer intento de producir biopesticida derivado de *Bt* utilizando esta configuración de reactor, por lo tanto, una comparación directa con otros estudios no

es posible. Los parámetros más importantes en FES son el gradiente de temperatura a través de la matriz sólida, la evaporación, el control de la aireación y los cambios locales de pH (Singhania et al., 2009).

6.3.3. Comparación de los reactores aislados y no aislados

La sOUR, la temperatura y los incrementos de COC, con respecto a los reactores de control, fueron similares en los reactores aislados y no aislados, aunque los valores de temperatura absoluta y el perfil de temperatura fueron claramente diferentes e implicaron diversas condiciones ambientales en la matriz sólida. En el caso de los reactores aislados de 10-L el calor generado provoca un aumento de temperatura durante todo el proceso FES, teniendo en estos reactores valores de temperatura mesofílicas y termofílicas. Estas condiciones afectan al desarrollo microbiano tanto del microbioma autóctono como del *Bt* (Zou et al., 2016; Pandey et al., 2007). Podrían también afectar a la humedad, aunque al trabajar en reactores cerrados no se observan cambios en este parámetro.

En contraste, los reactores no aislados (22-L) mostraron una temperatura estable, alrededor de 25-30°C, que es la temperatura de crecimiento óptima para *Bt* (El-Bendary et al., 2006). Esto se puede atribuir al espacio libre hasta la parte superior del reactor (30% de volumen libre), específicamente al régimen de agitación provisto y la falta de aislamiento. También se observa que la agitación periódica durante un cierto tiempo es positiva para disminuir el sobrecalentamiento metabólico en la materia sólida (Cerdea et al., 2019).

En el reactor aislado, la temperatura se mantuvo con valores mesofílicos durante 2.5 días, superando los 60°C entre las 20 y 42 h desde el inicio del proceso de fermentación, lo que puede ayudar a crear las condiciones adecuadas para la esporulación. Algunos autores como Zhuang et al. (2011) han estudiado el efecto de la temperatura en el crecimiento de *Bt* observando que las temperaturas superiores a 60°C benefician el proceso de esporulación, y por lo tanto la producción de biopesticida. En contraste, el biopesticida producido mostró un efecto menos tóxico sobre las plagas en comparación con el biopesticida producido en condiciones más favorables (Zhuang et al., 2011).

En general, los reactores aislados mostraron condiciones apropiadas para la colonización, la esporulación de *Btk* y, lo que es más importante, para la producción de un bioproducto con propiedades biopesticidas, lo que lleva a una esporulación del 84% (respecto con las células viables finales). Por otro lado, los experimentos con reactores no aislados permitieron proporcionar condiciones favorables para la producción de biopesticidas, logrando una esporulación del 97%. Sin embargo, al aumentar la escala del reactor en condiciones adiabáticas, la temperatura máxima alcanzada puede ser mayor, así como el tiempo durante el cual se mantiene. Este hecho puede tener efectos indeseables en el crecimiento de *Btk*. Por lo tanto, se eligió un reactor no aislado y agitado para su escalado.

6.3.4. Escalado (100-L)

Con el fin de evaluar el cambio de escala del proceso desarrollado en el reactor de 22-L, se realizó un experimento en un reactor de 100-L de igual configuración. Los resultados obtenidos se muestran en las Figuras 6.4a (control) y 6.4b (digestato inoculado con *Btk*) y los valores de los parámetros principales del proceso FES se resumen en la Tabla 6.1.

La evolución de sOUR fue diferente a la observada en los reactores de 22-L, ya que el sistema con digestato inoculado con *Btk* (Figura 6.4b) solo alcanzó un máximo de sOUR de 0.90 ± 0.23 mg de O_2 $g^{-1}MS$ h^{-1} a las 24 h de operación. Después de ese período, la cantidad disminuyó a valores entre 0.60-0.8 mg de O_2 $g^{-1}MS$ h^{-1} . La temperatura promedio alcanzada en el sistema fue de $28 \pm 2^\circ C$, similar a los valores observados en el reactor de 22-L. El consumo acumulado de oxígeno durante cuatro días (COC) fue de 63.9 ± 6.34 mg de O_2 $g^{-1}MS$ h^{-1} . En este caso, la fermentación inoculada tuvo menor actividad biológica que el reactor control, el digestato sin inocular (Figura 6.4a), que mostró una sOUR de 1.70 mg de O_2 $g^{-1}MS$ h^{-1} y una temperatura máxima de $26 \pm 1^\circ C$. El aumento de los valores de sOUR, temperatura y COC en relación con el control fue de 0.52, 1.08 y 0.71 respectivamente.

Al igual que en el reactor de 22-L, hubo un aumento sOUR después del período de agitación, acompañado por el ligero aumento de temperatura correspondiente. Adicionalmente, se observó que la sOUR del control del reactor de 22-L fue menor que la obtenida en las fermentaciones inoculadas con *Btk*, aunque en el reactor de 100-L no debido a la presencia de microorganismos en la matriz del digestato. Las temperaturas

máximas en el reactor de 100-L, tanto en las inoculadas con *Btk* como en el control, fueron ligeramente más altas que las obtenidas en el reactor de 22-L.

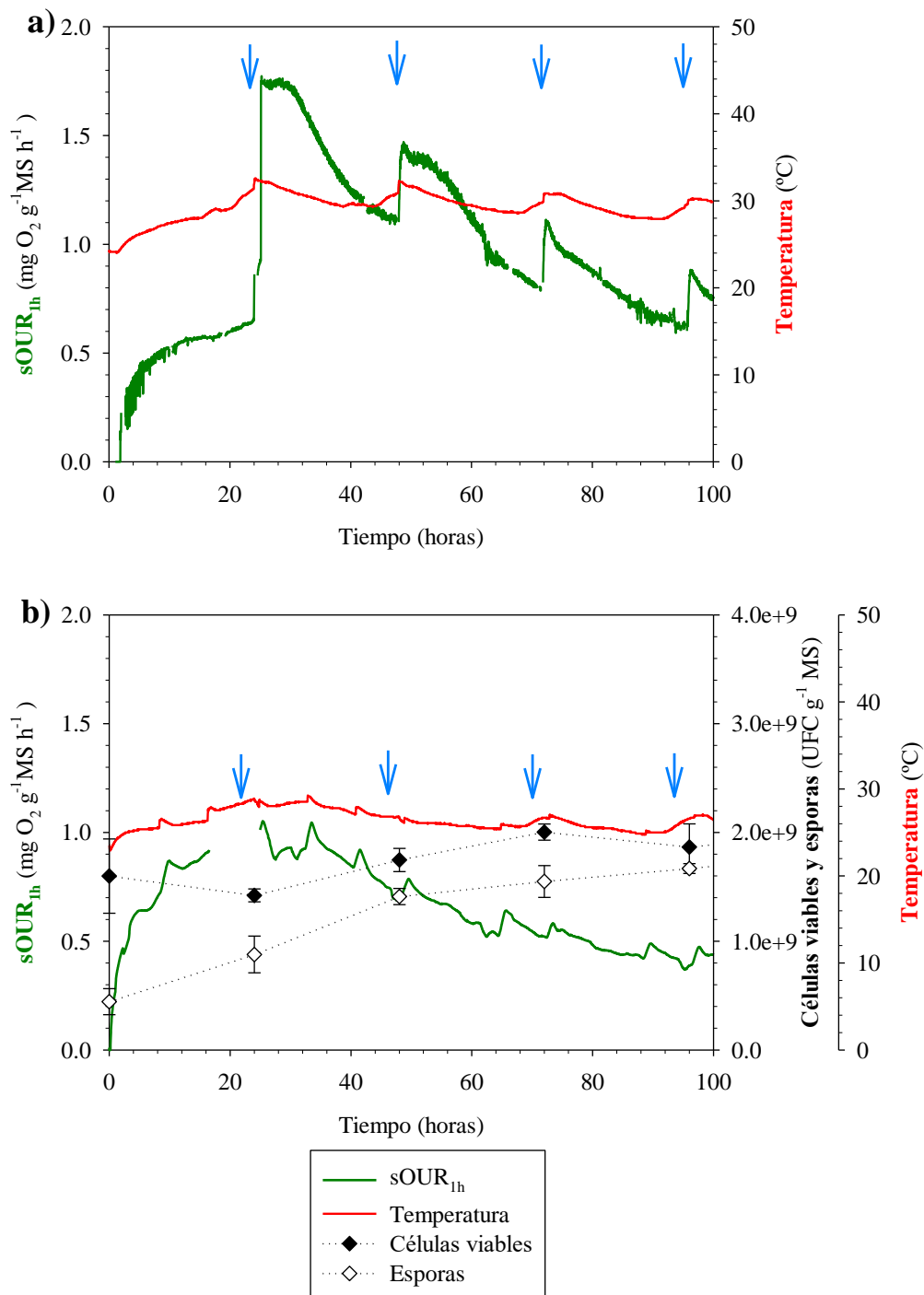


Figura 6.4. Evolución media de sOUR, temperatura, células viables y esporas en FES de digestato higienizado en condiciones no estériles en un reactor no aislado con agitación diaria de 100-L. Las flechas muestran los momentos de agitación. a) Reactor control. b) Reactor inoculado con *Btk*.

Los valores iniciales de células viables y esporas fueron $1.60 \pm 0.34 (10^9)$ UFC g^{-1} MS y $4.44 \pm 0.12 (10^8)$ esporas g^{-1} MS, respectivamente. Las células viables disminuyeron ligeramente durante las primeras 24 horas, aumentando posteriormente hasta el valor inicial al final de la fermentación ($1.87 \pm 0.21 (10^9)$ UFC g^{-1} MS). Mientras tanto, los recuentos de esporas aumentaron constantemente hasta el final de la fermentación, logrando valores promedio de $1.67 \pm 0.45 (10^9)$ esporas g^{-1} MS. Se obtuvieron incrementos de colonias y esporas al final de la fermentación de 1.2 y 3.8 veces, respectivamente, en comparación con los valores iniciales. Los valores de producción de esporas son similares a los reportados por El-Bendary (2006) cuando se trabaja en reactores de bandejas con residuos de remolacha azucarera y Zhang et al. (2013) trabajando con residuos de cocina y obteniendo valores en el rango de 10^9 esporas g^{-1} MS.

En la Figura 6.5 se muestra una comparación entre la producción de *Btk* en los diferentes reactores (10-L, 22-L y 100-L) de cada uno de los duplicados de digestato inoculando *Btk*. Los aumentos de células viables fueron similares en el reactor aislado de 10-L y en el reactor no aislado de 100-L mientras que los aumentos de esporas al final de la fermentación fueron mayores en el reactor aislado e iguales a 22-L y 100-L.

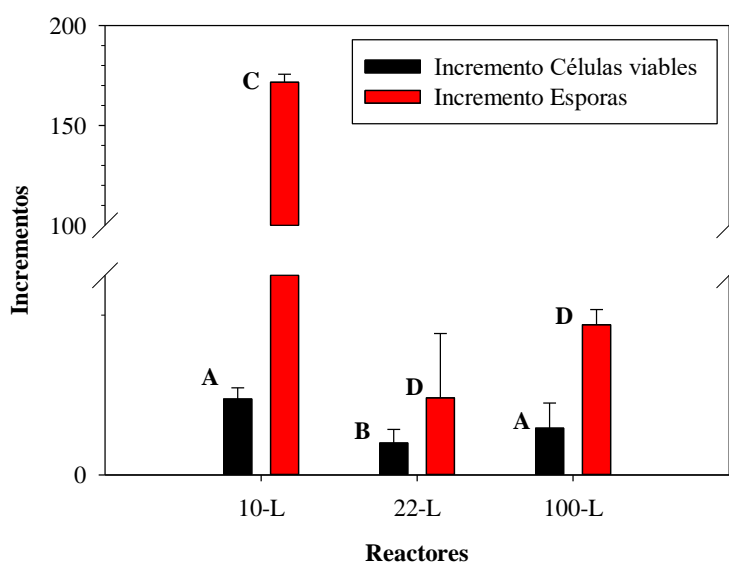


Figura 6.5. Incremento de células viables y esporas al final del proceso FES en los diferentes reactores respecto a los valores iniciales. Diferentes letras mayúsculas indican diferencias significativas entre los valores obtenidos ($p < 0.05$).

Los resultados obtenidos a escala de 100-L mostraron que el bioproceso propuesto para la producción de biopesticida a partir de *Bt* es técnicamente factible utilizando digestato no estéril como único sustrato. Además, los valores de producción están en el rango de lo publicado en la literatura, mostrando una ligera disminución en la relación de esporulación cuando se realiza el escalado (97% en un reactor de 22-L y 89% en un reactor de 100-L) (Tabla 6.1). Otros autores han informado de un efecto de escala significativo, al aumentar la cantidad de sustrato de 35 a 50 kg, la cantidad de biopesticida producido por *Bt* es menor en relación con las esporas y toxicidad debido a la menor transferencia de oxígeno en la matriz (Zhang et al., 2013). La diferencia con esta investigación fue agregar agitación diaria en el reactor para mejorar la transferencia de oxígeno y nutrientes para producir de biopesticida a partir de *Bt*, uno de los problemas asociados con el proceso de escalado.

6.3.5. Comprobación de la presencia de cristales proteicos de *Bacillus thuringiensis* variedad *kurstaki*

La Figura 6.6 presenta imágenes SEM (Scanning Electron Microscopy) de células *Btk*, esporas y cristales (toxinas) en el material al final del proceso FES de los reactores de 10-L. La Figura 6.6a muestra células viables y esporas utilizando el tamaño para diferenciarlas. De acuerdo con Iriarte y Caballero (2001), las células de *Bt* tienen una longitud de 3 a 5 μm y una anchura de 1 a 1.2 μm . En este trabajo, el tamaño de las células de *Btk* producidas en la FES con digestato fue de 3.26 μm y 1.19 μm de ancho. En la Figura 6.6b se circundan algunas esporas que presentan tamaños similares (1.64 μm de longitud y 0.54 μm de ancho) que las medidas indicadas por Smitha et al. (2013) también en un proceso FES, con valores que van desde 0.7 hasta 2.0 μm de longitud y desde 0.6 hasta 1 μm de ancho. Sin embargo, la toxicidad de *Bt* se encuentra en la formación del cristal proteico. Según lo explicado por Nair et al. (2018) *Btk* produce cristales bipiramidales y cuboides, como los que se pueden observar en la Figura 6.6c, donde estos cristales también han sido marcados.

En general, la presencia de cristales bipiramidales se asocia con cepas activas contra lepidópteros (Enger et al., 2018). El tamaño del cristal fue de 1.8 μm de longitud y 0.8 μm de ancho.

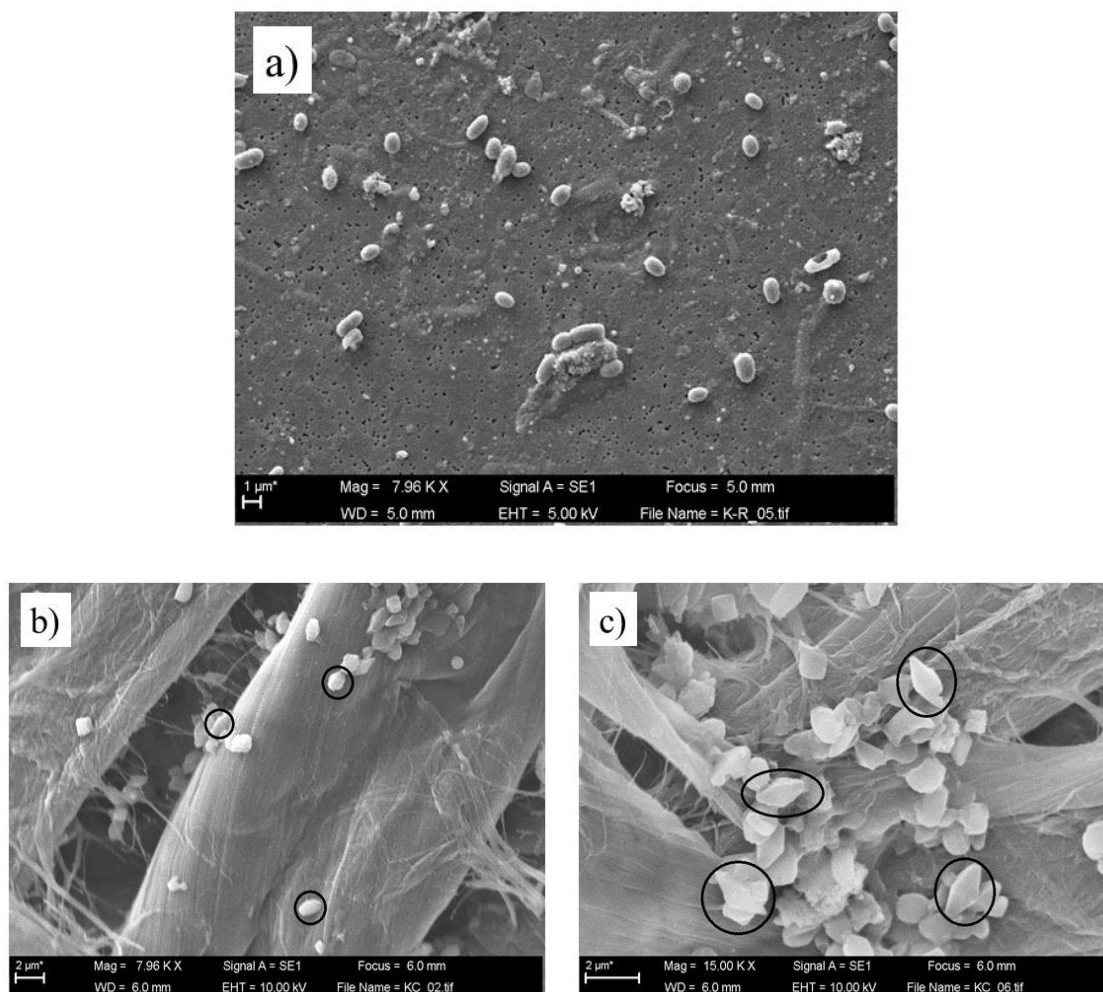


Figura 6.6. Imágenes de SEM de células viables, esporas y cristal de *Btk* en digestato al final del proceso FES. a) Células viables y esporas b) Esporas c) Cristal proteico de *Btk*

6.3.6. Almacenamiento y conservación del biopesticida

La Tabla 6.2 presenta los resultados obtenidos para diferentes condiciones de almacenamiento del biopesticida en forma sólida y líquida. Los resultados se expresan como el porcentaje de variación en el recuento de células viables y esporas en comparación con la muestra inicial. En este sentido, si el porcentaje fue un valor positivo implicaba que las células viables y esporas presentaban un aumento durante el almacenamiento en comparación con los valores iniciales. Por otro lado, si los porcentajes fueron negativos, esto implicaría que los valores de células viables y esporas disminuyeron en comparación con el contenido inicial.

Tabla 6.2. Porcentaje de supervivencia de las células viables y esporas después de conservar el biopesticida en estado líquido y sólido. CF: Cámara fría (4°C) y TA: Temperatura ambiente (22°C).

	7 días		30 días	
	Células Viables (%)	Esporas (%)	Células Viables (%)	Esporas (%)
SÓLIDO				
CF	20.40	-9.06	21.19	-1.62
TA	14.22	3.78	8.13	-0.07
LÍQUIDO				
TA 1:10	-10.33	-6.8	11.91	-25.80
TA 1:5	-8.03	0.08	-0.50	-5.26
TA 1:2	-22.06	-25.15	6.23	29.75
CF 1:10	-4.23	-21.93	57.65	18.80
CF 1:5	-3.42	-17.67	19.15	-33.64
CF 1:2	5.78	-21.46	20.34	-39.61

La muestra inicial se obtuvo de una FES llevada a cabo en un reactor térmicamente aislado de 10-L. Esta muestra contenía 4.92 ± 0.19 ($\cdot 10^8$) UFC g^{-1} MS para células viables y 6.35 ± 0.15 (10^8) esporas g^{-1} MS.

A los 7 días de almacenamiento cuando se almacena en forma sólida, las células viables incrementan su valor tanto a temperatura ambiente como a cámara fría, hasta un 20% en cámara fría, mientras que las esporas aumentan un 4% si se encuentra a temperatura ambiente y disminuyen en cámara fría. En cambio, en estado líquido tanto las células viables como las esporas disminuyen, excepto en el caso de almacenarse en cámara fría cuando la extracción se realizó con una proporción 1:2 (sólido:estructurante) donde se produce un aumento de células viables y una disminución en el número de esporas. Esta disminución podría atribuirse a la presencia de enzimas hidrolíticas (como las proteasas) que podrían afectar negativamente el recuento de células viables y esporas (Brar et al., 2007).

A partir de estos experimentos, se puede afirmar que, para el biopesticida en forma sólida, ambas estrategias de almacenamiento son adecuadas para la conservación de las células viables durante 30 días. Los experimentos de conservación en cámara fría a 4°C y a temperatura ambiente a los 30 días de almacenamiento mostraron un aumento del contenido en células viables del 21 y 8 % respectivamente, en comparación con la muestra

inicial. El contenido en esporas no mostró diferencias significativas a los 30 días de almacenamiento en comparación con el contenido inicial de esporas del sólido fermentado.

El biopesticida en forma líquida presentó un comportamiento diferente. Los mejores resultados se obtuvieron utilizando la relación de extracción de 1:10 y almacenadas en cámara fría durante un período de 30 días. Con esta estrategia, el recuento de células viables y esporas aumentó en 58 y 19% en comparación con la muestra original. No existen estudios previos sobre la mejor forma de mantener el biopesticida obtenido por FES a partir de residuos.

6.4. Conclusiones

El digestato se utilizó como materia prima para producir una enmienda orgánica con potencial biopesticida mediante FES utilizando *Btk* en condiciones no estériles. Se probaron dos tipos de reactores: reactor aislado térmicamente y no aislado con agitación. En ambos casos, *Btk* pudo colonizar y esporular, obteniendo un producto final a partir de digestato con actividad de biopesticida (cristales proteicos). Los porcentajes finales de esporulación de *Btk* fueron superiores al 84% en los reactores de 10-L, alcanzando el 97% en el reactor de 22-L. En todos los casos, el recuento final de células viables fue superior a 10^9 UFC g⁻¹ MS.

El proceso se escaló a un reactor de 100-L de lecho empacado sin aislamiento y con agitación observando una esporulación del 89% con un crecimiento de esporas 3 veces mayor que el inicial, mostrando producciones de biopesticida a partir de *Btk* comparables a las reportadas por otros autores.

El bioproducto obtenido se puede almacenar hasta 30 días tanto en forma sólida como líquida, pero siempre a una temperatura alrededor de los 4°C. Si se mantiene en líquido la extracción óptima fue de 1:10 con la solución salina de Ringer®, ya que las esporas se incrementan y éstas ayudan a incrementar el efecto biopesticida en las plagas, al contrario que en la muestra sólida donde las esporas tienden a disminuir.

Estos resultados mostraron que la producción de biopesticidas de *Bt* a partir de digestato de FORM es factible y que se pueden obtener altos niveles de producción a diferentes escalas y en diferentes condiciones operativas. Estos hallazgos también resaltan la importancia de la selección adecuada del reactor al escalar un proceso de FES.

CAPÍTULO 7

*Comparación de la producción de
biopesticidas entre dos cepas de Bacillus
thuringiensis mediante Fermentación en
Estado Sólido*

7.1. Introducción

En este capítulo se realiza una comparación, desde el Sistema de Fermentación I (reactores de 0.5-L) hasta el Sistema de Fermentación II en reactores de 10-L, entre dos cepas de *Bt*, *Bacillus thuringiensis* subespecie *kurstaki* (*Btk*) (con la que se ha trabajado hasta ahora) y *Bacillus thuringiensis* subespecie *israelensis* (*Bti*), que tiene efecto en otro tipo de plagas (dípteros) que atacan directamente a las plantas principalmente a nivel de raíz y tallo y por tanto, la aplicación del producto biopesticida se puede realizar directamente en forma de sólido al suelo a diferencia al *Btk* (Sanchis, 2011).

Como esta cepa aún no ha sido probada con digestato a través del proceso de FES se evalúa en primer lugar el crecimiento de *Bti* a escala de laboratorio de 0.5-L, de igual forma que se realizó con la cepa de *Btk*. Además, se estudia el efecto de la esterilización, la higienización y la congelación del digestato en la producción de células viables y esporas por *Btk* y *Bti*. Tanto la esterilización como la higienización se aplican para eliminar otros microorganismos y facilitar el desarrollo de *Bt*, en cambio la congelación se estudia para la posible conservación del digestato para poder trabajar con el mismo lote de digestato evitando variabilidad. La congelación se podría considerar también un pretratamiento, ya que según (Lund, 2000) rompe las membranas de células y deja más nutrientes disponibles. El sustrato que se estudió fue digestato usando palillos de madera como estructurante, tal y como se explicó en el Capítulo 3 (3.1.1. Sustratos y acondicionamiento). En estos experimentos se comparará la producción de células viables y esporas y la diferencia entre cada una de las cepas de *Bt*.

En base a estudios anteriores de Ballardo et al., (2017), en los que se utilizó FORM para producir biopesticida a partir de *Btk* y los resultados obtenidos en los capítulos anteriores con *Btk* y digestato, se optó por intentar incrementar la cantidad de biopesticida obtenido a partir de *Bt* con una mezcla de digestato y FORM en una proporción (50:50). Después de evaluar los efectos a escala de laboratorio y en relación con los experimentos realizados en el Capítulo 5 con reactores aislados de 10-L en los que se produce un incremento de temperatura cuando estos se llenan completamente, se decide estudiar el crecimiento de ambas cepas en los reactores aislados de 10-L llenados a la mitad de su capacidad, es decir con 1.5 kg. Al dejar un espacio libre de aire en el reactor se permite la disipación del aire, no produciendo tantos condensados y por lo tanto no se

incrementará tanto la temperatura. Para comparar, estas pruebas se realizaron con dos tipos de sustrato: digestato y digestato con FORM (50:50).

Para finalizar este capítulo se evaluarán los cristales producidos en la fermentación separando los cristales del resto del material, ya que son estos los que tienen el efecto biopesticida. Posteriormente, se observaron por SEM los cristales producidos de ambas cepas en las fermentaciones con digestato y FORM de los reactores de 10-L y se compararon con un producto de *Bt* comercial y con datos bibliográficos.

7.2. Metodología

7.2.1. Microorganismos

En este capítulo todos los experimentos para la obtención del biopesticida han sido realizados con dos cepas diferentes de *Bt*, *Btk* y *Bti*.

7.2.2. FES en reactores de 0.5-L

Se realizaron fermentaciones de digestato para cada una de las variedades de *Bt* (*Btk* y *Bti*). Para cada una de ellas se evaluó la influencia de la esterilización, higienización y congelado del digestato en el crecimiento de *Bt* (Figura 7.1). Todas las fermentaciones se realizaron por triplicado.

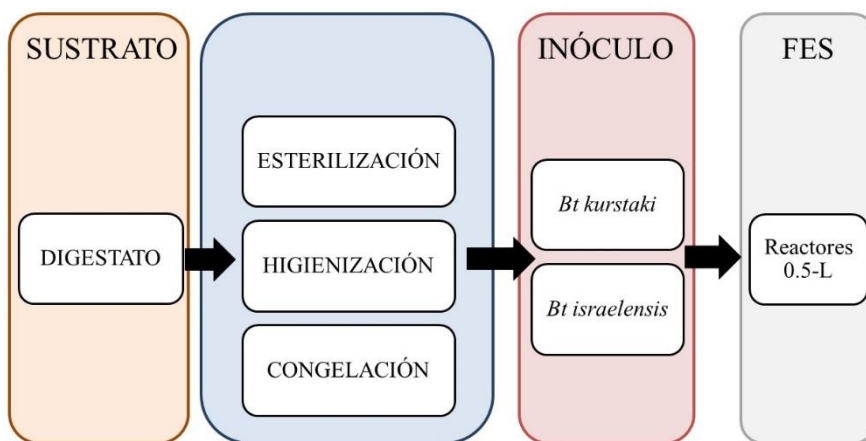


Figura 7.1. Esquema para las fermentaciones a escala de laboratorio con *Btk* y *Bti*.

Las fermentaciones se llevaron a cabo con el Sistema de Fermentación I en reactores de 0.5-L, durante 4 días con un caudal de aire de 20 mL min⁻¹ y una temperatura de 30 °C. Las mezclas se realizaron en relación de peso húmedo y fueron: digestato (75%) y palillos de madera (25%) con una cantidad de muestra total de 115 g. Los ratios de inóculo utilizados fueron de 0.0030 g *Bt* g⁻¹ digestato.

7.2.3. FES en reactores de 10-L

Todas las fermentaciones se llevan a cabo en condiciones no estériles durante 4 días con el Sistema de Fermentación II en reactores aislados térmicamente de 10-L, explicados en el Capítulo 3 apartado 3.2.2. El experimento consistió en la comparación de cada una de las variedades de *Bt* (*Btk* y *Bti*) en dos tipos diferentes de mezcla.

Los sustratos utilizados fueron: digestato (75%) y astillas de madera (25%); y digestato (37.5%), FORM (37.5%) y astillas de madera (25%), todas las relaciones de sustratos se hacen en base al peso húmedo del sustrato total. En todos los experimentos la mezcla fue higienizada. Los ratios de inóculo utilizados fueron de 0.0030 g *Bt* g⁻¹ sustrato. Los experimentos se realizaron por duplicado para cada una de las muestras y para cada una de las cepas de *Bt*. La cantidad total del material en el reactor fue de 1.5 kg. El caudal de aire se encontró entre 400 y 600 mL min⁻¹.

7.2.4. Caracterización del cristal proteico

Para evaluar la presencia del cristal proteico de *Bt* se utilizaron dos técnicas diferentes con los fermentados de digestato y FORM de los reactores de 10-L de ambas cepas.

La primera fue la separación de espора y cristal detallada por Rahbani-Mounsef et al. (2014b) con una purificación con hexano y centrifugación, aplicando después una tinción de azul Comassie del cristal, analizando tanto las muestras fermentadas, como los inóculos de cada una de las cepas, y el producto comercial Bactur® de *Btk* como referencia.

La segunda técnica fue acondicionar las muestras para observarlas en el microscopio electrónico de barrido (SEM), como ya se explicó en el Capítulo 3 y se compararon con el producto comercial Bactur®. El producto comercial Bactur® 2X WP es un insecticida biológico en el que la materia activa está constituida por el complejo “espора+cristal” de la bacteria *Bacillus thuringiensis* Berliner. Se produce a partir de una cepa del serotipo

3a3b (variedad *Kurstaki*) el cual presenta una actividad altamente selectiva contra larvas de lepidópteros.

7.2.5. Análisis estadístico

Para evaluar los efectos de higienización, esterilización y congelado del digestato se utiliza una prueba ANOVA, que permitirá determinar si estas operaciones son significativamente importantes sobre el incremento de células viables y la relación de esporas y células viables al final del proceso.

7.3. Resultados y discusión

7.3.1. FES en reactores de 0.5-L: influencia de higienización, esterilización y congelado del sustrato en el proceso

Se evaluó la actividad biológica del material después de esterilización, higienización y congelación para evaluar el comportamiento del digestato en FES para cada uno de ellos, y el posible efecto cuando se utiliza para producir biopesticida a partir de *Bt*. Los valores que se presentan en la Figura 7.2 son los perfiles de actividad biológica del digestato después de cada una de las operaciones descritas, es decir los controles para compararlos con el resultado a obtener cuando se inocula una cepa u otra de *Bt* para cada uno de ellos.

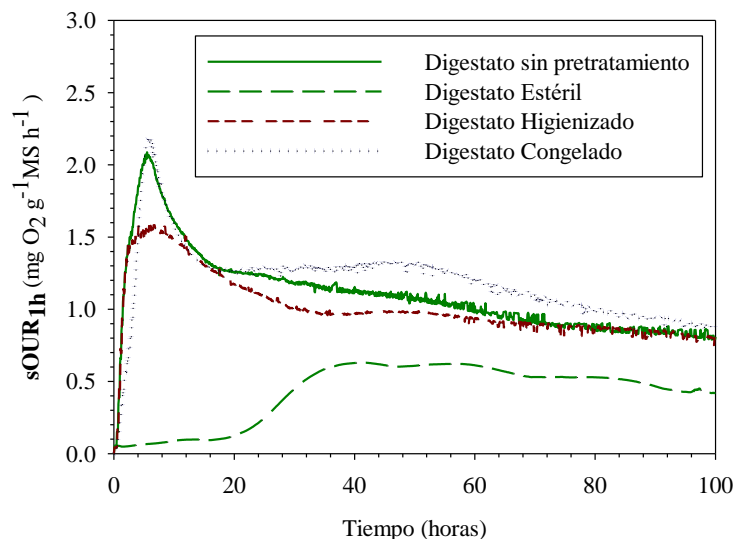


Figura 7.2. Evolución media de sOUR en FES de digestato en reactor de 0.5-L. Comparación entre digestato, digestato estéril, digestato higienizado y digestato congelado

Según Pognani et al. (2012) los índices respirométricos de una muestra no se ven afectados después de un año de congelación (Barrena et al., 2011). Esta observación se ve corroborada con el digestato y digestato congelado que se presentan en la Figura 7.2, ya que el valor de sOUR obtenido para el digestato es de $2.01 \text{ mg O}_2 \text{ g}^{-1}\text{MS h}^{-1}$ y para el digestato congelado $2.17 \text{ mg O}_2 \text{ g}^{-1}\text{MS h}^{-1}$, obteniendo estos valores máximos a las 5 horas de proceso. En cambio, cuando el residuo se somete a un proceso de esterilización su actividad biológica disminuye drásticamente hasta $0.62 \text{ mg O}_2 \text{ g}^{-1}\text{MS h}^{-1}$ a las 40 horas, ya que se han eliminado casi todos los microorganismos inicialmente presentes en el residuo. El digestato higienizado también tiene una actividad menor que el residuo inicial, pues este tratamiento se realiza para eliminar patógenos del residuo observándose un valor de sOUR $1.56 \text{ mg O}_2 \text{ g}^{-1}\text{MS h}^{-1}$. Estas diferencias de actividad biológica se pueden reflejar a la hora de inocular el sustrato un microorganismo como *Bt*.

7.3.1.1. Efecto de esterilización del digestato en FES

La cepa de *Btk* ya fue estudiada y analizada en el Capítulo 4. A continuación, se realizará un resumen de los resultados obtenidos comparándolos con la cepa de *Bti* para cada uno de los tratamientos realizados. Todos los resultados de los experimentos realizados en reactores de 0.5-L se recogen en la Tabla 7.1.

En la Figura 7.3a se observa como las fermentaciones con digestato estéril inoculando *Btk* muestran la máxima sOUR alrededor de las 9 horas de operación con un valor de $0.80 \pm 0.08 \text{ mg O}_2 \text{ g}^{-1}\text{MS h}^{-1}$ y decrece hasta el final del proceso, presentando otro pico menor a las 20 horas del proceso, debido probablemente a la actividad de otros microorganismos presentes en el digestato que no fueron eliminados en la esterilización. En el caso de las fermentaciones con digestato estéril inoculando *Bti* (Figura 7.3b) el valor máximo de sOUR es de $1.03 \pm 0.25 \text{ mg O}_2 \text{ g}^{-1}\text{MS h}^{-1}$ a la 1.5 horas de comenzar el proceso de FES, ligeramente superior que al que se produce con *Btk*. En ambos casos, si se compara con el control (Figura 7.2), se producen unos incrementos de 1.29 y 1.67 para las fermentaciones inoculando *Btk* y *Bti*, respectivamente, debidos al efecto de inocular *Bt* en el sustrato (digestato estéril y astillas de madera).

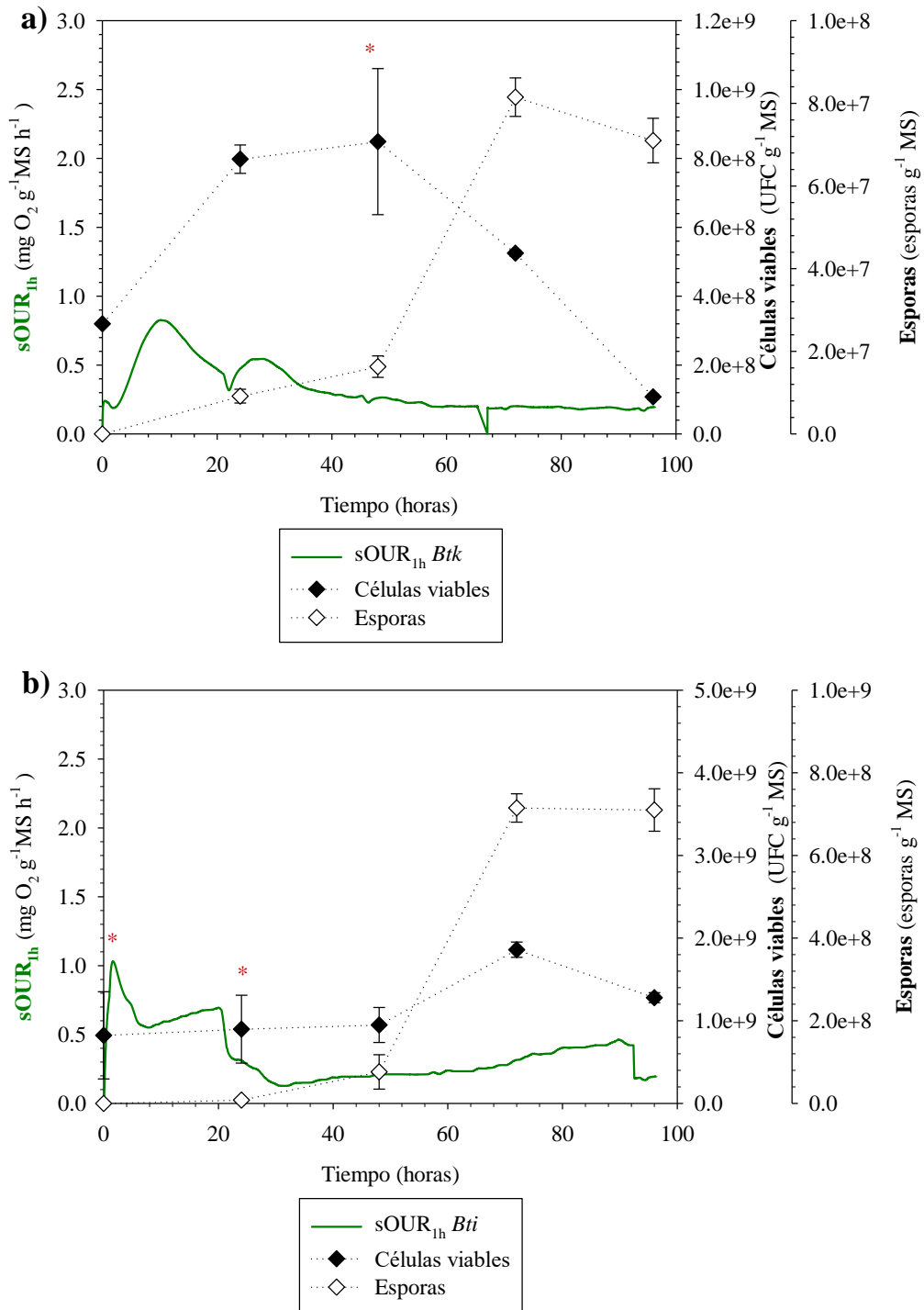


Figura 7.3. Perfiles de sOUR, células viables y esporas obtenidos en reactores de FES de 0.5-L con digestato estéril como sustrato para la producción de biopesticidas. Los valores representados corresponden a la media de tres fermentaciones independientes. Los puntos experimentales con un asterisco indican una desviación alta ($p > 0.05$). a) Inoculado con *Btk*. b) Inoculado con *Bti*.

Si se analiza la producción de células viables y esporas para cada una de las cepas el comportamiento es similar en ambas. En la Figura 7.3a con *Btk* las células viables se incrementan en las primeras 48 horas y posteriormente decrecen hasta un valor de $1.08 \pm 0.80 (10^8)$ UFC g^{-1} MS, mientras que las fermentaciones comienzan sin presencia de esporas en la matriz sólida, siendo solo detectadas a partir de la primera muestra a las 24 horas de la fermentación, con un máximo a las 72 horas con valores de $8.15 \pm 0.46 (10^7)$ esporas g^{-1} MS. Después de ese período, el recuento de esporas se mantuvo casi estable hasta el final de la fermentación.

En el caso de la cepa de *Bti* (Figura 7.3b), las células viables se mantienen constantes desde un valor de $8.23 \pm 0.53 (10^8)$ UFC g^{-1} MS hasta las 48 horas, incrementándose a las 72 horas del proceso con un valor de $1.86 \pm 0.49 (10^9)$ UFC g^{-1} MS, es decir que alcanzan valores superiores a las que se producen con *Btk* en las mismas condiciones. El perfil de esporas para la fermentación de *Bti* tiene un comportamiento similar al de *Btk*, carente de esporas en el inóculo y comenzando el proceso de esporulación a las 48 horas, el valor máximo de conteo de esporas se produce a las 72 horas con un valor de $7.10 \pm 0.54 (10^8)$ esporas g^{-1} MS.

Así, en la cepa de *Btk* el incremento máximo que se produce de células viables es de 2.65 veces la inicial a las 48 horas, pero al final del proceso disminuyen hasta 0.34 y con la cepa de *Bti* se produce un incremento al final del proceso de 1.55. Este incremento al final del proceso de células viables de *Bti* con digestato ocurría igual que en el medio de cultivo con nutriente Broth, puesto que la velocidad de crecimiento de *Bti* es mayor (se encuentra detallado en el Capítulo 3, apartado 3.1.2.2. Preparación del inóculo: reactores de 0.5-L). El aumento de esporas es superior en un orden de magnitud en *Bti* que en la matriz sólida con *Btk*. De aquí se podría afirmar que *Bti* tendría mayor efecto biopesticida que *Btk*, ya que el número de esporas es superior y éstas se han relacionado con el efecto biopesticida del cristal proteico (Bravo et al., 2011). El porcentaje de esporulación que se produce en cada caso es de un 66 y un 55% respectivamente, *Btk* y *Bti*.

Tabla 7.1. Principales parámetros de la FES en el Sistema de Fermentación I con digestato estéril, higienizado y congelado, inoculados con *Btk* y *Bti*.

Parámetros	Unidades	<i>Btk</i>			<i>Bti</i>		
		Estéril	Higienizado	Congelado	Estéril	Higienizado	Congelado
Humedad inicial	(%, bh)	67.0±0.2	62.5±0.4	65.9±0.3	67.0±0.2	62.5±0.4	65.9±0.3
Humedad final	(%, bh)	69.9±0.8	71.9±0.7	67.0±0.2	69.9±0.8	71.9±0.7	67.0±0.2
Materia orgánica inicial	(%, bh)	75.0±0.5	60.3±0.7	64.3±0.2	75.0±0.5	60.3±0.7	64.3±0.2
Materia orgánica final	(%, bh)	61.0±0.7	65.0±0.5	55.8±0.9	61.0±0.7	65.0±0.5	55.8±0.9
pH inicial (1:5)	-	8.85±0.01	8.83±0.01	8.90±0.01	8.85±0.01	8.83±0.01	8.90±0.01
pH final(1:5)	-	8.76±0.01	8.81±0.01	8.72±0.01	8.76±0.01	8.81±0.01	8.72±0.01
CE inicial (1:5)	(mS cm ⁻¹)	1.92±0.01	1.84±0.01	1.93±0.01	1.92±0.01	1.84±0.01	1.93±0.01
CE final (1:5)	(mS cm ⁻¹)	2.15±0.01	2.10±0.01	2.32±0.01	2.15±0.01	2.10±0.01	2.32±0.01
sOUR	(mg O ₂ g ⁻¹ DM h ⁻¹)	0.80±0.08	2.70±0.52	2.02±0.83	1.03±0.25	1.51±0.60	1.23±0.90
COC	(mg O ₂ g ⁻¹ DM)	100	134.6	253.8	90.45	123.45	263.67
Células viables iniciales	(UFC g ⁻¹ DM)	3.20±0.10·(10 ⁸)	1.59±0.10·(10 ⁸)	3.84±0.23·(10 ⁸)	8.23±0.53·(10 ⁸)	6.03±0.53·(10 ⁸)	4.47±0.40·(10 ⁸)
Células viables finales	(UFC g ⁻¹ DM)	1.08±0.80·(10 ⁸)	1.10±0.35·(10 ⁸)	7.62±0.23·(10 ⁸)	1.28±0.80·(10 ⁹)	7.60±0.35·(10 ⁸)	1.62±0.23·(10 ⁹)
Máx Células viables (72h)	(UFC g ⁻¹ DM)	8.49±0.21·(10 ⁸) a	2.08±0.10·(10 ⁸) b	9.25±0.86·(10 ⁸)	1.86±0.49·(10 ⁹)	2.01±0.54 (10 ⁹)	2.80±0.12·(10 ⁹)
Esporas iniciales	(esporas g ⁻¹ DM)	-	-	-	-	-	-
Esporas finales	(esporas g ⁻¹ DM)	7.10±0.53·(10 ⁷)	3.41±0.34·(10 ⁷)	1.31±0.27·(10 ⁷)	7.10±0.54·(10 ⁸)	7.91±0.24·(10 ⁷)	4.31±0.23·(10 ⁸)
Máx Esporas (72h)	(esporas g ⁻¹ DM)	8.15±0.46·(10 ⁷)	4.49±0.43·(10 ⁷)	1.31±0.27·(10 ⁷) c	7.15±0.43·(10 ⁷)	8.40±0.43·(10 ⁷)	7.15±0.23·(10 ⁸)
Esporulación (96h)	(%)	66	31	2	55	10	27

a: Máxima actividad de células viables es a las 48 horas.

b: Máxima actividad de células viables es a las 24 horas.

c: Máxima actividad de células viables es a las 96 horas.

UFC: Unidades formadores de colonias.

7.3.1.2. Efecto de higienización del digestato en la FES

En la Figura 7.4 se muestran los resultados de los procesos de FES de digestato higienizado inoculando *Btk* (Figura 7.4a) y *Bti* (Figura 7.4b). La primera cepa de *Btk* se encuentra representada en el Capítulo 4 donde se observó que el *Btk* es capaz de sobrevivir en el digestato higienizado.

La Figura 7.4a presenta la actividad biológica del digestato higienizado inoculado con *Btk*. Se observa un aumento más rápido y elevado en la sOUR que en condiciones estériles, debido a la mayor presencia de poblaciones microbianas en los reactores. El valor máximo de sOUR se encontró a las 4.5 horas con un valor promedio de 2.70 ± 0.52 mg O₂ g⁻¹ MS h⁻¹. La Figura 7.4b presenta una actividad biológica menor con un valor de sOUR de 1.51 ± 0.60 mg O₂ g⁻¹ MS h⁻¹ correspondiente a *Bti*. Es decir, en el caso de *Btk* el valor de sOUR se incrementó respecto al control 2.62 veces, mientras que el *Bti* fue de 1.46.

El perfil de células viables y esporas para *Btk* (Figura 7.4a) tiene su máximo crecimiento celular a las 24 h con un recuento de células viables de 2.08 ± 0.10 (10⁸) UFC g⁻¹ MS, que representa un aumento de 1.31 veces respecto al recuento celular inicial. Después de ese momento, las células viables disminuyeron hasta el final de la fermentación a valores de 1.10 ± 0.35 (10⁸) UFC g⁻¹ MS. Mientras, para la cepa de *Bti* (Figura 7.4b) el máximo valor de células viables se produjo a las 72 horas del proceso con un valor de 2.01 ± 0.54 (10⁹) UFC g⁻¹ MS, incrementándose su valor 3.34 veces la inicial.

En cuanto a la producción de esporas, la fermentación comenzó sin esporas en ambos casos. El contenido detectado de esporas en el digestato con *Btk* (Figura 7.4a) se observó después de las primeras 24 h de operación, cuando las células viables comenzaron a disminuir y las esporas aumentaron. El número de esporas alcanzaron su máximo a las 72 h de fermentación, con un valor de 4.49 ± 0.43 (10⁷) esporas g⁻¹ MS. En la Figura 7.4b, la cantidad de esporas en *Bti* aumentaron a las 24 horas con un valor de 9.55 ± 0.34 (10⁵) esporas g⁻¹ MS hasta su máximo a las 72 horas del proceso consiguiendo un valor de 8.40 ± 0.43 (10⁶) esporas g⁻¹ MS.

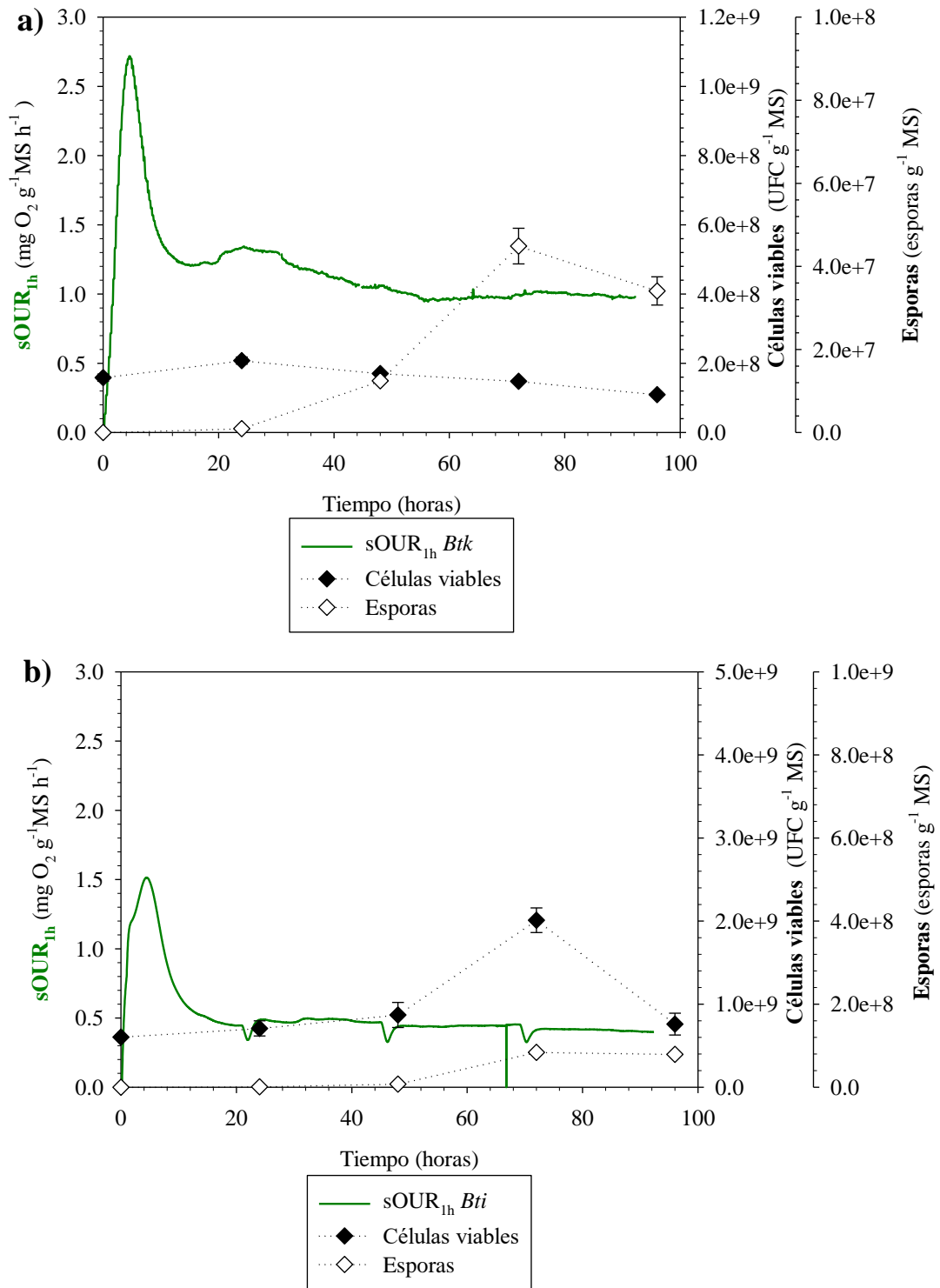


Figura 7.4. Perfiles de sOUR, células viables y esporas obtenidos en reactores de FES de 0.5-L con digestato higienizado como sustrato para la producción de biopesticidas. Los valores representados corresponden a la media de tres fermentaciones independientes. a) Inoculado con *Btk*. b) Inoculado con *Bti*.

Al igual que ocurre con el medio comercial, en la fermentación líquida, *Bti* crece de forma más rápida en el digestato higienizado incrementando el número de células viables, pero el proceso de esporulación es más lento que en *Btk*, siendo el valor de esporas de *Bti* dos órdenes de magnitud inferiores al *Btk*, teniendo, como valores de esporulación al final del proceso de 31 y 10% respectivamente para el *Btk* y *Bti*. En los dos casos, digestato estéril o higienizado, los valores que se producen de células viables y esporas con el *Bti* son relativamente bajos en comparación con otros estudios como es el de Wu et al. (2014) donde se producen unos valores a escala de laboratorio hasta $1.25 \pm 0.6 \cdot (10^{11})$ UFC g⁻¹ MS y $9.5 \pm 0.5 \cdot (10^{10})$ esporas g⁻¹ MS cuando se trabaja con un medio optimizado de residuo para el crecimiento de hongos.

7.3.1.3. Efecto de congelación del digestato en la FES

El digestato se congela para poder trabajar con lotes iguales de sustrato y tener menor variabilidad de los experimentos, ya que al trabajar con un residuo tan heterogéneo y con una gran cantidad de microorganismos resulta difícil conseguir las características óptimas para el crecimiento de *Bt*.

En el digestato congelado de la Figura 7.2 se ha encontrado un valor de actividad de 2.17 mg O₂ g⁻¹ MS h⁻¹ similar, al digestato sin tratamiento. Cuando se inocula el *Bt* se observa que tanto en el digestato congelado inoculado con *Btk* como con el de *Bti* los valores de sOUR son menores que en el control. En la Figura 7.5a, la fermentación de digestato congelado inoculado con *Btk* presenta un pico a las 6.5 horas del comienzo del proceso y un valor de sOUR de 2.02 ± 0.83 mg O₂ g⁻¹ MS h⁻¹, este pico disminuye también, con la curva característica de un digestato, llegando al final del proceso a valores de 0.90 mg O₂ g⁻¹ MS h⁻¹. En el caso de la cepa de *Bti* con un digestato congelado (Figura 7.5b) el pico se produce a las 5 horas con un valor de sOUR de 1.23 ± 0.90 mg O₂ g⁻¹ MS h⁻¹ muy similar al digestato higienizado con la misma cepa de *Bti*. En ambos casos, disminuye la actividad respecto al control en 0.93 y 0.55 veces la inicial, pudiendo ser debido a que los microorganismos presentes sin inocular *Bt* e inoculando varían en el digestato cambiando la actividad biológica que se produce en el proceso de FES.

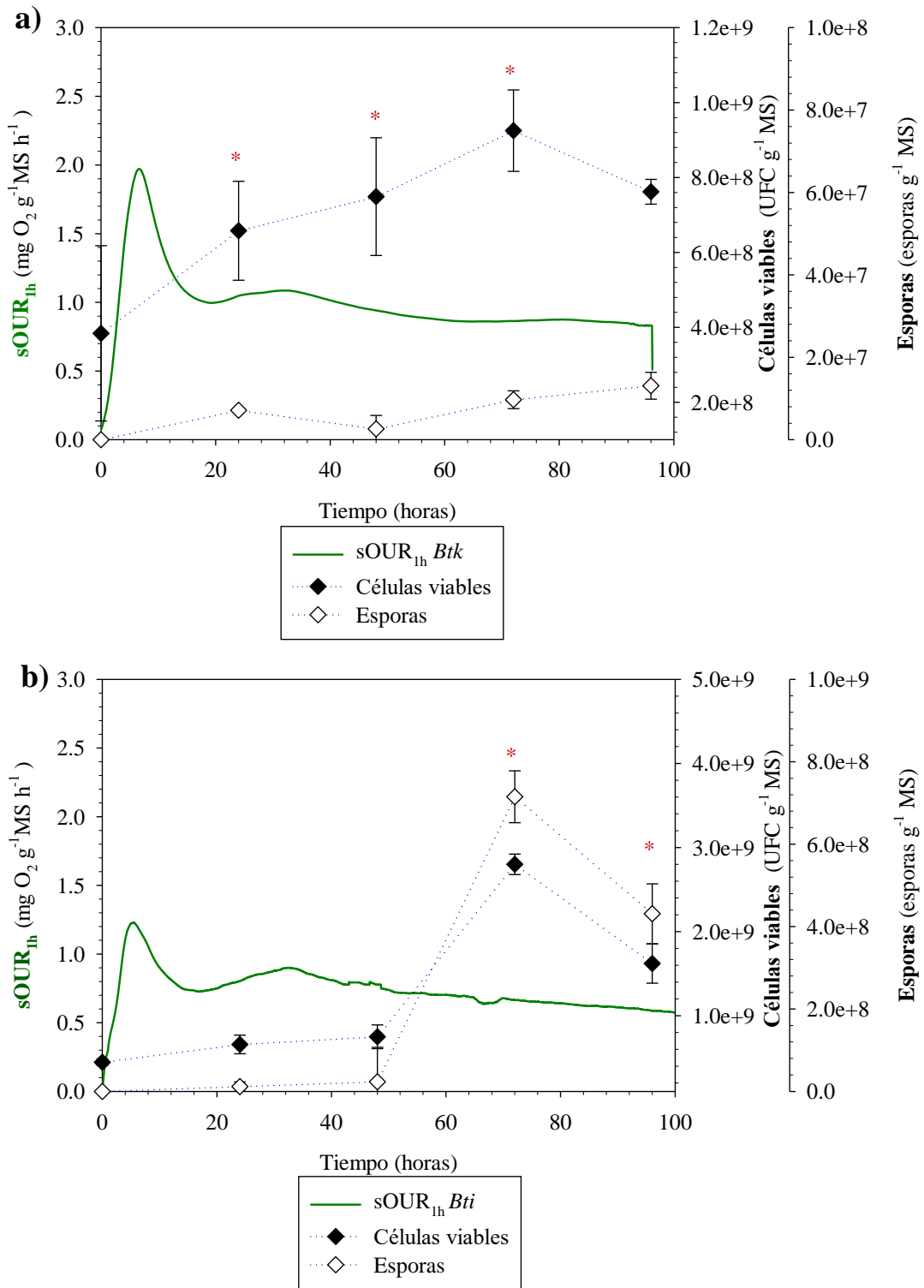


Figura 7.5. Perfiles de sOUR, células viables y esporas obtenidos en reactores de FES de 0.5-L con digestato congelado como sustrato para la producción de biopesticidas. Los valores representados corresponden a la media de tres fermentaciones independientes. a) Inoculado con *Btk*. b) Inoculado con *Bti*.

Para la producción de células viables y esporas en *Btk* (Figura 7.5a) en el digestato congelado, el comportamiento es diferente a las estudiadas antes, el valor inicial de células viables es de $3.84 \pm 0.23 \cdot (10^8)$ UFC g^{-1} MS incrementándose a lo largo de todo el proceso de FES y a las 72 horas este valor es de $9.25 \pm 0.86 \cdot (10^8)$ UFC g^{-1} MS, produciéndose un incremento de células viables de 2.41 veces. En cambio, el valor de esporas alcanza su máximo a las 96 horas con un valor de $1.31 \pm 0.23 (10^7)$ esporas g^{-1} MS, es decir, al final del proceso, debido a la limitación de nutrientes, haciendo que parte de las células viables esporulen durante el proceso de FES.

En el caso de la cepa de *Bti* (Figura 7.5b) las células viables comienzan con un valor de $4.47 \pm 0.40 \cdot (10^8)$ UFC g^{-1} MS incrementándose hasta las 72 horas a un valor de $2.80 \pm 0.12 \cdot (10^9)$ UFC g^{-1} MS, es decir un incremento de 6.2 veces la inicial. El valor de esporas a las 72 horas no llega a ser tan elevado como en el caso estéril, pero sí de la misma magnitud, siendo de $4.31 \pm 0.28 \cdot (10^8)$ esporas g^{-1} MS, ya que puede ser que tanto en el estéril como en el congelado exista menor competencia microbiana y *Bti* pueda colonizar toda la matriz sólida. El incremento que se produce de células viables en el caso de *Bti* es muy superior al de la cepa de *Btk*, mientras que el porcentaje de esporulación que se produce cuando el digestato se encuentra congelado es de un 10% en *Btk* y de un 27% en el caso del *Bti*.

7.3.1.4. Comparación entre tratamientos

Los tratamientos realizados al digestato antes de inocular *Bt* para producir un bioproducto con efecto biopesticida tienen diferentes efectos como se ha podido observar en los apartados anteriores. Cuando se trabaja con digestato estéril, esta esterilidad ayuda a la supervivencia y colonización de *Btk* y *Bti* a toda la matriz sólida, pero a medida que pasa el tiempo de proceso los microorganismos que no han sido eliminados en la esterilización pueden aparecer, compitiendo por los nutrientes con *Bt* y limitando su crecimiento. El digestato congelado es una buena alternativa para poder almacenar el material sin que éste pierda los nutrientes necesarios para el crecimiento del *Bt* (Paavola y Rintala, 2008). Con un digestato higienizado ya se comprobó en el Capítulo 4 que *Btk* era capaz de sobrevivir y esporular en un proceso de FES, al igual que ocurre ahora con *Bti*. La higienización es obligatoria para eliminar patógenos como se recoge en el Reglamento EU Regulation 142/2011, y en comparación con la esterilización supone menores costes asociados al proceso de FES. A continuación, se muestran los incrementos de células

viables y esporas de cada uno de los tratamientos para cada cepa *Btk* (Figura 7.6a) y *Bti* (Figura 7.6b).

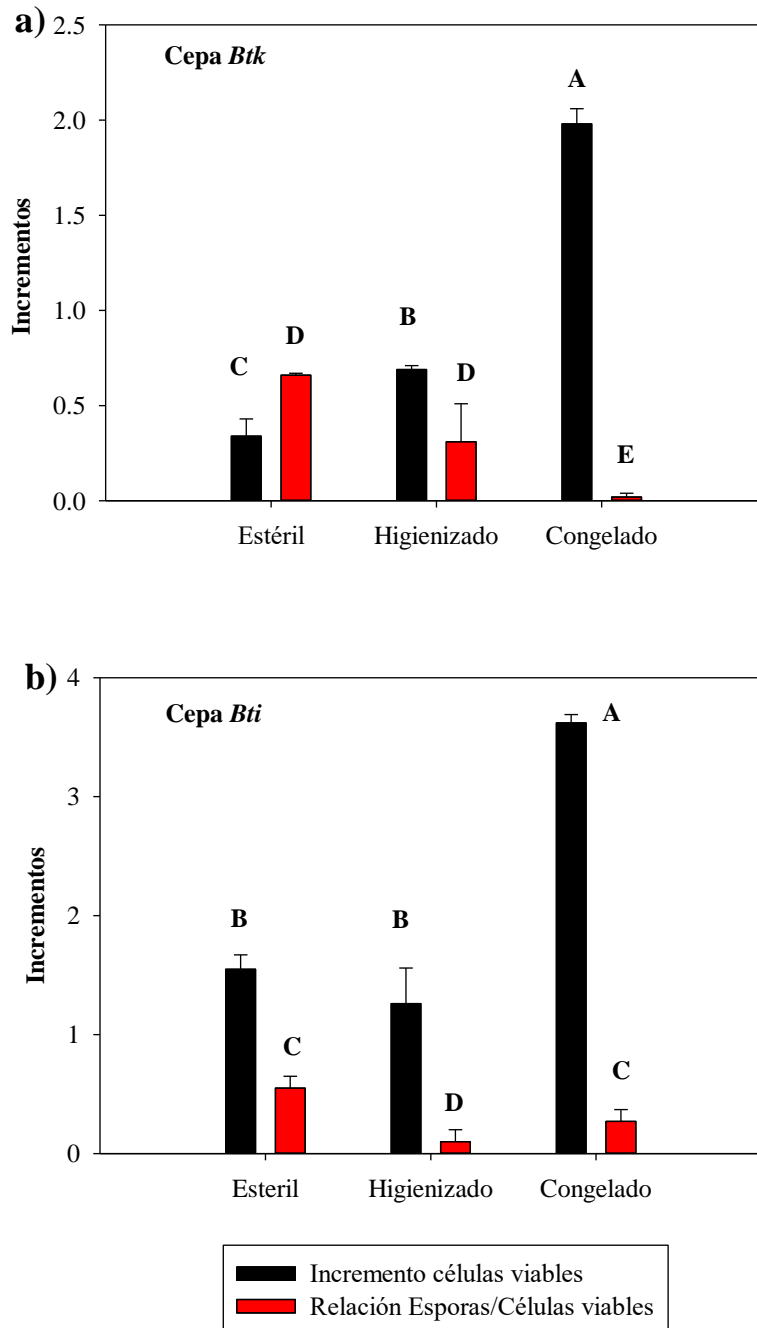


Figura 7.6. Incremento de células viables y relación de esporas y células viables al final del proceso FES inoculado con *Bt* usando como sustrato digestato para cada tratamiento estudiado. Diferentes letras mayúsculas indican diferencias significativas entre los valores obtenidos ($p < 0.05$). a) Cepa de *Btk*. b) Cepa de *Bti*.

La Figura 7.6a muestra el resultado de la FES de digestato con la cepa de *Btk* habiendo pasado por los distintos tratamientos. En esta figura se refleja que el incremento de células viables al final de la FES respecto al inicial varía de un tratamiento a otro, siendo el que mayor incremento de células viables produce el digestato congelado con un 1.98 veces la inicial. En la figura se muestra también relación de esporas con células viables obteniendo una relación menor con digestato congelado y siendo estadísticamente parecidas para el digestato estéril e higienizado.

En la Figura 7.6b se muestran los incrementos de células viables y la relación de esporas y células viables para la FES sobre digestato previamente esterilizado, higienizado y congelado con la cepa de *Bti*. Se puede ver que según el incremento de células viables ambas cepas se comportan igual, el incremento es superior cuando se trabaja con un digestato congelado donde se llega hasta un incremento de 3.62, en este caso. Esto puede ser debido a que otros microorganismos, contenidos en el digestato pueden ser susceptibles a la congelación y en el momento de inocular *Bti* los nutrientes quedan disponibles para su desarrollo. En cambio, para las esporas, trabajar con digestato estéril y congelado serían las mejores opciones, observándose que con digestato congelado el valor de esporas llega a ser de $7.15 \pm 0.23 \cdot (10^8)$ esporas g^{-1} MS a las 72 horas del proceso de FES, el más elevado de todos los procesos de FES.

El digestato se puede conservar mediante congelación si se quiere evaluar sobre un mismo lote de digestato el crecimiento de *Bt*, ya que se observa que no se alteran las propiedades del digestato cuando se conserva congelado durante un mes. Como pretratamiento tanto congelado como esterilizado supone costes demasiados altos, mientras que la higienización es necesaria (EU Regulation 142/2011). En todos los casos, esterilizado, higienizado y congelado la cepa de *Bti* crece más rápido y en mayor cantidad que *Btk*.

7.3.2. Sistema de Fermentación II: reactores aislados térmicamente de 10-L

Después de los resultados del Sistema de Fermentación I (reactores de 0.5-L) con digestato inoculando cada una de las cepas de *Bt* y las conclusiones obtenidas en el Capítulo 5 de las estrategias de operación con el Sistema de Fermentación II (reactores de 10-L). Se decide estudiar si al trabajar con un material con mayor carga de materia orgánica y con más nutrientes puede incrementar la producción de *Bt* y con ello el efecto

biopesticida. En este caso y para seguir las pautas del Proyecto DECISIVE, se evalúa trabajar con una mezcla de sustrato, es decir, digestato y FORM con una relación 50:50, llenados hasta la mitad para disminuir el incremento de temperatura que se produce.

7.3.2.1. *Bacillus thuringiensis* variedad *kurstaski*

La Figura 7.7 muestra los resultados del proceso de FES en el Sistema de fermentación II con reactores aislados térmicamente de 10-L: uno contiene como sustrato digestato (Figura 7.7a) y otro digestato y FORM (Figura 7.7b) inoculados con *Btk*. En la Tabla 7.2 se recogen todos los valores de los distintos parámetros característicos del proceso de FES.

En la Figura 7.7a se muestra que la sOUR que se produce es de $1.38 \pm 0.56 \text{ mg O}_2 \text{ g}^{-1} \text{MS h}^{-1}$ a las 7 horas del proceso, manteniéndose constante a lo largo del proceso. Al tener una sOUR relativamente baja el valor de la temperatura se mantiene estable sobre los $36.1 \pm 0.5^\circ\text{C}$, lo cual parece ser favorable para el desarrollo del *Btk* a lo largo del proceso. Si se compara con la Figura 7.7b, un proceso de FES con digestato y FORM inoculado con *Btk*, la sOUR es superior que al trabajar con digestato, teniendo un valor máximo de $6.69 \pm 0.97 \text{ mg O}_2 \text{ g}^{-1} \text{MS h}^{-1}$ a las 22 horas. Este incremento de actividad biológica se relaciona con el incremento de temperatura que se produce en el mismo siendo de $52.07 \pm 0.5^\circ\text{C}$ y que se mantiene entre las 24 y las 48 horas del proceso de FES. En la Figura 7.7b se detecta un error de adquisición de datos en el Software entre las 14 y 18 horas del proceso, no afectando al desarrollo del *Btk*. El COC que se produce con digestato es de $298.5 \pm 27.13 \text{ mg O}_2 \text{ g}^{-1} \text{MS}$ y con digestato y FORM de $398.5 \pm 35.91 \text{ mg O}_2 \text{ g}^{-1} \text{MS}$.

Si se comparan ambos residuos la sOUR, temperatura y COC se incrementan 3, 1.4 y 1.37 veces los valores cuando se trabaja con digestato y FORM. Este incremento de temperatura es similar al estudiado en los Capítulos 5 y 6 cuando se encontraba el reactor completo con digestato donde ya se observó que *Btk* es capaz de sobrevivir y esporular.

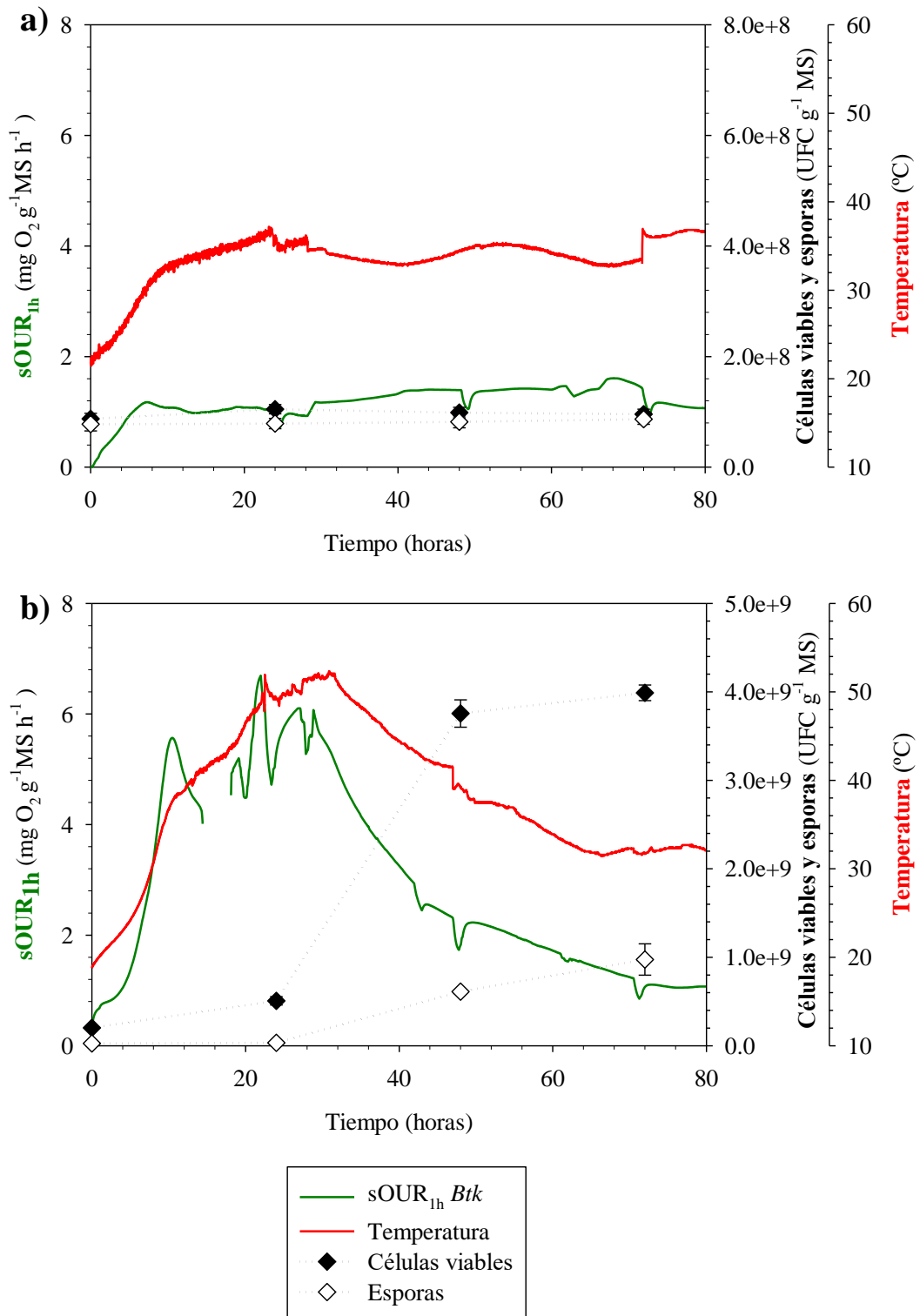


Figura 7.7. Perfiles de sOUR, células viables y esporas obtenidos en reactores de FES de 10-L para la producción de biopesticidas a partir de *Btk*. Los valores representados corresponden a la media de dos fermentaciones independientes. a) Con digestato como sustrato. b) Con digestato y FORM como sustrato,

Tabla 7.2. Principales parámetros de la FES en reactores aislados térmicamente de 10-L usando como sustratos digestato y digestato con FORM inoculando *Btk* y *Bti*.

Parámetro	Unidad	<i>Btk</i>		<i>Bti</i>	
		Digestato	Digestato y FORM	Digestato	Digestato y FORM
Humedad inicial	(%, bh)	63.0±0.3	55.3±1.3	63.0±0.3	55.3±1.3
Humedad final	(%, bh)	71.9±0.9	75.4±0.8	72.3±0.9	78.4±0.8
Materia orgánica inicial	(%, bh)	73.0±0.5	82.7±0.7	73.0±0.5	82.7±0.7
Materia orgánica final	(%, bh)	60.0±0.7	68.9±0.4	61.0±0.4	67.9±0.3
pH inicial (1:5)		8.95±0.01	8.78±0.01	8.35±0.01	8.70±0.01
pH final (1:5)		8.66±0.01	8.92±0.01	8.96±0.01	9.28±0.01
CE inicial (1:5)	(mS cm ⁻¹)	1.52±0.01	2.48±0.01	1.82±0.01	2.68±0.01
CE final (1:5)	(mS cm ⁻¹)	2.35±0.01	3.03±0.01	2.55±0.01	3.13±0.01
sOUR	(mg O ₂ g ⁻¹ MS h ⁻¹)	1.38±0.56	6.69±0.97	1.83±0.23	7.19±0.30
COC	(mg O ₂ g ⁻¹ MS)	298.5±27.13	398.5±35.91	290.3±24.20	399.01±34.01
T_{max}	(°C)	36.1±0.5	52.1±0.5	34.2±0.5	48.1±0.5
Células viables iniciales	(UFC g ⁻¹ MS)	8.75±0.98·(10 ⁷)	2.02±0.67·(10 ⁸)	4.18±0.91·(10 ⁷)	3.84±0.73·(10 ⁸)
Células viables finales	(UFC g ⁻¹ MS)	9.59±0.90·(10 ⁷)	3.49±0.88·(10 ⁹)	5.55±0.23·(10 ⁷)	6.42±0.25·(10 ⁹)
Esporas iniciales	(esporas g ⁻¹ MS)	7.78±0.12·(10 ⁷)	2.55±0.28·(10 ⁷)	1.93±0.27·(10 ⁷)	5.06±0.23·(10 ⁷)
Esporas Finales	(esporas g ⁻¹ MS)	8.67±0.91·(10 ⁷)	9.75±0.17·(10 ⁸)	4.45±0.14·(10 ⁸)	1.51±0.87·(10 ⁹)
Esporulación (72h)	(%)	90	26	>100	24

Los perfiles de células viables y esporas se comportan de forma diferente cuando se trabaja solo con digestato que cuando se utiliza digestato y FORM. En la Figura 7.7a con digestato, las células viables tienen su máximo a las 24 horas con un valor de $1.05 \pm 0.83 (10^8)$ UFC g^{-1} MS y posteriormente disminuyen ligeramente, teniendo un incremento de células viables de 1.10 veces al final del proceso. Esta máxima actividad de células viables se produce a la vez que la sOUR, manteniéndose después constante durante todo el proceso. Las esporas se incrementan 1.12 veces la inicial, obteniendo un valor al final del proceso de $8.67 \pm 0.91 (10^7)$ esporas g^{-1} MS, lo que implica, además, un porcentaje de esporulación del 90% debido a que los nutrientes que tiene el digestato se acaban y la mayor parte de las células viables finales han adquirido su forma esporulada.

En la Figura 7.7b la matriz de digestato y FORM con *Btk*, el sustrato tiene mayor cantidad de nutrientes y eso hace incrementar el valor de células viables al final del proceso con un valor de $3.99 \pm 0.88 \cdot (10^9)$ UFC g^{-1} MS, en ese momento el valor de pH tiene valores ligeramente ácidos (5.9), volviéndose alcalinos de nuevo cuando se comienza a producir la esporulación (Lima-Pérez et al., 2019). En este caso, las esporas tienen el mismo perfil que las células viables, aunque de menor valor, consiguiendo una concentración final de esporas de $9.75 \pm 0.17 \cdot (10^8)$ esporas g^{-1} MS, estos valores suponen un incremento de células viables y esporas de 18.22 y 38.20 veces el valor inicial, aunque el porcentaje de esporulación es de 26%, un porcentaje menor que con digestato debido a que no tiene tanta limitación de nutrientes y *Btk* en el ciclo vegetativo crece más.

Como se puede observar en la Tabla 7.2 los valores obtenidos en células viables y esporas al final del proceso de FES se incrementaron en mayor cantidad cuando se trabaja con digestato y FORM, es decir los valores de células viables se incrementan 18.22 veces cuando el sustrato es mixto y 38.20 veces el valor de esporas en la matriz sólida. Por lo tanto, la importancia de trabajar con un sustrato con mayor cantidad de materia orgánica biodegradable ayuda al desarrollo del *Bt* en el proceso de FES (Devi et al., 2005).

En estudios de Ballardo et al. (2017) con FORM se esperó a los 15 días de proceso para la inoculación de *Bt* evitando las temperaturas termófilas, ya que se observó que si se mantiene el *Bt* durante largo tiempo a esas temperaturas desaparece. En este caso, los valores de células viables y esporas se incrementaron 20.9 y 11.7, respectivamente, siendo los valores de células viables y esporas de $1.95 \pm 0.3 \cdot (10^7)$ UFC g^{-1} MS y $1.7 \pm 0.3 \cdot (10^7)$

esporas g^{-1} MS. En cambio, con digestato y FORM se observa que *Btk* puede soportar temperaturas alrededor de 50°C durante un par de días sin afectar a su desarrollo.

7.3.2.2. *Bacillus thuringiensis* variedad *israelensis*

La Figura 7.8 muestra el proceso de FES inoculando *Bti* con dos tipos de sustrato, digestato (Figura 7.8a) y con digestato y FORM (Figura 7.8b), todos los datos del proceso se recopilan en la Tabla 7.2.

El comportamiento de *Bti* sigue un proceso de FES similar al estudiado antes con *Btk*. En la Figura 7.8a con digestato, la actividad biológica aumenta hasta las 8 horas aproximadamente, manteniéndose constante la sOUR con un valor de $1.83 \pm 0.23 \text{ mg O}_2 \text{ g}^{-1} \text{ MS h}^{-1}$, y también una temperatura alrededor de $34.14 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$, la cual es óptima para el crecimiento del *Bti*, pero también para los microorganismos presentes en el digestato. Los perfiles de células viables y esporas según la Figura 7.9a con digestato dan un valor de células viables máximo se produce de $2.12 \pm 0.42 \cdot (10^7)$ UFC g^{-1} MS a las 48 horas y la concentración máxima de esporas coincide con el momento en el que la materia biodegradable del digestato se ha consumido, es decir a las 72 horas con un valor de $4.45 \pm 0.14 \cdot (10^8)$ esporas g^{-1} MS, produciéndose un incremento de 1.33 y 23.05 veces la inicial.

El comportamiento de *Bti* es diferente cuando se trabaja con digestato y FORM como se observa en la Figura 7.8b. La sOUR tiene un valor de $7.19 \pm 0.30 \text{ mg O}_2 \text{ g}^{-1} \text{ MS h}^{-1}$ a las 30 horas, a partir de ese punto comienza a disminuir hasta el final del proceso que tiene un valor de $1.87 \text{ mg O}_2 \text{ g}^{-1} \text{ MS h}^{-1}$. Se observa en la Figura 7.8b dos intervalos donde no se recogen datos de sOUR debido a un error en la adquisición de los datos del Software, pero la producción de *Bti* no se ve afectada. Este incremento de actividad se refleja de la misma forma en el incremento de temperatura con un máximo de $48.04 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ alrededor de las 30 horas.

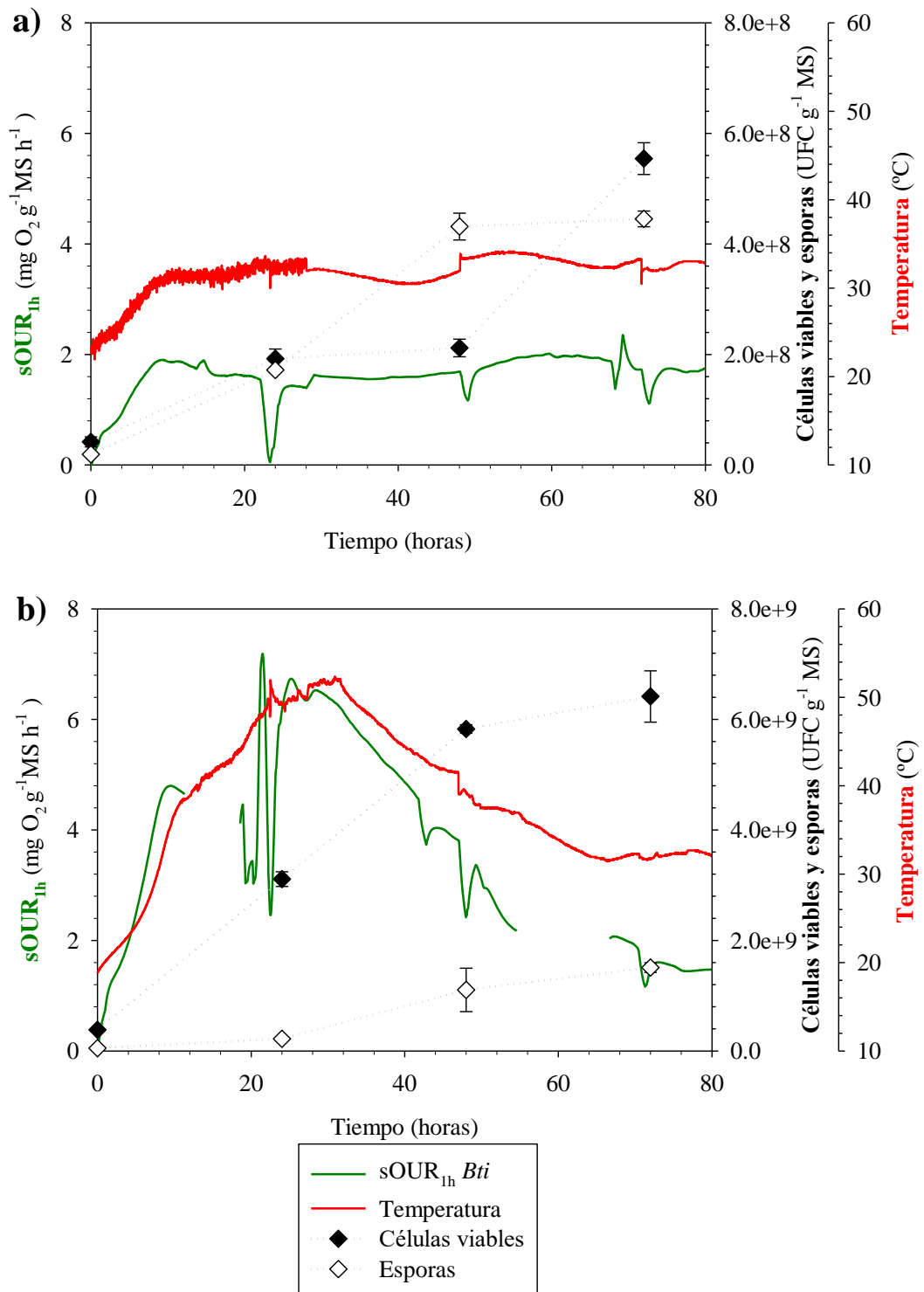


Figura 7.8. Perfiles de sOUR, células viables y esporas obtenidos en reactores de FES de 10-L para la producción de biopesticidas a partir de *Bti*. Los valores representados corresponden a la media de dos fermentaciones independientes. a) Con digestato como sustrato. b) Con digestato y FORM como sustrato.

Las células viables aumentan desde el comienzo consumiendo todo los nutrientes disponibles, aunque aumente la temperatura, debido a que el *Bti* es termoestable (Foda et al., 2010), observando que a las 72 horas se produce la máxima concentración de células viables ($6.42 \pm 0.25 \cdot (10^9)$ UFC g⁻¹ MS), incrementándose hasta 16.72 veces la inicial. Además, a las 48 horas del proceso de FES, se observa también un incremento de esporas debido a que los nutrientes comienzan a agotarse como se observa en la sOUR, detectando que las células viables a partir de ese momento se mantienen constantes, ya que no tienen más materia disponible que pueda ser consumida por *Bti* para su desarrollo. El máximo de esporas se produce al final del proceso con un valor de $1.51 \pm 0.87 \cdot (10^9)$ esporas g⁻¹ MS, incrementándose 29.83 veces la inicial.

Si se comparan ambos residuos el comportamiento es similar al evaluado con *Btk* incrementándose la sOUR y temperatura en 3.5 y 1.4 veces cuando se trabaja con digestato y FORM.

Comparando el comportamiento con cada sustrato, los valores de células viables y esporas se incrementaron cuando se trabajó con un residuo con mayor materia biodegradable como es el digestato con FORM. Los valores de esporas aumentaron hasta dos órdenes de magnitud, obteniendo valores de 10^9 esporas g⁻¹ MS. Estos incrementos se pueden deber a que *Bti* es termotolerante y se adapta fácilmente a altas humedades, pudiendo desarrollarse con mayor facilidad que *Btk* (Foda et al., 2010). En otros estudios utilizando residuos agroindustriales realizados con *Bti* los valores que se han llegado a alcanzar optimizando el medio de cultivo y probándolo a una escala superior fueron hasta $2.52 (10^{10})$ UFC g⁻¹ MS (El-Bendary et al., 2016).

7.3.2.3. Comparación de las dos cepas de *Bt*

Las características de los inóculos utilizados de ambas cepas son similares, ambos *Bt* se inoculan en una cantidad de 10^7 UFC mL⁻¹.

Cuando se trabaja con digestato, el comportamiento de ambas cepas es análogo, creciendo un orden de magnitud de células viables en el caso de *Bti*, aumentando hasta 13.26 veces la inicial y el *Btk* únicamente un 1.10. Para las esporas, ocurre de forma similar en la cepa de *Btk* que crece hasta 1.12 veces la inicial, en cambio el *Bti* incrementa su valor hasta 23.05 veces las esporas iniciales, manteniéndose en un rango de 10^8 esporas g⁻¹ MS. Esta

tendencia se explica porque el digestato es un residuo muy biodegradado que no contiene los nutrientes necesarios para que el *Bt* se desarrolle sin importar el tipo de cepa que se utilice.

En cambio, cuando se trabaja con un sustrato que contiene el 50% de digestato y el 50% de FORM se observa una evolución diferente. El *Btk* crece en mayor cantidad el número de esporas hasta 23.05 veces, mientras que el *Bti* lo hace hasta 29.83 veces con respecto a la inicial, esto se debe a que la esporulación de *Bti* se produce más rápidamente. Como ya se vio en el Capítulo 3 y en el Sistema de Fermentación I, el *Bti* crece más rápido en el medio de cultivo Broth y también en el digestato, no dando tiempo al desarrollo de células viables por la disminución de nutrientes necesarios en la matriz sólida. Al producirse antes la esporulación, el proceso lleva al *Bti* aumentar la cantidad de esporas en dos órdenes de magnitud de 10^7 a 10^9 esporas g^{-1} MS, en comparación con la cepa de *Btk*. No existen referencias donde se comparen cepas de *Bt*, dependiendo su producción en el tipo de residuo que se utilice. Por ejemplo, El-Bendary et al., (2016) con residuos agroindustriales al escalar el proceso llegó a encontrar una producción de esporas de $2.22 (10^9)$ esporas g^{-1} MS superior a las esporas producidas con otros residuos para la cepa de *Btk* (Zhang et al., 2011).

Los porcentajes de esporulación con digestato son muy elevados, debido a que las células viables al no tener materia orgánica suficiente comienzan a esporular. En cambio, los valores de esporulación con digestato y FORM son menores que los que se producen cuando el reactor está completamente lleno como puede verse en la Tabla 7.2, lo que puede implicar que el efecto de la cantidad de material en un reactor aislado puede influir a la hora del desarrollo del *Bt*.

7.3.3. Caracterización del cristal proteico

Para evaluar el tipo y la cantidad de cristal proteico que se produce durante la FES en reactores de 10-L se utilizan dos técnicas de seguimiento. La primera es la seguida por Rahbani-Mounsef et al. (2014b) que consiste en la separación de esporas y cristal por tinción mediante azul de Comassie después de una serie de lavados de limpieza con hexano del fermentado para eliminar agregados y separar las células viables y esporas del cristal proteico como se muestra en la Figura 7.9.

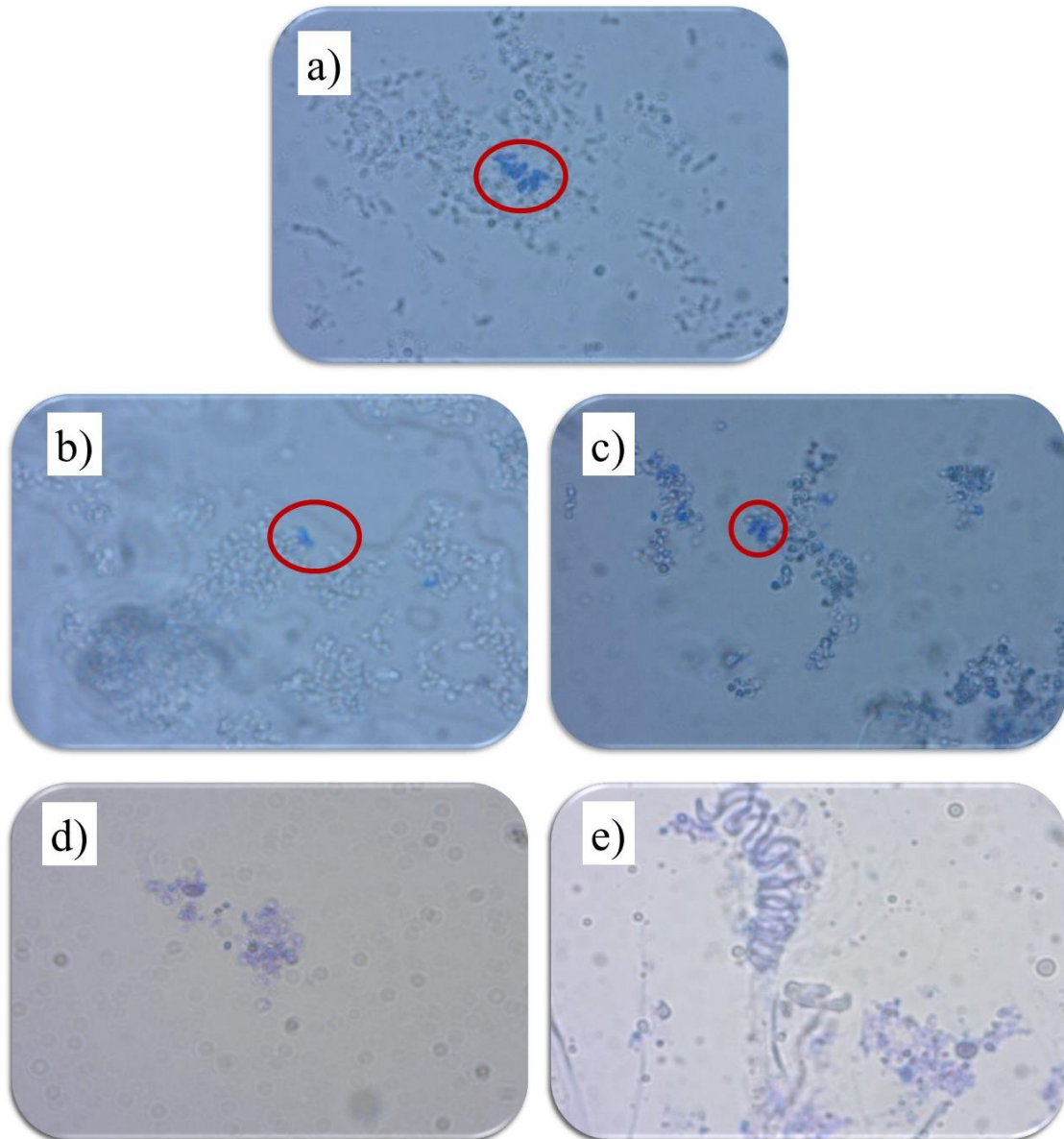


Figura 7.9. Imagen al microscopio de la separación espora-cristal por el método de Rahbani-Mounsef et al., (2014b) con aumento de 10x. a) Comercial Bactur®. b) Inóculo de *Btk*. c) Inóculo de *Bti*. d) Fermentado de FES con inóculo de *Btk*. e) Fermentado de FES con inóculo de *Bti*.

La Figura 7.9a muestra la tinción del cristal proteico resaltado con círculos rojos del producto comercial Bactur® utilizado para compararlo con el fermentado de *Bt* de ambas cepas, y a su vez con los inóculos iniciales utilizados de *Btk* y *Bti*. La Figura 7.9b corresponde al inóculo de *Btk* y la Figura 7.9c al inóculo de *Bti* dónde se observa la tinción en azul de Comassie de los cristales que se han producido, pero no permite determinar el tipo de cristal. En las Figuras 7.9d y 7.9e se observan los cristales que se producen en el

fermentado. Se puede observar, en el caso de las muestras fermentadas que al ser una muestra sólida con agregados la determinación con esta metodología de la cantidad de cristal no es posible ya que no permite cuantificarlo y tampoco determinar qué parte es cristal y qué parte son impurezas o digestato. Lo interesante de la metodología anterior es poder separar los cristales del resto de material, pero se observó que no era posible con el tipo de material con el que se trabajó.

La segunda técnica es la evaluación de los cristales por medio de microscopio electrónico (SEM) para determinar la cantidad de cristales que se producen y su tamaño. Como ya se ha comentado en capítulos anteriores, el tamaño del cristal de *Bt* se encuentra entre 3 a 5 μm de largo y de 1 a 1.2 μm de ancho (Soberón y Bravo 2007). Además, los cristales pueden tener forma bipiramidal, plana rectangular, esférica o sin ninguna estructura definida (Palma et al. 2017).

Como se observa en la Figura 7.10 el producto comercial Bactur® contiene cristales, esporas y otros agregados utilizados para mantener las propiedades biopesticidas hasta su uso. Ésta es una de las diferencias que se encuentran con el material fermentado del proceso de FES. La función de estas sustancias se puede explicar, por ejemplo, con la influencia de la luz UV sobre la estabilidad del cristal, entre otras (Ruan et al., 2004).

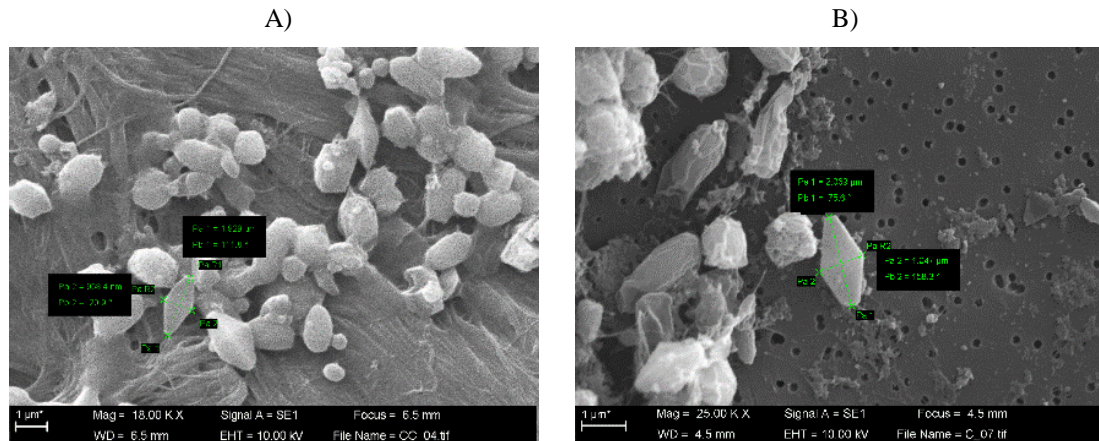


Figura 7.10. Imagen al microscopio SEM del producto comercial Bactur®. a) Mezcla del producto comercial Bactur®. b) Detalle del cristal proteico que contiene el comercial Bactur®.

Los cristales del producto comercial Bactur® son de la cepa *Btk* con unas medidas aproximadas de 2.328 μm de largo y 1.305 μm de ancho. Las preparaciones comerciales de *Bt* consisten en una mezcla formulada de esporas y cristales como se ha referenciado

en distintas publicaciones (Marrone, 2007) que la presencia de esporas puede aumentar la actividad biopesticida del cristal. El efecto potenciador de las esporas sobre la toxicidad de los cristales se conoce desde hace muchos años, aunque el mecanismo subyacente del efecto sigue sin estar claro (Yezza et al., 2006a).

La mayoría de los aislamientos de *Btk* producen un gran cristal parasporal bipiramidal ($1.1 \times 0.5 \mu\text{m}$) que contiene una proteína única que casi siempre es tóxica para los lepidópteros. Sin embargo, en algunos aislamientos de *Btk*, el cristal bipiramidal está acompañado por un cristal cuboidal más pequeño y es tóxico para los lepidópteros y los mosquitos (Peart et al., 2000). La Figura 7.11 muestra diferentes imágenes del final de la fermentación de FES donde se observan células viables y esporas (Figura 7.11a y b) y cristales (Figura 7.11c y d).

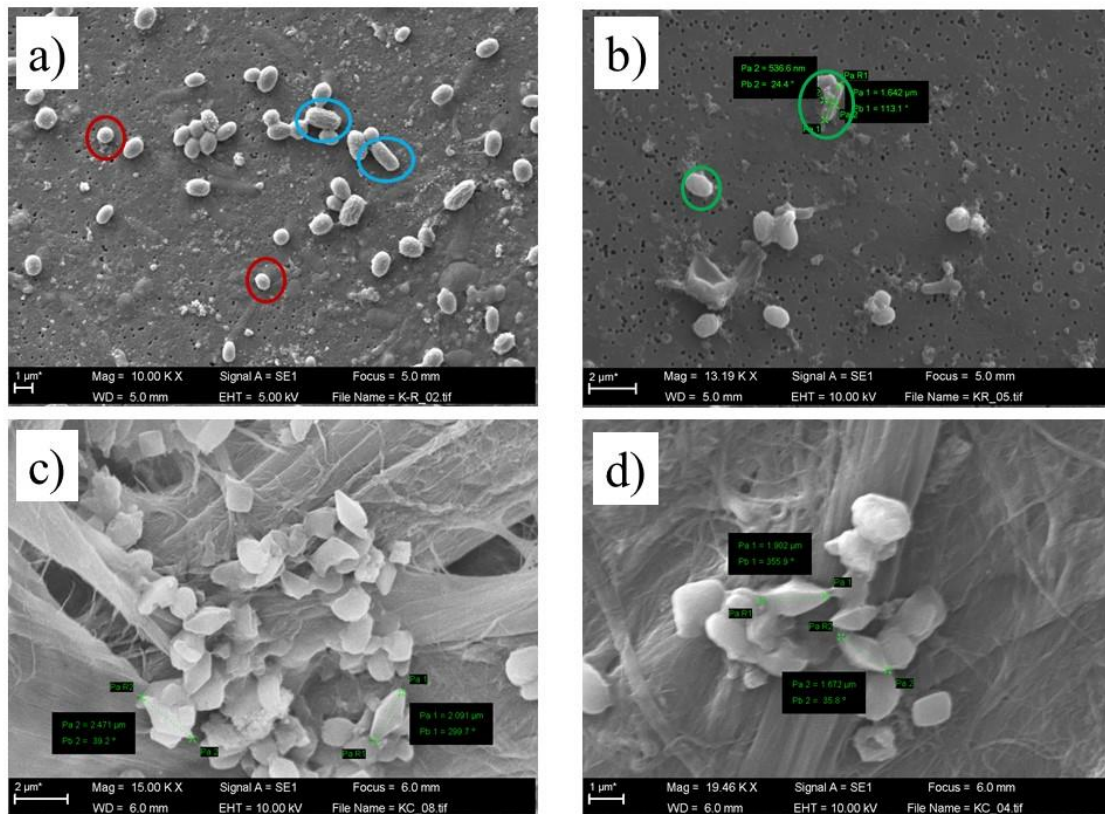


Figura 7.11. Imagen al microscopio SEM del fermentado en reactores de 10-L con inóculo de *Btk*. a) Células viables y esporas de *Btk*. b) Detalle de las células viables de *Btk*. c y d) Cristales proteicos de *Btk*.

Lo que se puede apreciar de esta fermentación es que no solo aparece *Btk* en la muestra, sino que contiene también otros microorganismos como son cocos. Estas imágenes nos

dan información de cómo es la cepa de *Btk*, tanto de sus tamaños como de la cantidad relativa existente en la muestra. Las células viables de *Btk* tienen un tamaño de $3.26 \mu\text{m}$ de largo y $1.19 \mu\text{m}$ de ancho, las esporas son de $1.642 \mu\text{m}$ de largo y 536.6 nm de ancho aproximadamente y el cristal es de $2.545 \mu\text{m}$ de largo y $1.073 \mu\text{m}$ de ancho con una forma bipiramidal.

La mayoría de las cepas de *Bti* activas contra los mosquitos producen inclusiones parasporales de forma esférica o irregular. El cuerpo parasporal de *Bti* es básicamente esférico y tiene un promedio de aproximadamente $1 \mu\text{m}$ de diámetro, con un rango de 0.7 a $1.2 \mu\text{m}$ (Peart et al., 2000). En la Figura 7.12 se observa el material final de la fermentación con digestato y FORM en reactores de 10-L inoculando *Bti*. Al contrario que *Btk*, *Bti* es difícil de diferenciar tanto de células viables como de los cristales proteicos.

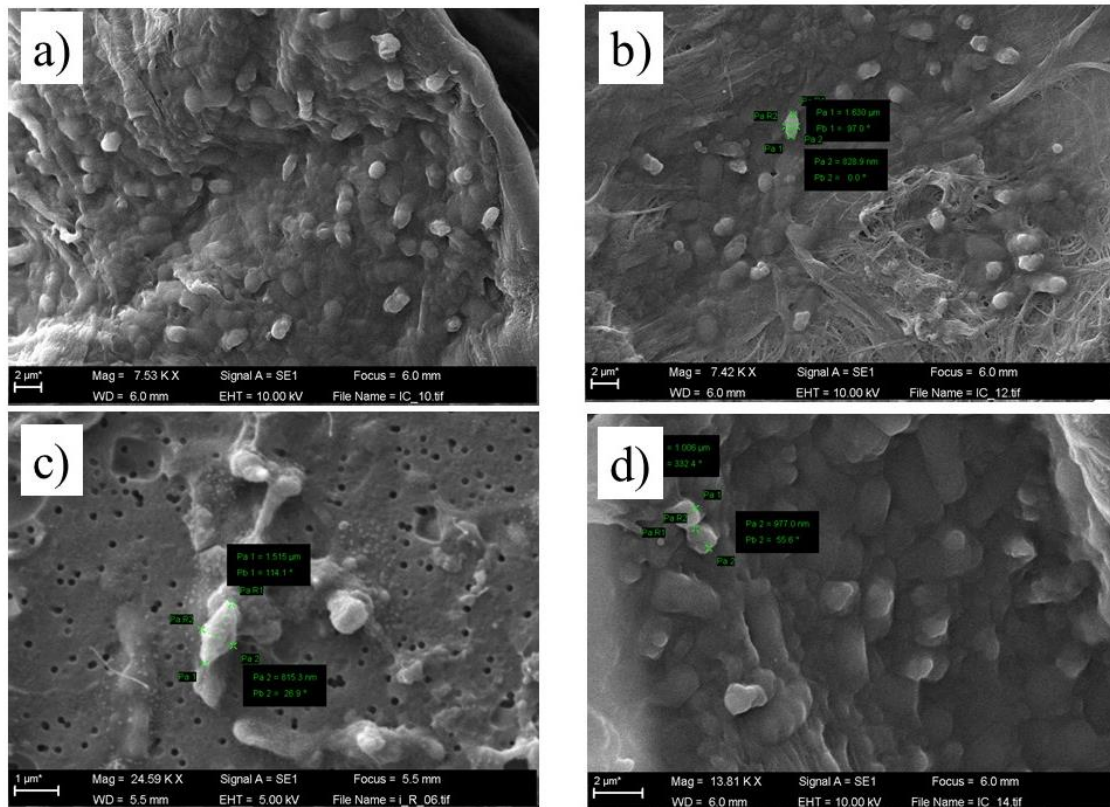


Figura 7.12. Imagen al microscopio SEM del fermentado en reactores de 10-L con inóculo de *Bti*. a) Células viables y esporas de *Bti*. b) Detalle de las células viables de *Bti*. c) Cristal proteico bipiramidal de *Bti*. y d) Cristales proteicos esféricos de *Bti*.

En la Figura 7.12a se observa que la muestra contiene diferentes microorganismos, entre los que se encuentra el *Bti*. Los valores que se observan de células viables son de 2.858 μm de largo y 1.828 μm de ancho, las esporas de son de 1.3 μm de largo y 553.5 μm de ancho y los cristales que se observan en la Figura 7.12b y c, son bipiramidales y esféricos de tamaño de 1.515 μm de largo y 815.3 μm de ancho y diámetro de 1.006 μm , de tamaños como se describen en la bibliografía. Por lo tanto, después de evaluar la presencia de *Bt* y el cristal a través de imágenes de SEM se puede decir que la FES produce un material con propiedades biopesticidas atribuidas al cristal proteico presente.

7.4. Conclusiones

Los tratamientos aplicados al sustrato antes de la FES afectan a la actividad biológica del material, disminuyendo cuando se esteriliza el material y manteniéndose igual cuando se congela el sustrato.

Estos tratamientos afectan de forma similar al crecimiento posterior de las dos cepas de *Bt*, incrementándose los valores de células viables cuando se trabaja con digestato descongelado. El valor de esporas es superior para digestato previamente esterilizado de la cepa de *Btk*, y con digestato descongelado para la cepa de *Bti*.

La diferencia entre las cepas de *Bt* es que *Bti* se desarrolla más rápido que *Btk* igual que ocurría en medio líquido con el medio de cultivo comercial Broth. En este caso *Btk* llega a producir una cantidad de células viables de $9.25 \pm 0.86 \cdot (10^8)$ UFC g^{-1} MS en digestato congelado y de esporas de $8.15 \pm 0.46 \cdot (10^7)$ esporas g^{-1} MS en digestato estéril, produciendo una esporulación del 66% al final del proceso. En cambio *Bti* crece un orden de magnitud más que el *Btk*, teniendo valores de células viables de $2.80 \pm 0.12 \cdot (10^9)$ UFC g^{-1} MS y de esporas de $7.15 \pm 0.23 \cdot (10^8)$ esporas g^{-1} MS en digestato congelado, pero una esporulación en el digestato estéril del 55%.

Por lo que respecta a los reactores de 10-L, se comprobó que trabajando con digestato como sustrato, la temperatura alcanzada es la óptima para el crecimiento de *Bt* de ambas cepas, pero existe una limitación en los nutrientes necesarios. Por ello, cuando se trabaja con un sustrato mixto (digestato y FORM) el crecimiento de *Bt* en ambos casos es superior. En cambio, los porcentajes de esporulación son menores debido al mayor

incremento de células viables. Como la fase de esporulación se diferencia en varias etapas, es posible que se encuentre en una etapa previa en la que el cristal proteico se encuentre dentro de la célula vegetativa y no se haya liberado por lo que se necesitaría un tratamiento posterior para liberar el cristal ya formado. Asimismo, el *Bti* crece más rápido que el *Btk* en las mismas condiciones de fermentación, siendo el valor de células viables de 10^9 UFC g^{-1} MS en ambas cepas, y el valor de esporas de 10^8 y 10^9 esporas g^{-1} MS, respectivamente para las cepas *Btk* y *Bti* con digestato y FORM.

Al comparar el producto comercial Bactur® con los fermentados de *Btk* y *Bti* se observa que el producto fermentado tiene cristales proteicos que coinciden tanto con el comercial como con la bibliografía encontrada para cada una de las cepas. La separación por hexano y la observación al microscopio no permiten cuantificar la cantidad de cristal proteico de *Bt*, únicamente detectar la presencia de éste en la fermentación de FES.

CAPÍTULO 8

*Extracción y caracterización de la toxina
de *Bacillus thuringiensis**

8.1. Introducción

En este capítulo se presentan los resultados y técnicas aplicadas para caracterizar la toxina producida por *Bt* con efecto biopesticida. El trabajo realizado está relacionado con los resultados obtenidos al final de los capítulos anteriores en la producción de biopesticida, y concretamente con los resultados proporcionados por el IRTA y ReFarmers en las pruebas del efecto biopesticida a escala de laboratorio y de campo respectivamente.

El primer objetivo de este capítulo es optimizar la extracción del biopesticida producido mediante FES. La aplicación de *Bti* como biopesticida se puede realizar directamente en forma sólida al suelo (las plagas sobre las que actúa mayoritariamente *Bti* atacan al cultivo a nivel de raíz), mientras que la de *Btk* se realiza en forma líquida (el biopesticida ataca a las plagas que afectan a las hojas y el tallo de la planta), lo cual hace necesario una extracción una vez terminado el proceso de FES. Esta extracción se ha realizado en los capítulos anteriores para contabilizar las células viables y esporas en una relación 1:10 de sólido:líquido utilizando la solución Ringer® como líquido para la extracción. Para disminuir los costes, la cantidad a almacenar y facilitar su transporte para posterior uso se probarán diferentes proporciones de extracción: 1:10, 1:5, 1:2 y 1:1, con dos medios líquidos diferentes, Ringer® y agua destilada.

El segundo objetivo es incrementar la acción del biopesticida producido en FES y se plantea ante los resultados de los bioensayos realizados frente a *P. interpunctella* y *Pieris brassicae* (Capítulo 6 apartado 6.3.5) donde no se obtuvo el efecto deseado. Por ello, se aplicaron una serie de tratamientos después de la FES, siguiendo dos estrategias diferentes: la primera consiste en una disrupción de las células viables del *Bt* que contienen el cristal proteico con efecto biopesticida. En este caso, el cristal proteico quedaría liberado para actuar contra las plagas. La segunda estrategia incluye, después de la disrupción, una etapa posterior de liofilización del producto para poder conservarlo y transportarlo para su posterior uso. En ambas estrategias se aplica la técnica de extracción mediante hexano para la recuperación de los cristales de *Bt*. Esta extracción es un método simple basado en la característica hidrófoba que tienen las esporas pudiendo separarlas de los diferentes cristales (Rahbani-Mounsef et al., 2014b).

La recuperación de estas toxinas, a partir de los cristales proteicos, después del proceso de fermentación se considera el principal desafío para la obtención de un producto de *Bt*

con efecto biopesticida. Así, se realizó una purificación a los extractos con Ringer® liofilizados de acuerdo a Rahbani-Mounsef et al. (2015) para extraer la proteína de *Bt*. Una vez purificado se determinó la cantidad de proteína total siguiendo el método de Lowry y a través de una electroforesis se intenta detectar la proteína característica de cada una de las cepas de *Bt*, comparando con el producto comercial Bactur®.

8.2. Metodología

8.2.1. Microorganismos

En este capítulo, todos los experimentos para la separación del biopesticida donde se entenderá como tal todas las células, esporas y cristales proteicos, han sido realizados con dos cepas diferentes de *Bt*, *Btk* y *Bti*.

8.2.2. Materiales

Se ha utilizado el material fermentado producido en los reactores de 10-L con digestato y FORM y con cada una de las cepas de *Bt*.

8.2.3. Extracción de biopesticida

La extracción del biopesticida (células viables, esporas y cristales de *Bt*) se realizó como se explica en el Capítulo 3 de materiales y métodos, apartado 3.7. Las extracciones realizadas siguen el esquema que se refleja en la Figura 8.1.

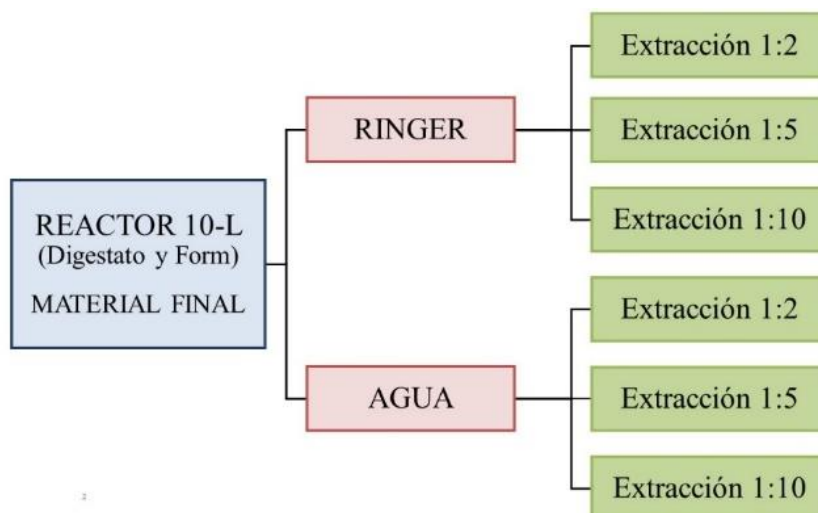


Figura 8.1. Esquema de las extracciones utilizadas.

8.2.4. Obtención del cristal

Se siguieron dos estrategias diferentes para la extracción de la toxina que contiene el *Bt* producido en el proceso de FES, tal y como se muestra en la Figura 8.2. Estas estrategias fueron aplicadas a todos los líquidos resultantes de las extracciones en el medio líquido Ringer® (1:2, 1:5 y 1:10).

La primera Estrategia consistió en realizar una disrupción sobre los extractos líquidos para que el cristal proteico unido a la célula viable se libere y se obtenga mayor cantidad de éste en el medio.

En la segunda Estrategia, un proceso de liofilización se aplicó después de la disrupción. El material fue liofilizado para poder conservar el biopesticida producido con las mismas características durante mayor tiempo. Se evaluó el porcentaje de recuperación de células viables y esporas después de la liofilización.

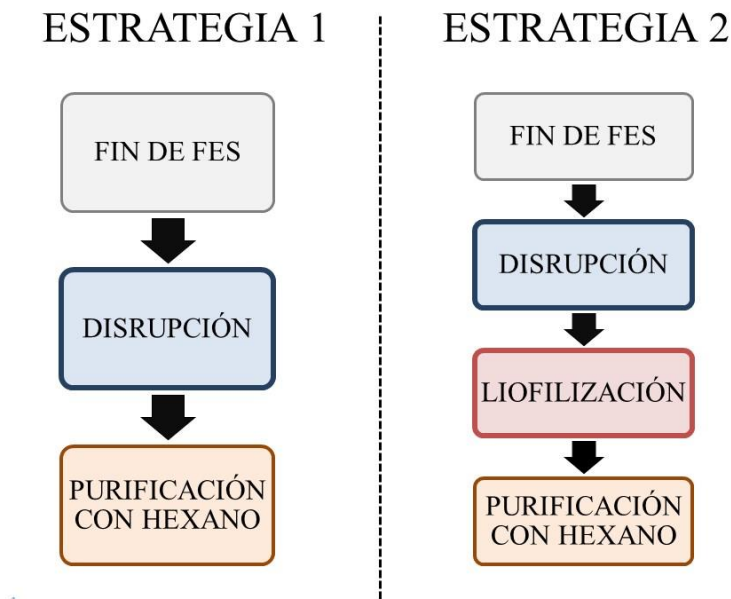


Figura 8.2. Estrategias para incrementar el efecto biopesticida del material resultante de la FES.

En ambas estrategias se realizó una extracción con hexano como explicó Rahbani-Mounsef et al. (2014b) para separar el cristal proteico de las células viables y esporas. El hexano, es un solvente orgánico hidrofóbico que tiene la capacidad separar las células viables, esporas y material agregado del cristal por gradientes de densidad, después de una serie de lavados por ultracentrifugación, atrapando las esporas y dejando los cristales

libres. Después de la separación con hexano, se evaluó en ambas estrategias la cantidad de células viables y esporas que quedaban al final de la purificación para comprobar si esta metodología era óptima para un sustrato procedente de digestato y FORM fermentado por FES, puesto que sólo se ha utilizado en sustratos puros de *Bt*. El objetivo es comprobar si esta metodología es capaz de separar el cristal proteico del resto del material para obtener un producto con menores impurezas y más concentrado.

8.2.5. Determinación de la proteína con efecto tóxico de *Bacillus thuringiensis*

Se realiza una purificación de la proteína con 250 mg de producto liofilizado, que fueron suspendidos en 5 mL de agua milli-Q. Para el recuento de células viables y esporas se utilizó una alícuota de 1 mL y con la suspensión resultante se realizó la purificación de la toxina con NaOH de acuerdo a Rahbani-Mounsef et al. (2015) explicado en el Capítulo 3, apartado 3.6.3. La concentración total de proteína fue determinada por el método de Lowry. Como control positivo se utilizó el producto comercial Bactur®.

Las muestras analizadas fueron: producto comercial Bactur® diluido en agua según las instrucciones del fabricante, inóculo de *Btk*, extracto del fermentado de digestato y FORM inoculado con *Btk*, inóculo de *Bti*, extracto del fermentado de digestato y FORM inoculado con *Bti* de muestras disruptadas y disruptadas y liofilizadas.

Se realiza una electroforesis para caracterizar las proteínas producidas de cada una de las cepas de *Bt* y comparar con las producidas en FES, teniendo como referencia el producto comercial Bactur®.

8.2.6. Análisis estadístico

Se aplica un análisis estadístico con una recta de regresión para los resultados de la extracción del biopesticida. Los valores que se sometieron a regresión fueron los logaritmos de las células viables y logaritmos de las esporas al final de la FES, tanto para la cepa de *Bti* y como la de *Btk*. Se utilizan dos parámetros variables: dilución que se realiza pudiendo ser 1:2, 1:5 y 1:10, y líquido extractante siendo Ringer® y agua. A las diluciones se les da un valor de 2, 5 y 10, respectivamente; y al líquido extractante 1 y -1, obteniendo diferentes rectas de regresión para la extracción al final de la FES.

8.3. Resultados y discusión

8.3.1. Extracción de biopesticida: cepa de *Bacillus thuringiensis* variedad *kurstaki*

Después del proceso de FES para producir biopesticida derivado de *Bt*, se deben extraer las células viables, esporas y cristal con efecto biopesticida. A lo largo de toda la tesis esta extracción se ha realizado según las técnicas tradicionales de microbiología utilizadas anteriormente por Zhuang et al. (2011) y Zhang et al. (2013). Esta extracción se realizó con una relación de sólido: agente extractante, (1:10) con la solución salina de Ringer®. En este apartado, como ya se ha comentado, se han probado distintas relaciones de extracción y de solventes. En la Figura 8.3 se observan los porcentajes de células viables de *Btk* respecto al extracto 1:10 de Ringer® obtenidas en las diferentes extracciones realizadas sobre el material de FES a distintos momentos.

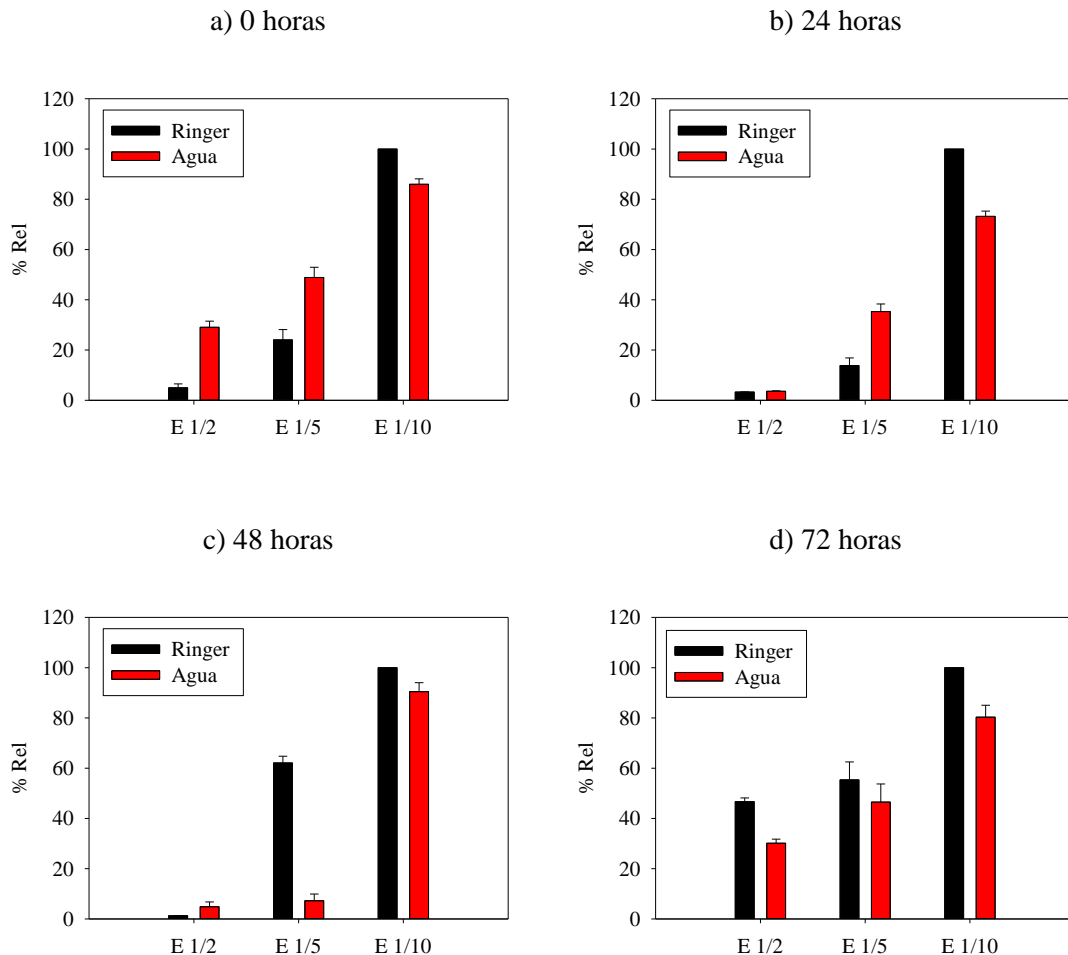


Figura 8.3. Porcentajes relativos de extracción de células viables de la FES con inóculo de *Btk* en relación con la extracción 1:10 de Ringer® para distintas relaciones de sólido:solvente a diferentes tiempos del proceso. a) 0 horas. b) 24 horas. c) 48 horas. d) 72 horas.

Las mismas pruebas se realizaron para la extracción de esporas. La Figura 8.4 muestra los porcentajes de esporas extraídas en función de la dilución utilizada y el líquido extractante en momentos puntuales de la FES de *Btk* con digestato y FORM.

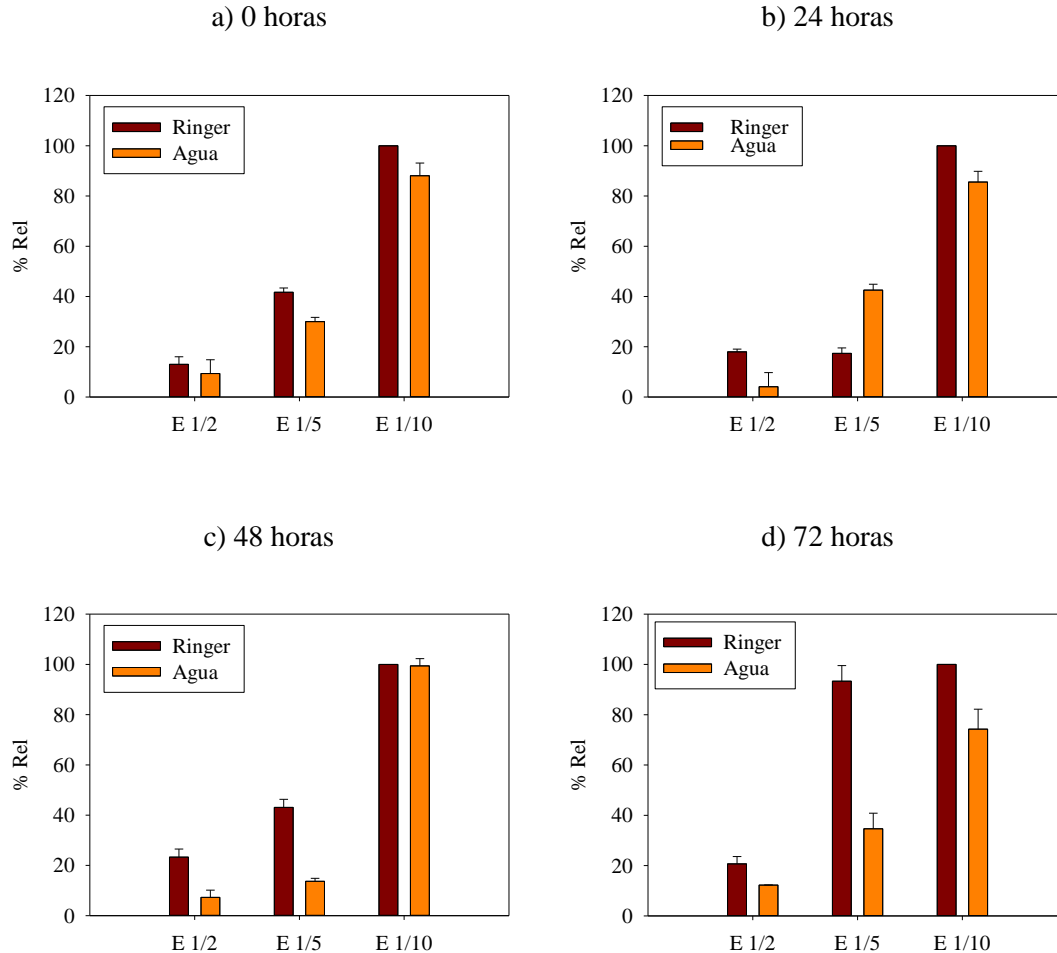


Figura 8.4. Porcentajes relativos de esporas extraídas de la FES con inóculo de *Btk* en relación con la extracción 1:10 de Ringer® para distintas relaciones de sólido: solvente a diferentes tiempos del proceso.

a) 0 horas. b) 24 horas. c) 48 horas. d) 72 horas.

En este caso, la ratio 1:2 no se ve tan influenciada como en las células viables, los valores en todos los momentos de la fermentación se encuentran alrededor del 20% en relación con la extracción control. Al aumentar la extracción a 1:5 los valores de células viables se incrementan con Ringer® al avanzar la fermentación, alcanzando un valor hasta el 90%, en cambio con el agua destilada este valor se mantiene en un rango del 20-40% en comparación con el control. En la extracción 1:10 con agua se obtiene un 80-90% de esporas en comparación con el control.

En todos los tiempos de proceso y en todas las proporciones de sólido:líquido, la cantidad de esporas extraídas es superior con Ringer®. En ninguno de los casos analizados se supera el 100% con respecto al control de extracción 1:10 con Ringer®, aunque los valores con agua destilada para esta proporción son elevados.

Los resultados obtenidos en ambos casos, células viables y esporas se sometieron a una regresión lineal con Miniab12®, tal y como se explica en la metodología de este capítulo. Para las células viables con la Ecuación 8.1, existe una cierta correlación entre los resultados, ($R^2=0.83$) siendo la variable que más afecta a la extracción el agente extractante utilizado, mejorando la extracción cuando se realiza con Ringer®.

$$UFC_{Btk} = 9.39 + 0.0277 A + 0.133 B \quad \text{Ecuación 8.1.}$$

$$R^2 = 0.83$$

Donde:

- UFC_{Btk} : Log (UFC $g^{-1}MS$).
- A: Ratio de dilución tomando valores (1:2, 1:5 y 1:10).
- B: Líquido extractante (Ringer o agua destilada) tomando valores (1, -1).

En la Ecuación 8.2 se muestra la relación que existe para la extracción de las esporas a partir del logaritmo de estas al final de la fermentación, influyendo igual que ocurre con las células viables, el agente extractante.

$$ESP_{Btk} = 8.20 + 0.105 A + 0.111 B \quad \text{Ecuación 8.2.}$$

$$R^2 = 0.83$$

Donde:

- ESP_{Btk} : Log (espora $g^{-1}MS$).
- A: Ratio de dilución tomando valores (1:2, 1:5 y 1:10).
- B: Líquido extractante (Ringer o agua destilada) tomando valores (1, -1).

Por lo que, se puede concluir que para el *Btk* ninguna otra relación, ni otro extractante es mejor que el utilizado hasta ahora.

8.3.2. Extracción de biopesticida: cepa de *Bacillus thuringiensis* variedad *israelensis*

Las pruebas realizadas a *Bti* fueron las mismas que las que se realizaron para *Btk*. Los resultados obtenidos para células viables se plasman en la Figura 8.5 y la Ecuación 8.3 y siguen la misma línea que para *Btk*.

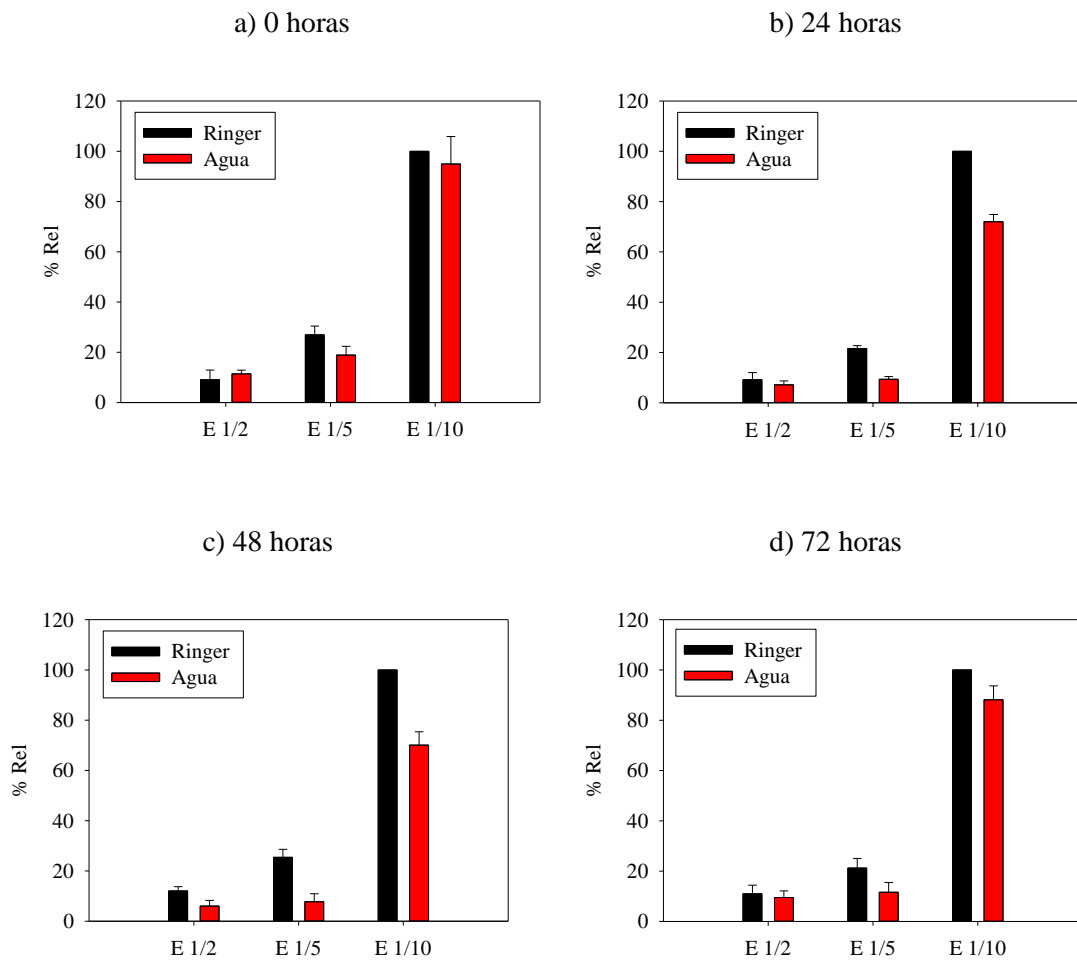


Figura 8.5. Porcentajes relativos de extracción de células viables de la FES con inóculo de *Bti* en relación con la extracción 1:10 de Ringer® para distintas relaciones de sólido: solvente a diferentes tiempos del proceso. a) 0 horas. b) 24 horas. c) 48 horas. d) 72 horas.

En este caso, se observa claramente que el mejor agente extractante es Ringer® y la mejor relación de sólido:solvente es de 1:10. Por el contrario, las proporciones 1:2 y 1:5 dan

valores similares a lo largo de todos los tiempos, inferiores al 10% y como los obtenidos con *Btk*. Si se comparan los tipos de agente extractante, el valor de células viables con Ringer® es superior en todas las extracciones, en el caso de la extracción 1:5 este valor supera el 25%, en cambio con agua destilada los valores son inferiores al 15% de la extracción control. Por lo que respecta a la relación 1:10, la extracción con Ringer® y agua es muy similar, oscilando los valores entre 65 y 95 % si se tienen en cuenta todos los tiempos, aunque esta extracción es superior cuando se trabaja con la cepa de *Btk*.

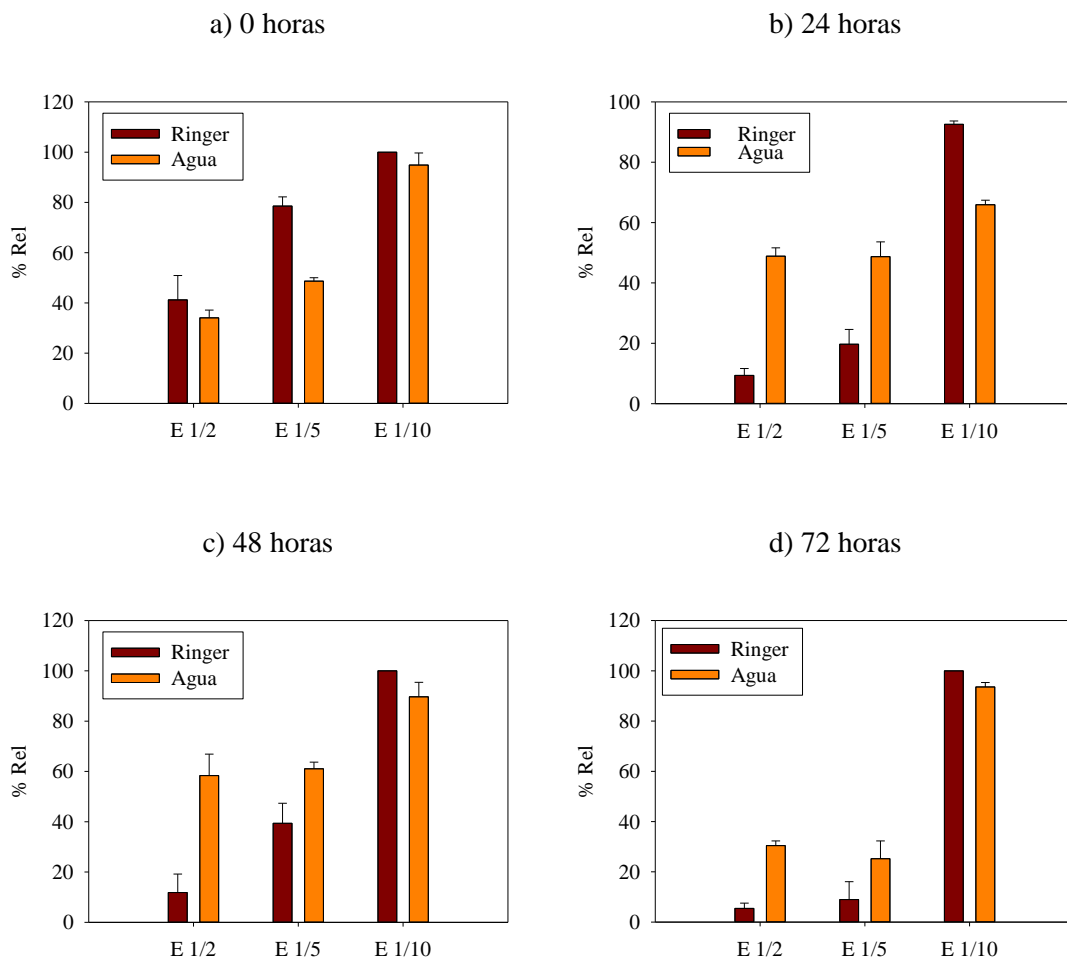


Figura 8.6. Porcentajes relativos de esporas extraídas de la FES con inóculo de *Bti* en relación con la extracción 1:10 de Ringer® para distintas relaciones de sólido: solvente a diferentes tiempos del proceso.

a) 0 horas. b) 24 horas. c) 48 horas. d) 72 horas.

La Figura 8.6 muestra los valores de porcentajes de extracción de esporas para cada uno de los tiempos de la fermentación con *Bti*. Las extracciones de 1:2 y 1:5 siguen un perfil similar en todos los tiempos de la fermentación, siendo superior cuando se realizan con agua. Los valores se encuentran entre el 50-60% en relación con el control. En cuanto a la extracción 1:10 con agua alcanza valores entre el 75 y el 90% en comparación con Ringer®, valores ligeramente superiores que los que se producen con *Btk*, siendo la mejor extracción utilizando Ringer® en una ratio 1:10, aunque con el resto de las extracciones los valores son ligeramente superiores que los que se producen con *Btk*.

De la misma forma que se realizó el análisis estadístico para la cepa de *Btk*, se hizo para la de *Bti*. Es decir, se realizó una regresión lineal con los parámetros de dilución y líquido extractante, tanto para el logaritmo de las células viables (Ecuación 8.3) como de las esporas (Ecuación 8.4). Se obtuvieron unos factores de correlación de $R^2=0.88$ y $R^2=0.82$, para células viables y esporas, respectivamente. Ambos se consideran elevados al tratarse de valores experimentales. Para las células viables, al igual que para la cepa de *Btk*, la influencia del agente extractante es mayor que el de la dilución. En cambio, para las esporas el líquido extractante afecta más que la ratio utilizada.

$$UFC_{Bti} = 8.75 + 0.142 A + 0.0685 B \quad \text{Ecuación 8.3}$$

$$R^2 = 0.88$$

Donde:

- UFC_{Bti} : Log (UFC $g^{-1}MS$).
- A: Ratio de dilución tomando valores (1:2, 1:5 y 1:10).
- B: Líquido extractante (Ringer o agua destilada) tomando valores (1, -1).

$$ESP_{Bti} = 8.00 + 0.101 A + 0.293 B \quad \text{Ecuación 8.4}$$

$$R^2 = 0.82$$

Donde:

- ESP_{Bti} : Log (espora $g^{-1}MS$).
- A: Ratio de dilución tomando valores (1:2, 1:5 y 1:10).
- B: Líquido extractante (Ringer o Agua destilada).

Los valores obtenidos en todas las extracciones afirman que el mejor método de extracción del biopesticida producido se realiza con Ringer® en relación 1:10.

La extracción 1:1, valorada al comienzo de los experimentos, se descartó porque generaba un barro que dificultaba el conteo de células viables y esporas, y era poco manejable para su posterior aplicación en campo.

8.3.3. Obtención del cristal proteico

En este apartado se explican los dos métodos seguidos para obtener y caracterizar la toxina de *Bt* como biopesticida.

8.3.3.1. Efecto de disrupción y purificación con hexano

La disrupción o ruptura de estructura celular (lisis) mediante ultrasonidos se utiliza para la extracción de compuestos intracelulares o para la inactivación microbiana, liberando las proteínas de las células bajo una sonicación intensa (Corts et al., 2019). Por lo que se aplicó esta técnica a los extractos con Ringer® para liberar el cristal proteico que contiene el *Bt* y que es el responsable del efecto tóxico, para así facilitar su actividad como biopesticida a partir del producto obtenido en la FES.

La disrupción se realiza sobre cada uno de los extractos de FES de las extracciones con el solvente Ringer®, 1:2, 1:5 y 1:10. En la Tabla 8.1 se muestran los valores de células viables y esporas después de la disrupción. Se observa que el valor de células viables disminuye, pues se consigue que éstas se lisen. Esta transformación implica que al lisar las células viables que tenían ya los cristales formados, los liberen al medio, incrementando así el efecto biopesticida. Si se relaciona el número de células viables después de la disrupción con los valores del final de la FES, obtenemos en valor absoluto disminuciones de 0.05, 0.03 y 0.01, respectivamente a las diluciones con Ringer® 1:2, 1:5 y 1:10.

Tabla 8.1. Valores de células viables y esporas después de la disrupción para cada extracto de *Btk*.

	Extracción 1:2	Extracción 1:5	Extracción 1:10
Células viables (UFC g⁻¹ MS)			
Inicio FES	4.59±0.19 (10 ⁸)	3.13±0.48 (10 ⁸)	5.75±0.22 (10 ⁸)
Final FES	4.40±0.11 (10 ⁸)	8.06±0.61 (10 ⁸)	2.93±0.24 (10 ⁹)
Disrupción	2.30±0.19 (10 ⁷)	2.37±0.88 (10 ⁷)	4.23±0.67 (10 ⁷)
Purificación con hexano	7.53±0.37(10 ⁵)	1.10±0.57 (10 ⁶)	1.50±0.78 (10 ⁶)
Esporas (esporas g⁻¹ MS)			
Inicio FES	2.60±0.15 (10 ⁶)	8.96±0.37 (10 ⁸)	1.32±0.44 (10 ⁷)
Final FES	1.46±0.29 (10 ⁹)	3.17±0.24 (10 ⁸)	1.07±0.91 (10 ⁹)
Disrupción	3.52±0.67 (10 ⁹)	2.25±0.37(10 ⁹)	6.74±0.44 (10 ⁹)
Purificación con hexano	8.51±0.20(10 ⁶)	5.13±0.12 (10 ⁶)	8.54±0.51 (10 ⁶)

En cambio, para las esporas, la disrupción afecta positivamente, es decir, muchas de las células viables que existían liberan la espora, que es su forma de resistencia. Como otros autores ya han comentado un valor de esporas unido a los cristales favorece el efecto biopesticida del *Bt* (Foda et al., 2010). Los incrementos que se producen de esporas para las diluciones de 1:2, 1:5 y 1:10 son de 2.4, 7.1 y 6.3, respectivamente para cada dilución.

Cuando se trabaja con la cepa de *Bti* el comportamiento de disrupción es igual que con *Btk*. En la Tabla 8.2 se muestran los valores de células viables y esporas al final de la disrupción, en este caso el valor de células viables disminuye en mayor cantidad que para *Btk*, hasta 0.43, 0.11 y 0.21 para las extracciones de 1:2, 1:5 y 1:10. Como ya se observó con *Btk*, las esporas aumentan hasta dos órdenes de magnitud, observando unos incrementos para las diluciones 1:2, 1:5 y 1:10 en valor absoluto de 178.6, 73.8 y 132.8 veces de esporas finales de la FES, respectivamente. Si se compara con *Btk*, la cepa de *Bti* es más susceptible al proceso de disrupción puesto que los incrementos de esporas son hasta 70 veces superiores a los valores de *Btk*.

Todos estos datos son difíciles de comparar con estudios sobre fermentación y residuos puesto que es una técnica que no se encuentra referenciada directamente para este tipo de proceso. Además, tampoco se han encontrado estudios sobre los productos comerciales de *Bt* que existen en el mercado, y que posiblemente utilicen esta técnica para producir mayor cantidad de cristal proteico. Todos los valores de células viables y esporas desde el inicio de FES hasta la purificación con hexano se recogen en la Tabla 8.2.

Tabla 8.2. Valores de células viables, esporas y porcentaje de recuperación después de la disrupción para cada extracto de *Bti*.

	Extracción 1:2	Extracción 1:5	Extracción 1:10
Células viables (UFC g⁻¹ MS)			
Inicio FES	3.48±0.20 (10 ⁷)	3.19±0.12 (10 ⁷)	5.76±0.16 (10 ⁷)
Final FES	1.76±0.91 (10 ⁸)	7.82±0.19 (10 ⁸)	8.56±0.50 (10 ⁸)
Disrupción	7.48±0.67 (10 ⁷)	8.31±0.37 (10 ⁷)	1.76±0.97 (10 ⁸)
Purificación con hexano	7.14±0.39 (10 ⁵)	1.32±0.63 (10 ⁶)	1.67±0.93 (10 ⁶)
Esporas (esporas g⁻¹ MS)			
Inicio FES	9.77±0.19 (10 ⁵)	1.22±0.37 (10 ⁶)	1.33±0.44 (10 ⁶)
Final FES	1.36±0.29 (10 ⁸)	2.51±0.61 (10 ⁸)	2.81±0.17 (10 ⁸)
Disrupción	2.44±0.15 (10 ¹⁰)	1.85±0.50 (10 ¹⁰)	3.74±0.44 (10 ¹⁰)
Purificación con hexano	8.80±0.20(10 ⁶)	5.11±0.37 (10 ⁶)	8.76±0.88 (10 ⁶)

Siguiendo la Estrategia 1, después de la disrupción se realizó una purificación con hexano para separar por completo los cristales del resto del material. Lo que se pudo observar con esta técnica es que se necesitan una gran cantidad de lavados del material para eliminar todos los agregados que quedan de digestato y FORM. Aún realizando estas limpiezas no se separan por completo las células y esporas del resto del material y tampoco todos los agregados del sustrato. Por otra parte, si se realiza una mayor cantidad de lavados, se termina eliminando todo el material que contiene, también los cristales. En la Figura 8.7 se muestra el resultado obtenido mediante esta técnica donde se observa la separación de esporas y cristales en el inóculo de *Btk*.

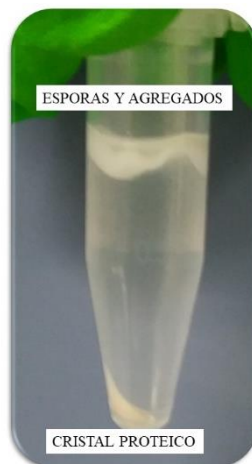


Figura 8.7. Purificación de la muestra con hexano. Prueba con inóculo de *Btk* llevado a esporulación.

Se cuantificaron las células viables y esporas aún presentes después de la purificación con hexano sembrando en placa los productos finales para comprobar la efectividad de la separación. Se observó que el material estaba más purificado, células viables en 1 y 2 órdenes de magnitud y esporas hasta 2 y 3 órdenes de magnitud, pero aun así existían gran número de células viables y esporas como se detallan en la Tabla 8.1 para el *Btk* y en la Tabla 8.2 para el *Bti*.

8.3.3.2. Efecto de liofilización

El objetivo de liofilizar las muestras consiste en deshidratar el material para poder almacenarlo y transportarlo con mayor facilidad sin perder las propiedades de la muestra. Para ello, se deshidratan los extractos del producto obtenido de FES para convertirlos en un polvo seco y comprobar si se mantienen las características de antes de la liofilización, a partir del porcentaje de recuperación de células viables y esporas.

El efecto de liofilización se determinó a partir del porcentaje de recuperación de células viables y esporas al resuspender el material liofilizado.

En la Tabla 8.3 se muestran los porcentajes de recuperación de células viables y esporas para la cepa de *Btk*. Los valores de células viables disminuyen en todas las diluciones hasta valores del 40.4% en la dilución 1:2, esto se debe a que existe una pérdida de material unido a una desestabilización de las células al someter el producto a ciclos de congelación y descongelación, produciendo lisis celular (El-Bendary et al., 2019).

Tabla 8.3. Valores de células viables, esporas y porcentaje de recuperación después de la liofilización para cada extracto de *Btk*.

	Extracción 1:2	Extracción 1:5	Extracción 1:10
Células viables (UFC g⁻¹ MS)			
Liofilización	9.31±0.15(10 ⁶)	1.48±0.37 (10 ⁷)	2.25±0.25 (10 ⁷)
Purificación con hexano	8.41±0.97(10 ⁵)	1.91±0.28 (10 ⁶)	2.64±0.11 (10 ⁶)
Recuperación (%)	40.4	62	53
Esporas (esporas g⁻¹ MS)			
Liofilización	2.25±0.91 (10 ⁹)	1.48±0.64 (10 ⁹)	6.01±0.20 (10 ⁹)
Purificación con hexano	3.13±0.31(10 ⁶)	6.53±0.74 (10 ⁶)	1.10±0.15 (10 ⁷)
Recuperación (%)	64	66	89

En las esporas, el efecto de liofilización es menor, pudiendo recuperarse hasta el 89% en el caso de la extracción 1:10. Según la bibliografía el proceso de liofilización también afecta a las esporas, disminuyendo en gran parte cuando se vuelve a recuperar el material (El-Bendary et al., 2019).

Para la cepa de *Bti*, el efecto de liofilización actúa de la misma forma que para la cepa de *Btk* como se observa en la Tabla 8.4. Los valores de recuperación de las células viables llegan a ser de hasta el 56% para la extracción 1:5, logrando mantener los valores de células viables en un orden de 10^7 UFC g^{-1} MS.

Tabla 8.4. Valores de células viables, esporas y porcentaje de recuperación después de la liofilización para cada extracto de *Bti*.

	Extracción 1:2	Extracción 1:5	Extracción 1:10
Células viables (UFC g^{-1} MS)			
Liofilización	3.57±0.20 (10^7)	4.69±0.24 (10^7)	5.89±0.67(10^7)
Purificación con hexano	48	56	33
Recuperación (%)	8.90±0.19 (10^5)	2.00±0.37 (10^6)	3.48±0.91 (10^6)
Esporas (esporas g^{-1} MS)			
Liofilización	1.65±0.10 (10^{10})	1.57±0.48 (10^{10})	3.20±0.12 (10^{10})
Purificación con hexano	68	85	86
Recuperación (%)	8.00±0.24(10^5)	7.30±0.48 (10^6)	1.39±0.17 (10^7)

Las esporas de *Bti* pueden recuperarse hasta un 86% con una extracción de 1:10, como se observa en la Tabla 8.4. El conteo de esporas después de la disrupción y después de la liofilización en todas las extracciones realizadas se comportan de forma similar. Se observó que para la menor dilución la recuperación es sólo del 68%, pudiendo deberse a que un mayor volumen de líquido extrayente permite mantener las esporas en mejores condiciones que cuando éste se limita.

En otros estudios como El-Bendary et al. (2019) la liofilización fue un método eficiente para la recuperación del *Bt*, y en consecuencia, de la toxina, aunque este método es costoso cuando se aplica a gran escala.

Después de la liofilización se realizó también la purificación con hexano teniendo en cuenta que el material se encontraba más limpio que sin realizar el tratamiento como se puede observar en la siembra de placa Petri de la Figura 8.8. Sin embargo, los valores que se obtuvieron de células viables y esporas después de la purificación con hexano eran inferiores en ambas cepas, pero del mismo orden de magnitud, como se observa en la Tabla 8.3 para el *Btk* y la Tabla 8.4 para el *Bti*.

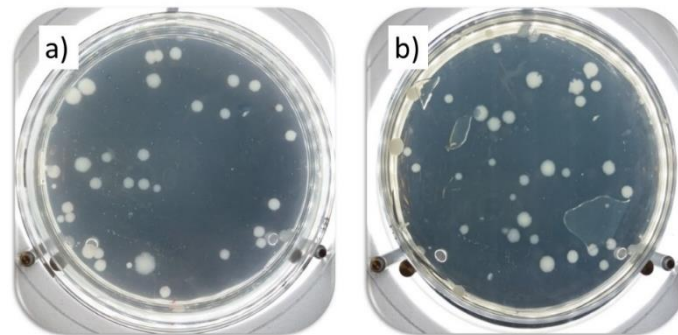


Figura 8.8. Sembrado del fermentado de *Btk* liofilizado y purificado con hexano. a) Placa Petri colonias de células viables de *Btk*. b) Placa Petri de esporas de *Btk*.

Con los valores obtenidos tanto de la disrupción como de la liofilización se puede afirmar que ambas estrategias utilizadas han sido satisfactorias. En primer lugar, con la disrupción se aumenta el número de esporas y disminuyen las células viables que liberan el cristal proteico y así podría aumentar el efecto biopesticida. Y, en segundo lugar, la liofilización permite obtener un producto seco con características similares al producto después de la disrupción. Además, en este caso, se observó que el producto liofilizado se encontraba sin otros microorganismos que compitieran con *Bt* o pudieran afectar a éste de forma negativa.

8.3.4. Purificación del cristal proteico: determinación de la concentración de la toxina

La purificación del cristal para determinar la concentración de la toxina que contiene el producto de la fermentación se realizó con la técnica seguida por Rahbani-Mounsef (2015), utilizando NaOH, que induce la síntesis de las proteínas que se encuentran en el cristal proteico debido a que se alcaliniza. Esta purificación se realizó en el material

disruptado y posteriormente liofilizado. La técnica no fue realizada después de la purificación con hexano debido a la formación de agregados y eliminación de material procedente de *Bt*.

En la tabla 8.5 se recogen los valores de células, esporas y proteína total de todos los liofilizados analizados.

Tabla 8.5. Valores de proteína total de los liofilizados de producto comercial Bactur®, inóculos de *Btk* y *Bti* y los fermentados de digestato y FORM de *Btk* y *Bti*.

	Células viables (UFC g ⁻¹ MS)	Esporas (espora g ⁻¹ MS)	Proteína total (mg g MS ⁻¹)
Comercial Bactur®	6.40±0.40 (10 ⁵)	9.53±0.50 (10 ⁷)	1.92 (10 ⁻³)±0.02
Inóculo de <i>Btk</i>	4.00±0.41 (10 ⁵)	1.23±0.30 (10 ⁸)	2.84 (10 ⁻³)±0.14
Fermentado con <i>Btk</i>	5.00±0.70 (10 ⁵)	1.41±0.30 (10 ⁸)	2.92 (10 ⁻⁴)±0.09
Inóculo de <i>Bti</i>	4.80±0.10 (10 ⁵)	1.13±0.30 (10 ⁸)	3.07 (10 ⁻³)±0.12
Fermentado con <i>Bti</i>	4.60±0.64 (10 ⁵)	1.61±0.53(10 ⁸)	4.31 (10 ⁻⁴)±0.09

Las concentraciones de proteína total de los fermentados e inóculos son valores más elevados que los de la muestra del producto comercial Bactur®. Esto se debe a que los liofilizados a partir del fermentado de FES con digestato y FORM pueden contener otras proteínas que proceden del propio sustrato y no del *Bt*. Todos los extractos liofilizados analizados se encuentran en un rango de células viables de 10⁵ UFC g⁻¹ MS y de esporas de 10⁸ espora g⁻¹ MS.

La cepa de *Btk* con diferentes tipos de residuos ha llegado a producir una proteína total hasta 3.5 (10⁻³) mg mL⁻¹ con residuos industriales (El-Bendary et al., 2016) y 2.3 mg mL⁻¹ cuando se trabaja con residuo de cocina (Zou et al., 2016).

8.3.5. Determinación de proteína producida por *Bt* mediante electroforesis

Con la técnica de electroforesis en gel de poliacrilamida se pretende separar las proteínas según la movilidad en el campo eléctrico. Concretamente, se utiliza para analizar el perfil proteico de las muestras que contienen la endotoxina producida por *Bt*, determinando el peso molecular de la proteína tóxica de *Bt* por comparación con marcadores de peso molecular conocidos.

La cuantificación de la proteína por banda (ver informe completo de cuantificación sobre el de electroforesis obtenido con Image Lab 6.0.1 correspondiente a la Figura 8.9 en el Anexo II) se muestra en la Tabla 8.6, calculada a partir de la proteína absoluta que determina el programa y la cantidad de proteína puesta en el gel.

Estos resultados demuestran que las cepas de *Btk* y *Bti* contienen las proteínas que se referencian en la bibliografía, y que además aparecen en los extractos realizados en la fermentación de FES. Esto es debido a que las proteínas que conforman el cristal proteico que produce *Bt* están en el rango de 27 a 140 kDa (Poopathi y Kumar, 2003). Según la Tabla 8.6 se observa la presencia de dos proteínas en los rangos de 90 a 110 kDa y de 55 a 70 kDa en todas las muestras analizadas, la concentración de dichas proteínas es mucho menor en el nutriente Broth en comparación con el resto de las muestras. Se observa que una proteína de aproximadamente 135 kDa también está presente en el producto comercial Bactur®, en el inóculo de *Btk* y el fermentado de *Bti*. En este último, se encuentra en mayor concentración que en el resto y llama la atención que no se aprecia en el inóculo de *Bti*, por lo tanto, se podría asociar a que la fermentación promueva la síntesis de la proteína. También se detectan proteínas de 110-90 kDa en mayor valor en el fermentado de *Btk* que en el inóculo, por lo que se puede decir que se ha sintetizado esa proteína como producto de la fermentación. Proteínas de tamaño similar han sido descritas con efecto biopesticida en lepidópteros (Zou et al., 2016), aunque los valores son mayores en el inóculo de *Bti* y su fermentado. La proteína de 60 kDa se encuentra en el producto comercial Bactur® en mayor cantidad que el inóculo y fermentado de *Btk* y en menor valor que para el inóculo de *Bti* y su fermentado de FES.

De estos valores de proteínas se observa que la cepa de *Bti* produce una cantidad de proteína mayor que el *Btk*. De los fermentados que contienen *Bt* en ambos casos las cantidades de proteínas son superiores, esto se debe a que el sustrato utilizado también contiene proteínas de otro tipo que pueden no corresponderse al cristal proteico de *Bt*, lo que implica que se obtienen solo valores aproximados de la concentración de la toxina que produce *Bt*.

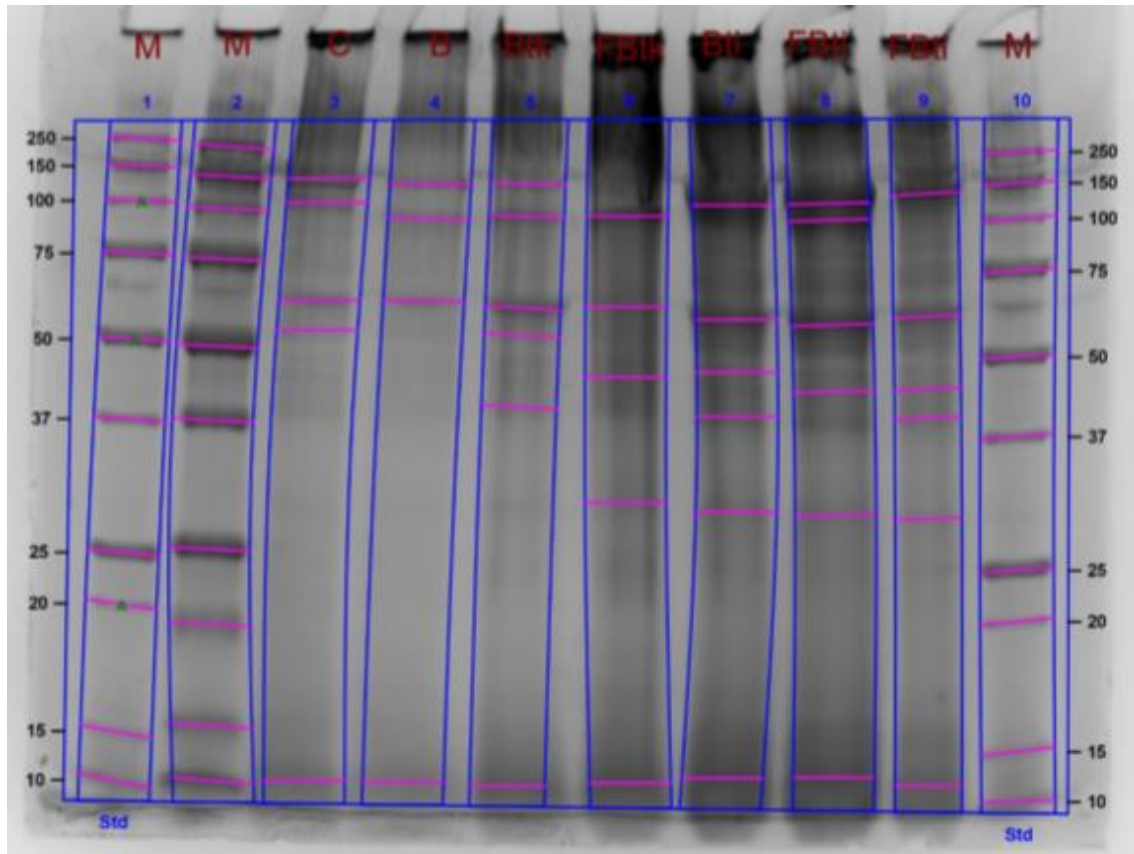


Figura 8.9. Gel de electroforesis. M1, M2, M3: marcadores. C: Producto comercial Bactur®. B: nutriente Broth. *Btk*: inóculo de *Btk*. *FBtk*: fermentado con inóculo de *Btk*. *Bti*: inóculo de *Bti*. *FBti*: fermentado con inóculo de *Bti*. Todas las muestras proceden de un liofilizado con un tratamiento de purificación con NaOH.

En el caso de la cepa de *Btk*, la toxina producida es específica para lepidópteros por lo que se espera que contenga proteínas con pesos moleculares entre 129 a 140 kDa, las cuales se acumulan en inclusiones cristalinas bipiramidales (Naimov et al., 2001), como las que se han observado por SEM en el Capítulo 7. Estas proteínas, cuando son activadas por el medio ambiente alcalino, producen un fragmento tóxico de 60 a 70 kDa. La cepa de *Bti* tiene efecto tóxico en dípteros, conteniendo las proteínas de peso molecular de 65 kDa en cristales cuboides parecidos a los que se muestran en las imágenes de SEM del Capítulo 7. También *Bti* sintetiza proteínas de 134 kDa, 125 kDa, 67 kDa y 27 kDa (Federici et al., 1990), estas proteínas son tóxicas para los mosquitos (Delecluse et al., 1991). Cuando el rango es de 130 kDa, 70 kDa y 38 kDa puede tener forma bipiramidal, cuboidal y esférica (Gitahy et al., 2007), como sería el caso del *Bti*, ya que las imágenes de SEM del Capítulo 7 demuestran que existe esta forma en la cepa utilizada.

Tabla 8.6. Proteína característica de cada muestra liofilizada analizada.

MUESTRAS	Bactur® (Producto comercial)		Nutriente Broth		Inóculo <i>Btk</i>		Fermentado <i>Btk</i>		Inóculo <i>Bti</i>		Fermentado <i>Bti</i>	
	Proteína (kDa)	Cantidad de proteína (mg mL ⁻¹ ·(10 ⁻³))	Proteína (kDa)	Cantidad de proteína (mg mL ⁻¹ ·(10 ⁻³))	Proteína (kDa)	Cantidad de proteína (mg mL ⁻¹ ·(10 ⁻³))	Proteína (kDa)	Cantidad de proteína (mg mL ⁻¹ ·(10 ⁻³))	Proteína (kDa)	Cantidad de proteína (mg mL ⁻¹ ·(10 ⁻³))	Proteína (kDa)	Cantidad de proteína (mg mL ⁻¹ ·(10 ⁻³))
140-110	135	9.9	129.3	3.9	132.4	2.7	-	-	-	-	113.4	12.4
110-90	102.3	0.02	93.4	0.4	95.8	4.6	97	9.1	108.8	15.6	97	13.6
70-55	61.1	8.03	61.5	1.7	60	5.3	61	4.6	57.9	6.2	57	13.6
55-40	-	-	-	-	52.7	1.65	44.9	9.2	46.1	1.9	43.2	6.9
30-20	-	-	-	-	-	-	29.8	4.2	26.8	0.7	29	0.7

De acuerdo con los resultados, se observa que con digestato y FORM, después de los tratamientos de disrupción y liofilización, se pudo determinar las proteínas que contiene el cristal proteico con efecto biopesticida para plagas de lepidópteros y dípteros.

8.4. Conclusiones

Se determinó que la obtención del extracto de FES con mayor conteo de células viables y esporas corresponde a una relación de sustrato: solvente de 1:10 con Ringer® como solvente. Al correlacionar el solvente utilizado con la relación de extracción se concluyó que el solvente utilizado influye más que la ratio para *Btk*, mientras que para *Bti* es, al contrario. Cuando la dilución es menor, la cantidad de células viables y esporas de *Bt* extraídas para ambas cepas es menor.

Los objetivos buscados de disrupción y liofilización fueron satisfactorios para disminuir las células viables e incrementar la producción de esporas y en consecuencia desprender el cristal proteico. En el caso de la disrupción se observó una disminución de células viables e incremento de esporas. Para la liofilización se observó que para el porcentaje de recuperación del fermentado después de liofilizarlo se obtenía un 86 y 89% de recuperación de las esporas para el *Btk* y *Bti*, respectivamente lo cual es satisfactorio porque se mantienen las propiedades del fermentado. La purificación con hexano no es favorable para un residuo como el digestato, ya que no se consigue separar por completo los cristales proteicos de las esporas y células viables.

En cuanto a la cantidad de proteína total que se produce, los valores son más bajos que en otros estudios con residuos, pero a partir de la electroforesis se puede determinar que ambas cepas de *Bt* producen las proteínas equivalentes para las plagas de lepidópteros y dípteros.

CAPÍTULO 9

Conclusiones generales

Las conclusiones generales extraídas de este trabajo son las siguientes:

- La fracción sólida de digestato de FORM puede ser utilizada para realizar una fermentación en estado sólido para la producción de un producto con propiedades biopesticidas a partir de *Bacillus thuringiensis*. En cambio, la fracción líquida del digestato no es óptima para el mismo fin debido a que la cantidad de nutrientes que contiene es limitada y los valores de pH son elevados para el crecimiento y esporulación de *Bacillus thuringiensis* a través de fermentación sumergida.
- La optimización del proceso en reactores aislados térmicamente de 10-L se ha realizado estudiando diferentes estrategias de operación, siendo la más adecuada aquella en la que se inoculó *Bacillus thuringiensis* al comienzo del proceso de FES para que este microorganismo pueda aclimatarse y sobrevivir. En estas operaciones se observó que la temperatura es un factor clave para la producción en FES de un biopesticida a partir de *Bacillus thuringiensis*.
- La comparación entre reactores aislados y no aislados térmicamente con agitación proporcionó como resultados que el *Bacillus thuringiensis* puede colonizar y esporular en ambos reactores, obteniendo un producto final a partir de digestato con una cantidad de células viables superior a 10^9 UFC g⁻¹ MS, y porcentajes de esporulación superiores al 84% en los reactores de 10-L, alcanzando el 97% en el reactor de 22-L.
- El escalado del proceso se ha llevado hasta un reactor de 100-L sin aislamiento térmico y con agitación, en el que se incrementó el contenido del material inicial en esporas hasta 3 veces y se observó una esporulación del 89%, mostrando producciones de biopesticida a partir de *Bacillus thuringiensis* comparables a las reportadas por otros autores. Estos resultados están siendo evaluados actualmente en una planta piloto de 200-L.
- Se han comparado dos especies de *Bacillus thuringiensis* en el proceso de FES, comprobando que las dos proporcionan buenos resultados. La variedad *kurstaki* ha mostrado efecto contra plagas de lepidópteros, (aplicada principalmente como producto líquido en tallos y hojas) mientras que la variedad *israelensis* suele aplicarse contra plagas de dípteros, que pueden atacar al cultivo a nivel de raíz permitiendo aplicar el producto sólido, tal como se obtiene de la FES. Los diferentes tratamientos de esterilización, higienización y congelado del digestato

afectan de forma similar al crecimiento posterior de las dos cepas, incrementándose los valores de células viables cuando se trabaja con digestato descongelado. La diferencia entre las cepas de *Bacillus thuringiensis* estudiadas es que *Bti* se desarrolla más rápido que *Btk*.

- Las técnicas de disrupción y liofilización para la extracción y conservación del cristal proteico con efecto biopesticida de *Bacillus thuringiensis* dio resultados satisfactorios. La disrupción disminuyó el valor de células viables e incrementando la producción de esporas con la consecuencia de desprender el cristal proteico. Mientras, a través de la liofilización se pueden mantener las propiedades biopesticidas del fermentado y ser una forma de conservación del material.
- El estudio de conservación del material final de la FES para su posterior uso como biopesticida suministró como resultados la posibilidad de almacenarse hasta 30 días tanto en forma sólida como líquida, pero siempre a una temperatura alrededor de los 4°C. Si se mantiene en líquido la extracción óptima fue de 1:10 con la solución salina de Ringer®, ya que las esporas se incrementan y éstas ayudan a incrementar el efecto biopesticida en las plagas, al contrario que en la muestra sólida donde las esporas tienden a disminuir.
- Los bioensayos realizados en diferentes plagas, *Plodia interpunctella* y *Pieris brassicae*, demuestran que el bioproducto obtenido con *Bt* a partir de digestato tiene propiedades biopesticidas en *Pieris brassicae*, pero no, en *Plodia interpunctella*. Por lo que se deduce que su efecto como biopesticida depende del tipo de plaga a la que se aplique el *Bacillus thuringiensis* y de la dosis suministrada del bioproducto. La efectividad del biopesticida producido se está evaluando en el marco del proyecto DECISIVE con resultados positivos.
- La purificación y cuantificación de la toxina fue satisfactoria, ya que a partir de una electroforesis se pudo determinar que ambas cepas de *Bacillus thuringiensis* producen las proteínas que afectan las plagas de lepidópteros y dípteros que se referencian en la bibliografía.

Referencias

Referencias

- Abdel-Shafya, H.I., Mansour, M.S.M., 2018. Solid waste issue: Sources, composition, disposal, recycling, and valorization. *Egypt. J. Pet.* 27(4), 1275-1290.
- Abraham, J., Gea, T., Komilis, D., Sanchez, A., 2017. Reproducibility of solid-state fermentation at bench-scale: the case of protease production. *Glob. Nest. J.* 19(2), 183–190.
- 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. *Biochem. Eng. J.* 74, 15–19.
- Adams, T.T., Eiteman, M.A., Hanel, B.M., 2002. Solid state fermentation of broiler litter for bioinsecticide production. *Bioresour. Technol.* 82, 33-41.
- 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 Manage.* 26, 41–48.
- Alef, K., Nannipieri, P., 1995. 7–Enzyme activities A2–Alef, Kassem. In: Nannipieri, P. (Eds.), *Methods in Applied Soil Microbiology and Biochemistry*. Academic Press, London, pp.311–373.
- Alibardi, L., Cossu, R., 2015. Composition variability of the organic fraction of municipal solid waste and effects on hydrogen and methane production potentials. *Waste Manage.* 36, 147–155.
- Alves, L.F.A., Alves, S.B., Pereira, R.M., Capalbo, D.M.F., 1997. Production of *Bacillus thuringiensis* Berliner var. *kurstaki* grown in alternative media. *Biocontrol Sci. Technol.* 7(3), 377–383.
- Anakwenze, V.N., Ezemba, C.C. Ekwealor, I.A., 2014. Optimization of fermentation conditions of *Bacillus thuringiensis* ECI for enhanced methionine production. *Adv Microbiol*, 4, 344-352.
- Anastasi, A., Varese, G., Marchisio, V. F., 2005. Isolation and identification of fungal communities in compost and vermicompost. *Mycologia.* 97(1), 33–44.
- Arthur, F. H., Phillips., T. W., 2003. Stored-product insect pest management and control, in Y. H. Hui, B.L., Bruinsma, J.R., Gorham, W.K., Nip, P.S., Tong, P Ventresca., (Eds.), *Food plant sanitation*. Marcel Dekker. New York. pp. 341–358.
- Atalia, K.R., Buha, D.M., Bhavsar, K.A., Shah, N.K., 2015. A Review on composting of municipal solid waste. *J Environ Sci Toxicol Food Technol.* 9(5), 20–29.
- Atkinson, B., Mavituna, F., 1991. *Biochemical engineering and biotechnology handbook* (2nd ed.). London: Macmillan.

- Ballardo, C., Abraham, J., Barrena, R., Artola, A., Gea, T., Sánchez, A., 2016. Valorization of soy waste through SSF for the production of compost enriched with *Bacillus thuringiensis* with biopesticide properties. *J. Environ. Manage.* 169, 126–131.
- Ballardo, C., Barrena, R., Artola, A., Sánchez, A., 2017. A novel strategy for producing compost with enhanced biopesticide properties through solid-state fermentation of biowaste and inoculation with *Bacillus thuringiensis*. *Waste Manage.* 70, 53–58.
- Barbarán-Vilela, A., Cieza-Díaz, D., Guillén-Domínguez, R., Joaquín-Neira, F., Montenegro-Saavedra, F., Geldres-Vigil, E., 2015. Biorremediator effect of *Bacillus Thuringiensis* on fruit crops soils contaminated with herbicides 2,4 dichlorophenoxyatec acid. *Refi Upn.* 3(2), 7-17.
- 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 Manage.* 34(7), 1109–1116.
- Barrena, R., Gea, T., Ponsá, S., Ruggieri, L., Artola, A., Font, X., Sánchez, A., 2011. Categorizing raw organic material biodegradability via respiration activity measurement: A review. *Compost Sci. Util.* 19(2), 105-113.
- Barrena, R., Vázquez, F., Sánchez, A., 2006. The use of respiration indices in the composting process: a review. *Waste Manage. Res.* 24(1), 37–47.
- Bauer, A., Mayr, H., Hopfner-Sixt, K., Amon, T., 2009. Detailed monitoring of two biogas plants and mechanical solid–liquid separation of fermentation residues. *J. Biotechnol.* 142(1), 56–63.
- Beegle, C. C., Couch, T. L., Alls, R. T., Versoi, P. L., Lee, B. L., 1986. Standarization of HD-1-S-1980: U.S. Standard for the assay of lepidopterous-active *Bacillus thuringiensis*. *Bull. Entomol. Soc. Am.* 32(1), 44-45.
- Beegle, C., 1990. Bioassay methods for quantification of *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin. in analytical chemistry of *Bacillus thuringiensis*. 14–21
- Behera, B. K., Varma, A., 2017. Microbial biomass process technologies and management. Switzerland: Springer International Publishing AG.
- Behle, R.W., McGuire, M.R., Gillespie, R.L., Shasha, B.S., 1997. Effects of alkaline gluten on the insecticidal activity of *Bacillus thuringiensis*. *J. Econ. Entomol.* 90, 354-360.
- Betz, F.S., Hammond, B.G., Fuchs, R.L., 2000. Safety and advantages of *Bacillus thuringiensis*-protected plants to control insect pests. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 32(2), 156–173.
- Bharadwaj, D.N., 2016. Sustainable Agriculture and Plant Breeding, in Al-Khayri, J.M., Jain, S.M., Johnson, D.V. (Eds.). *Advances in plant breeding strategies: agronomic, abiotic and biotic stress Traits*. Springer. Switzerland. pp. 3–33.
- Bocken, N.P., Olivetti, E.A., Cullen, J.M., Potting, J., Lifset, R., 2017. Taking the circularity to the next level: A special issue on the circular economy. *J. Ind. Ecol.* 21, 476–482.

- Botton, V., Piovan, L., Meier, H.F., Mitchell, D.A., Cordova, J., Krieger, N., 2018 Optimization of biodiesel synthesis by esterification using a fermented solid produced by *Rhizopus microsporus* on sugarcane bagasse. *Bioprocess. Biosyst. Eng.* 41, 573-583.
- Braak, N., Neve, R., Jones, A. K., Gibbs, M., Breuker, C. J., 2018. The effects of insecticides on butterflies – a review. *Environ. Pollut.* 242, 507-518.
- Brar, S. K., Verma, M., Tyagi, R. D., Surampalli, R.Y., Barnabe, S., Valero, J.R., 2007. *Bacillus thuringiensis* proteases: Production and role in growth, sporulation and synergism. *Process Biochem.* 773-790
- Brar, S.K., Verma, M., Tyagi, R.D., Valéro, J.R., 2006. Recent advances in downstream processing and formulations of *Bacillus thuringiensis* based biopesticides. *Process Biochem.* 41(2), 323-342.
- Brar, S.K., Verma, M., Tyagi, R.D., Valéro, J.R., Surampalli, R.Y., 1989. Starch industry wastewater-based stable *Bacillus thuringiensis* liquid formulations. *J. Econ. Entomol.* 98(6), 1890-1898.
- Bravo, A., Likitvivatanavong, S., Gill, S.S., Soberon, M., 2011. *Bacillus thuringiensis*: a story of a successful bioinsecticide. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 41(7), 423-431.
- Browne, J., Murphy, J., 2013. Assessment of the resource associated with biomethane from food waste. *Appl. Energy.* 104, 170-177.
- Carvalho, F.P., 2006. Agriculture, pesticides, food security and food safety. *Environ. Sci. Policy.* 9(7-8), 685-692.
- Cerda, A., Gea, T., Vargas-García, M., Sánchez, A., 2017a. Towards a competitive solid state fermentation: cellulases production from coffee husk by sequential batch operation and role of microbial diversity. *Sci. Total Environ.* 589, 56-65.
- Cerda, A., Mejías, L., Gea, T., Sánchez, A., 2017b. Cellulase and xylanase production at pilot scale by solid-state fermentation from coffee husk using specialized consortia: the consistency of the process and the microbial communities involved. *Bioresour. Technol.* 243, 1059-1068.
- Cerda, A., Mejias, L., Rodríguez, P., Rodríguez, A., Artola, A., Font, X., Gea, T., Sánchez, A., 2019. Valorisation of digestate from biowaste through solid-state fermentation to obtain value added bioproducts: a first approach. *Bioresour. Technol.* 271, 409-416.
- Chanakya, H.N., Reddy, B.V.V., Modak, J., 2009. Biomethanation of herbaceous biomass residues using 3-zone plug flow like digesters - a case study from India. *Renew. Energy.* 34, 416-420.
- Chandler, D., Bailey, A.S., Tatchell, G.M., Davidson, G., Greaves, J., Grant, W.P., 2011. The development, regulation and use of biopesticides for integrated pest management. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 366 (1573), 1987-1998.
- Clark, B.W., Philips, T.A., Coats, J.R., 2005. Environmental fate and effects of *Bacillus thuringiensis* (Bt) proteins from transgenic crops: a review. *J. Agric. Food Chem.* 53, 4643-4653.

- Corts, A.D., Thomason, L.C., Gill, R.T., Gralnick, J.A., 2019. A new recombinering system for precise genome-editing in *Shewanella oneidensis* strain MR-1 using single-stranded oligonucleotides. *Sci Rep.* 9, 39.
- Costa, J.A.V., Treichel, H., Kumar, V., Pandey, A., 2018. Advances in Solid-State Fermentation, in: Pandey, A., Larroche, C., Soccol, C.R. (Eds.), *Current Developments in Biotechnology and Bioengineering: Current Advances in Solid-State Fermentation*. Elsevier B.V., Amsterdam, Netherlands, pp. 1–17.
- Dahlin, A.S., Eriksson, J., Campbell, C.D., Öborn, I., 2016. Soil amendment affects Cd uptake by wheat- are we underestimating the risks from chloride inputs? *Sci. Total Environ.* 554–555, 349–357.
- Dambach, P., Louis, V.R., Kaiser, A., Ouedraogo, S., Sié, A., Sauerborn, R., Becker, N., 2014. Efficacy of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* against malaria mosquitoes in northwestern Burkina Faso. *Parasites Vectors.* 7(1), 1–8.
- Darriet, F., 2016. An anti-mosquito mixture for domestic use, combining a fertiliser and a chemical or biological larvicide. *Pest Manag. Sci.* 72(7), 1340–1345.
- De Baere, L., 2008. Partial stream digestion of residual municipal solid waste. *Water Sci. Technol.* 57(7), 1073–1077.
- De Baere, L., Mattheeuws, B., Velghe, F., 2010. State of the art of anaerobic digestion in Europe. In: 12th World Congress on Anaerobic Digestion, Guadalajara, Mexico.
- DECISIVE: A Decentralised management Scheme for Innovative Valorisation or Urban Biowaste. <http://www.decisive2020.eu/>
- Delecluse, A., Charles, J.-F., Klier, A., Rapoport, G., 1991. Deletion by In-vitro recombination shown that the 28 kilodalton cytolytic polypeptide from *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* is not essential for mosquitocidal activity. *J. Bacteriol.* 173(11), 3374–3381.
- Devi, P.S., Ravinder, T., Jaidev, C., 2005. Cost-effective production of *Bacillus thuringiensis* by solid-state fermentation. *J. Invertebr. Pathol.* 88(2), 163–168.
- Dhillon, G., Kaur, S., Brar, S., Verma, M., 2012. Potential of apple pomace as a solid substrate for fungal cellulase and hemicellulase bioproduction through solid-state fermentation. *Ind. Crop. Prod.* 38, 6–13.
- Diacono, M., Montemurro, F., 2010. Long-term effects of organic amendments on soil fertility. *Agron. Sustain. Dev.* 30, 401–422.
- Drennan, M.F., DiStefano, T.D., 2010. Characterization of the curing process from high-solids anaerobic digestion. *Bioresour. Technol.* 101(2), 537–544.
- Drosg, B., Braun, R., Bochmann, G., Al Saedi, T., 2013. Analysis and characterisation of biogas feedstocks, in: Wellinger, A., Murphy, J.P., Baxter, D. (Eds.), *Biogas Handbook*. Woodhead Publ Ser Biomater. pp. 52–84.

- Dulmage, H. T., Rhodes, R. A., 1971. Production of pathogen in artificial media. in microbial control of insects and mites, in: Burges, H., Hussey, N. W., (Eds.). Academic Press, London, UK. pp. 507.
- Dulmage, T., 1970. Production of the Spore- δ -Endotoxin Complex by Variants of *Bacillus thuringiensis* in two fermentation media. J. Invertebr. Pathol. 16 (3), 385-389.
- EFSA Panel on Biological Hazards (BIOHAZ) 2016. Risks for public health related to the presence of *Bacillus cereus* and other *Bacillus spp.* including *Bacillus thuringiensis* in foodstuffs. EFSA Journal, 14 (7),4524.
- El-Bakry, M., Abraham, J., Cerda, A., Barrena, R., Ponsá, S., Gea, T., Sánchez, A. 2015. From wastes to high value-added products: novel aspects of SSF in the production of enzymes. Crit. Rev. Environ. Sci. Technol. 45 (18), 1999-2042.
- El-Bendary, M.A., 2006. *Bacillus Thuringiensis* and *Bacillus Sphaericus* biopesticides production. J. Basic Microbiol.46(2), 158–170.
- El-Bendary, M.A., Moharam, M.E., Mohamed, S.S., Hamed, S.R., 2016. Pilot scale production of mosquitocidal toxins by *Bacillus thuringiensis* and *Lysinibacillus sphaericus* under solid state fermentation. Biocontrol Sci. Technol. 26(7), 980–994.
- El-Bendary, M.A., Moharam, M.E., Roshdy, A.M., 2019. Spore toxin complex recovery from solid-state fermentation of some mosquitocidal *Bacilli*. Biocontrol Sci. Technol. 29(7), 661-670.
- Elleuch, J., Tounsi, S., Hassen, N.B.B., Lacoix, M.N., Chandre, F., Jaoua, S., Zghal, R.Z., 2015. Characterisation of novel *Bacillus thuringiensis* isolates against *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) and *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephridae). J. Invertebr. Pathol. 124, 90–97.
- Enger, K.S., Mitchell, J., Murali, B., Birdsell, D.N., Keim, P., Gurian, P.L., Wagner, D.M., 2018. Evaluating the long-term persistence of *Bacillus* spores on common surfaces. Microb. Biotechnol. 11(6), 1048–1059.
- Ernandes, S., 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 Sci-technol. 35(1), 11–18.
- Escobar, J.M, Pardo, E.M., Buitrago, G., López, L.A., 2004. Exploratory analysis for the optimization of culture media for *Bacillus thuringiensis* fermentation. Rev. Colomb. Biotecnol. 6(2), 43-53.
- European Environment Agency (EPA). <https://www.epa.gov/pesticides/biopesticides> (Acceso Abril 2019).
- European Parliament and Council Regulation (EC) No 142/2011; Official Journal of the European Union: Brussels, Belgium, 2011; Volume 54, pp. 1–254.
- Eurostat. Municipal Waste Generation and Treatment, by Treatment Method. Available online: <http://ec.europa.eu/eurostat/web/environment/waste/main-tables> (Acceso 1 Agosto 2019).

- FAO, 2011. Global food losses and food waste. URL: <http://www.fao.org/docrep/014/mb060e/mb060e00.pdf> (Acceso 01-07-2019).
- Farinas, C.S., 2015. Developments in solid-state fermentation for the production of biomass-degrading enzymes for the bioenergy sector. *Renew. Sust. Energ. Rev.* 52, 179-188.
- Fava, F., Totaro, G., Diels, L., Reis, M., Duarte, J., Carioca, O. B., Poqqi-Varaldo, H. M., Ferreira, B. S., 2015. Biowaste biorefinery in Europe: Opportunities and research and development needs. *New Biotech.* 32, 100–108.
- Federal Government of Germany, 2001. Ordinance on environmentally compatible storage of waste from human settlements on biological waste-treatment facilities of 20 February 2001.
- Federici, B. A., Luthy, P., Ibarra, J. E., 1990. Parasporal body of *Bacillus thuringiensis* var *israelensis*, structure, protein composition and toxicity, pp. 16-44. In H. deBarjac and D.J.Sutherland (eds.) ,*Bacteriological control of mosquitoes and blackflies*. Rutgers University Press, New Brunswick, NJ.
- Ferguson, R.M., Coulon, F., Villa, R., 2016. Organic loading rate: a promising microbial management tool in anaerobic digestion. *Water Res.* 100, 348–356
- Fisher, K.A., Yarwood, S.A., James, B.R., 2017. Soil urease activity and bacterial ureC gene copy numbers: Effect of pH. *Geoderma.* 285, 1–8.
- Fleming, D., Musser, F., Reisig, D., Greene, J., Taylor, S., Parajulee, M., 2018. Effects of transgenic *Bacillus thuringiensis* cotton on insecticide use, heliothine counts, plant damage, and cotton yield: A meta-analysis, 1996-2015. *PLoS One.* 13(7), e0200131.
- Foda, M.S., El-Beih, F.M., Moharam, M.E., El-Gamal, N.N.A., 2010. Physiological formation of mosquitocidal toxin by a novel *Bacillus thuringiensis* isolate under solid state fermentation. *Life Sci. J.* 7(4), 144–152.
- Foda, M.S., Ismail, I.M.K., Moharam, M.E. and Sadek, KH.H.A., 2002. A novel approach for production of *Bacillus thuringiensis* by solid state fermentation. *Egypt J. Microbiol.* 37, 135–155.
- Foschino, R., 2002. Freezing injury of *Escherichia coli* during the production of ice cream. *Ann. Microbiol.* 52(1), 39-46.
- Fuchs, W., Drosig, B., 2013. Assessment of the state of the art of technologies for the processing of digestate residue from anaerobic digesters. *Water Sci. Technol.* 67 (9), 1984–1993.
- Fuente-Salcido, N.M., Casados-Vázquez, L.E., García-Pérez, A.P., Barboza-Pérez, U.E., Bideshi, D.K., Salcedo-Hernández, R., Barboza-Corona, J.E., 2016. The endochitinase ChiA *Btt* of *Bacillus thuringiensis* subsp. *tenebrionis* DSM-2803 and its potential use to control the phytopathogen *Colletotrichum gloeosporioides*. *MicrobiologyOpen.* 5 (5), 819–829.
- Gill, H.K., Grag, H., 2014. Pesticides: environmental impacts and management strategies. Intechopen, in: Larramendy, M.L., Soloneski, S. Pesticides(Eds.). Toxic Aspects. Harsh Garg. v8, pp. 189-229.

- Gitahy, P.M., de-Souza, M.T., Monnerat, R.G., Arrigoni, E.B., Baldani, J.I., 2007. A Brazilian *Bacillus thuringiensis* strain highly active to sugarcane borer *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Cramidae). Braz. J. Microbiol. 38, 531-537.
- Göbber, U., Lang, S., Wagner, F., 1984. Sophorose lipid formation by resting cells of *Torulopsis bombicola*. Biotechnol. Lett. 6(4), 225–230.
- Goldberg, I., Sneh, B., Battat, E., Klein, D., 1980. Optimization of a medium for a high yield production of spore-crystal preparation of *Bacillus thuringiensis* effective against the Egyptian cotton leaf worm *Spodoptera littoralis* Bois. Biotechnol. Lett. 2(10),419–426.
- Gómez, R.B., Lima, F.V., Ferrer, A.S., 2006. The use of respiration indices in the composting process: a review. Waste Manage. Res. 24(1), 37–47.
- Gonçalves, K.C., Júnior, A.L.B., Duarte, R.T., Moreira, L.F., Nascimento, J., Polanczyk, R.A., 2018. *Spodoptera albula* susceptibility to *Bacillus thuringiensis*-based biopesticides. J. Invertebr. Pathol. 157, 147-149.
- González-Ponce, K.S., Casados-Vázquez, L.E., Salcedo-Hernández, R., Bideshi, D.K., del Rincón-Castro, M.C., Barboza-Corona, J.E., 2017. Recombinant *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD73 strain that synthesizes Cry1Ac and chimeric ChiA74Δsp chitinase inclusions. Arch. Microbiol. 199(4), 627–633.
- 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. Anim. Feed Sci. Technol. 144, 1-22.
- Guedes, R.N.C., Smagghe, G., Stark, J.D., Desneux, N., 2016. Pesticide-induced stress in arthropod pests for optimized integrated pest management programs. Annu. Rev. Entomol. 61, 43-62.
- Guo, Z., Kang, S., Zhu, X., Wu, Q., Wang, S., Xie, W., Zhang, Y., 2015. The midgut cadherin-like gene is not associated with resistance to *Bacillus thuringiensis* toxin Cry1Ac in *Plutella xylostella* (L.). J. Invertebr. Pathol. 126, 21-30.
- Gutiérrez, Y., Ramos, G.S., Tomé, H.VV., Oliveira, E.E., Salaro, A.L., 2017. *Bti* based insecticide enhances the predatory abilities of the backswimmer *Buenoa tarsalis* (Hemiptera: Notonectidae). Ecotoxicology. 26(8), 1147–1155.
- Hayakawa, T., Sakakibara, A., Ueda, S., Azuma, Y., Ide, T., Takebe, S., 2017. Cry46Ab from *Bacillus thuringiensis* TK-E6 is a new mosquitocidal toxin with aerolysin-type architecture. Insect Biochem. Mol. Biol. 87, 100–106.
- Hölker, U., Höfer, M., Lenz, J., 2004. Biotechnological advantages of laboratory-scale solid-state fermentation with fungi. Appl. Microbiol. Biotechnol. 64(2), 175–186.
- Içgen, Y., Içgen, B., Ozcengiz, G., 2002. Regulation of crystal protein biosynthesis by *Bacillus thuringiensis*: I. Effects of carbon and nitrogen sources. Res. Microbiol. 153(9), 605–609.
- Iriarte, J., Caballero, P., 2001. Biología y ecología de *Bacillus thuringiensis*, in Iriarte, J., Caballero, P. (Eds.) Bioinsecticidas: fundamentos y aplicaciones de "*Bacillus*

- thuringiensis*" en el control integrado de plagas Servicio de Publicaciones de la Universidad Pública de Navarra. España. pp. 15–44.
- Jiménez-Peñalver, P., Gea, T., Sánchez, A., Font, X., 2016. Production of sophorolipids from winterization oil cake by solid-state fermentation: optimization, monitoring and effect of mixing. *Biochem. Eng. J.* 115, 93–100.
- Jisha, V. N., Smitha, R.B., Priji, P., Sajith, S., Benjamin, S., 2014. Biphasic fermentation is an efficient strategy for the overproduction of δ -endotoxin from *Bacillus thuringiensis*. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 175 (3), 1519–1535.
- Jouzani, G.S., Abbasalizadeh, S., Moradali, M. F., Morsali, H., 2015. Development of a Cost Effective Bioprocess for Production of an Iranian Anti-Coleoptera *Bacillus thuringiensis* Strain *J. Agric. Sci. Technol.* 17, 1183-1196.
- Jouzani, G.S., Valijanian, E., Sharafi, R., 2017. *Bacillus thuringiensis*: a successful insecticide with new environmental features and tidings. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 101, 2691–2711.
- Kayhanian, M., 1999. Ammonia inhibition in high-solids biogasification: an overview and practical solutions. *Environ. Technol.* 20(4), 355–365.
- Keshavareddy, G., Kumar, A.R.V., 2016. *Bacillus thuringiensis*, in: Omkar O. (Ed.). *Ecofriendly pest management for food security*. London: Academic Press. pp. 443–73.
- Khedher, B.S., Jaoua, S., Zouari, N., 2011. Improvement of bioinsecticides production by sporeless *Bacillus thuringiensis* strains in response to various stresses in low cost medium. *Curr. Microbiol.* 62(5), 1467–1477.
- Kim, Y.S., Jin, N.Y., Lee, Y.K., Kim, H.J., Hur, Y.A., Youn, Y.N., Yu, A.Y.M., 2017. Characteristics of new *Bacillus thuringiensis* strains isolated from soils in the vicinity of the Baekdu mountain and biological activity against *Spodoptera exigua*. *J. Fac. Agric. Hokkaido Univ.* 62(2), 419–428.
- Knoop, C., Donrack, C., Raab, T., 2017. Effect of drying, composting and subsequent impurity removal by sieving on the properties of digestates from municipal organic wastes. *Waste Manage.* 72, 168-177.
- Koch, M.S., Ward, J.M., Levine, S.L., Baum, J.A., Vicini, J.L., Hammond, B.G., 2015. The food and environmental safety of *Bt* crops. *Front. Plant Sci.* 6, 1–22.
- Kothari, R., Pandey, A.K., Kumar, S., Tyagi, V.V., Tyagi, S.K., 2014. Different aspects of dry anaerobic digestion for bioenergy: an overview. *Renew. Sust. Energ. Rev.* 39, 174–195.
- Koul, O., 2011. Microbial biopesticides: opportunities and challenges. *CAB Reviews: Perspectives in Agriculture, Veterinary Science, Nutrition and Natural Resources.* 6 (056).
- Krishania, M., Sindhu, R., Binod, P., Ahluwalia, V., Kumar, V., SinghSangwan, R., Pandey, A., 2018. Chapter 5 - Design of Bioreactors in Solid-State Fermentation. *Current Developments in Biotechnology and Bioengineering. Current Advances in Solid-State Fermentation.* pp 83-96.

- Krogmann, U., Boyles, L.S., Martel, C.J., McComas, K.A., 1997. Biosolids and sludge management. *Water Res.* 69, 534–550.
- Lacey, L. A., Frutos, R., Kaya, H. K., Vail, P., 2001. Insect pathogens as biological control agents: Do they have a future? *Biol. Control.* 21 (3), 230–248.
- Lachhab K., Tyagi R.D., Valéro J.R., 2001. Production of *Bacillus thuringiensis* biopesticides using wastewater sludge as a raw material: effect of inoculum and sludge solids concentration. *Process Biochem.* 37, 197–208.
- Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head bacteriophage T4. *Nature.* 227, 680-685.
- Lang, A., Otto, M., 2010. A synthesis of laboratory and field studies on the effects of transgenic *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) maize on non-target Lepidoptera. *Entomol. Exp. Appl.* 135, 121–134.
- Ley 22/2011, de 28 de julio, de residuos y suelos contaminados. Boletín Oficial del Estado, 28 de julio de 2011, num. 181, pp.85650-85705.
- Li, Y., Park, S.Y., Zhu, J., 2011. Solid-state anaerobic digestion for methane production from organic waste. *Renew. Sust. Energ. Rev.* 15, 821– 826.
- Lima-Pérez, J., López-Pérez, M., Viniestra-González, G., Loera, O., 2019. Solid-state fermentation of *Bacillus thuringiensis* var *kurstaki* HD-73 maintains higher biomass and spore yields as compared to submerged fermentation using the same media. *Bioprocess. Biosyst. Eng.* 1(9), 1615-7605.
- Lin, L., Yang, L., Xu, F., Michel, F.C., Li, Y., 2014. Comparison of solid-state anaerobic digestion and composting of yard trimmings with effluent from liquid anaerobic digestion. *Bioresour. Technol.* 169, 439–446.
- Lohri, C.R., Diener, S., Zabaleta, I., Mertenat, A., Zurbrugg, C., 2017. Treatment technologies for urban solid biowaste to create value products: a review with focus on low- and middle-income settings. *Rev. Environ. Sci. Biotechnol.* 16, 81–130.
- Long, O.Mc.D., Warren, R., Price, J., Brereton, T.M., Botham, M.S., Franco, A.M.A., 2017. Sensitivity of UK butterflies to local climatic extremes: Which life stages are most at risk? *J. Anim. Ecol.* 86, 108–116.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J., 1951. Protein measurement with the folin-phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 267-275.
- Lü, F., Shao, L.-M., Zhang, H., Fu, W.-D., Feng, S.-J., Zhan, L.-T., Chen, Y.-M., He, P.-J., 2017. Application of advanced techniques for the assessment of bio-stability of biowaste-derived residues: a minireview. *Bioresour. Technol.* 248, 122-133.
- Luna, C.L., Finkler, L., 2008. Production of concentrates of bacterial bioinsecticide *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* by flocculation/sedimentation. *Acta Trop.* 107 (2), 134–138.
- Luna-Finkler, C.L., Finkler, L. 2012. *Bacillus sphaericus* and *Bacillus thuringiensis* to Insect Control: Process Development of Small-Scale Production to Pilot-Plant- Fermenters. in:

- Luna-Finkler, C.L., Finkler, L. (Eds.) Insecticides – Advances in Integrated Pest Management, Chapter 27.
- Lund, B.M., 2000. Freezing, in: Lund, B.M., Baird Parker, T.C., Gould, G.W. (Eds.). The Microbiological safety and quality of food, vol. I. Aspen Publishers, Gaithersburg, M.D., pp. 122-145.
- Makádi, M., Tomócsik, A., Orosz, V., 2012. Digestate: a new nutrient source-review. Biogas. InTech. <https://www.intechopen.com/books/biogas/digestate-a-new-nutrient-source-review>. (Accessed 02 Jun 2019).
- Malinauskaite, J., Jouhara, H., Czajczyńska, D., Stanchev, P., Katsou, E., Rostkowski, P., Thorne, R. J., Colón, J., Ponsá, S., Al-Mansour, F., Anguilano, L., Krzyżyńska, R., López, I.C., Vlasopoulos, A., Spencer, N., 2017. Municipal solid waste management and waste-to-energy in the context of a circular economy and energy recycling in Europe. Energy. 141, 2013–2044.
- Markwick, N., Christeller, J.T., Docherty, L.C., Lilley, C.M., 2001. Insecticidal activity of avidin and streptavidin against four species of pest Lepidoptera. Entomol. Exp. Appl. 98 (1), 59-66.
- Marrone, P.G., 2007. Barriers to adoption of biological control agents and biological pesticides. CAB Reviews: perspectives in agriculture, veterinary science, nutrition and natural resources. 2 (15) Wallingford, UK: CABI Publishing.
- Martínez, O., Sánchez, A., Font, X., Barrena, R., 2017. Valorization of sugarcane bagasse and sugar beet molasses using *Kluyveromyces marxianus* for producing value-added aroma compounds via solid-state fermentation. J. Clean Prod. 158, 8–17.
- Martínez, O., Sánchez, A., Font, X., Barrena, R., 2018. Enhancing the bioproduction of value-added aroma compounds via solid-state fermentation of sugarcane bagasse and sugar beet molasses : operational strategies and scaling-up of the process. Bioresour. Technol. 263, 136–144.
- Mata-Alvarez, J., Mace, S., Llabres, P., 2000. Anaerobic digestion of organic solid wastes. An overview of research achievements and perspectives. Bioresour Technol. 74(1),3–16.
- Matsuda, T., Yano, J., Hirai, Y., Sakai, S.-I., 2012. Life-cycle greenhouse gas inventory analysis of household waste management and food waste reduction activities in Kyoto. Japan. Int. J. Life Cycle Assess. 17(6), 743–752.
- McClintock, J.T., Schaffer, C.R., Sjoblad, R.D., 1995. A comparative review of the mammalian toxicity of *Bacillus thuringiensis*-based pesticides. Pestic. Sci. 45, 95-105.
- McKenney, P.T., Driks, A., Eichenberger, P., 2013. The *Bacillus subtilis* endospore: assembly and functions of the multilayered coat. Nat. Rev. Microbiol. 11, 33-44.
- Mechalas, B. J., 1963. Method for the production of microbial insecticides. U.S. Patent 3086922.
- Mejías, L., Cerda, A., Barrena, R., Gea, T., Sánchez, A., 2018. Microbial strategies for cellulase and xylanase production through solid-state fermentation of digestate from biowaste. Sustainability. 10, 2433.

- Mejías, L., Komilis, D., Gea, T., Sánchez, A., 2017 The effect of airflow rates and aeration mode on the respiration activity of four organic wastes: Implications on the composting process. *Waste Manage.* 65, 22–28.
- Miresmailli, S., Isman, M. B., 2014. Botanical insecticides inspired by plant–herbivore chemical interactions. *Trends Plant Sci.* 19 (1), 29-35.
- Mohammedi, S., Subramanian, S.B., Yan, S., Tyagi, R.D., Valéro, J.R., 2006. Molecular screening of *Bacillus thuringiensis* strains from wastewater sludge for biopesticide production. *Process Biochem.* 41, 829–835.
- Mohandass, S., Arthur, F.H., Zhu, K.Y., Throne., J.E., 2007. Biology and management of *Plodia interpunctella* (Lepidoptera: *Pyalidae*) in stored products. *J. Stored Prod. Res.* 43, 302–11.
- Möller, K., Müller, T., 2012. Effects of anaerobic digestion on digestate nutrient availability and crop growth: a review. *Eng. Life Sci.* 12(3), 242–257.
- Mona Fatin Syazwanee M.G., Noormasshela, U.A., Nor Azwady, A.A., Rusea, G, Muskhazli, M., 2016. *Bacillus thuringiensis* entomotoxicity activity in wastewater sludge-culture medium towards *Bactrocera dorsalis* and their histopathological assessment. *Sains Malays.* 45(4), 589-594.
- Monlau, F., Sambusiti, C., Ficara, E., Aboulkas, A., Barakat, A., Carrere, H., 2015. New opportunities for agricultural digestate valorization: current situation and perspectives. *Energy Environ. Sci.* 8(9), 2600–2621.
- Mor, S., Ravindra, K., Dahiya, R.P., Chandra, A., 2006. Leachate characterization and assessment of groundwater pollution near municipal solid waste landfill site. *Environ. Monit. Assess.* 118(1–3), 435–456.
- Moustafa, M.A.M., Saleh, M.A., Izat, R., Ateya, I.R., Mohamed, A., Kandil, M.A., 2018. Influence of some environmental conditions on stability and activity of *Bacillus thuringiensis* formulations against the cotton leaf worm, *Spodoptera littoralis* (Boisd.) (Lepidoptera: *Noctuidae*). *Egypt. J. Biol. Pest Control* 28, 61.
- Mummigatti, S.G., Raghunathan, A.N., 1988. Production of *Bacillus thuringiensis* var. *Kurstaki* by three different methods and its relative toxicity to *Bombyx mori*. *J. Invertebr. Pathol.* 51, 115–118.
- Musatti, E., Ficara, C., Mapelli, Sambusiti, C., Rollini, M., 2017. Use of solid digestate for lignocellulolytic enzymes production through submerged fungal fermentation *J. Environ. Manage.* 199, 1-6.
- Nagel, F.J.J., Tramper, J., Bakker, M.S., Rinzema, A., 2001. Temperature control in a continuously mixed bioreactor for solid-state fermentation. *Biotechnol. Bioeng.* 72, 219–230.
- Naimov, S., Weemen-Hendriks, M., Dukiandjiev, S., De Maagd, R.A., 2001. *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin Cry hybrid proteins with increased activity against the Colorado potato beetle. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 5328-5330.

- Nair, K., Al-Thani, R., Al-Thani, D., Al-Yafei, F., Ahmed, T., Jaoua, S., 2018. Diversity of *Bacillus thuringiensis* strains from Qatar as shown by crystal morphology, dendotoxins and cry gene content. *Front. Microbiol.* 9, 708.
- Nansen, C., Phillips, T. W., 2004. Attractancy and toxicity of an attracticide for Indian meal moth, *Plodia interpunctella* (Lepidoptera: *Pyralidae*). *J. Econ. Entomol.* 97, 703–10.
- Navon, A., 2000. *Bacillus thuringiensis* insecticides in crop protection: reality and prospects. *Crop Prot.* 19(8-10), 669-676.
- Ndao, A., Sellamuthu, B., Gnepe, J.R., Tyagi, R.D., Valero, J.R., 2017. Pilot-scale biopesticide production by *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* using starch industry wastewater as raw material. *J. Environ. Sci. Health Part B-Pestic. Contam. Agric. Wastes.* 52(9), 623-630.
- Nicholson, W.L., Munakata, N., Horneck, G., Melosh, H.J., Peter, S., 2000. Resistance of *Bacillus* endospores to extreme terrestrial and extraterrestrial environments. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 64(3), 548–572.
- Nkoa, R., 2014. Agricultural benefits and environmental risks of soil fertilization with anaerobic digestates: a review. *Agron. Sustain. Dev.* 34(2), 473–492.
- Novelli, P.K., Barros, M.M., Fleuri, L.F., 2016. Novel inexpensive fungi proteases: production by solid state fermentation and characterization. *Food Chem.* 198, 119–124.
- Oerke, E-C., 2006. Crop losses to pests. *J. Agric. Sci.* 144, 31-43.
- Olson, S., 2015. An Analysis of the Biopesticide Market Now and Where it is Going. *Outl. Pest. Manage.* 26(5), 203-206.
- Osborn, F.R., Melfran, J., Herrera, M.J., Gómez, C.J., Salazar, A., 2007. Comparison of two commercial formulations of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* for the control of *Anopheles aquasalis* (Diptera: *Culicidae*) at three salt concentrations. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 102(1), 69-72.
- Ozcan, O., Icgen, B., Ozcengiz, G., 2010. Pretreatment of poultry litter improves *Bacillus thuringiensis*-based biopesticides production. *Bioresour. Technol.* 101, 2401–2404.
- Ozkan, M., Dilek, F. B., Yetis, U., Ozcengiz, G., 2003. Nutritional and cultural parameters influencing antidipteran delta-endotoxin production. *Res. Microbiol.* 154(1), 49–53.
- Paavola, T., Rintala, J., 2008. Effects of storage on characteristics and hygienic quality of digestates from four co-digestion concepts of manure and biowaste. *Bioresour. Technol.* 99(15), 7041–7050.
- Palma, L., Scott, D.J., Harris, G., Din, S.U., Williams, T.L., Roberts, O.J., Berry, C., 2017. The Vip3Ag4 insecticidal protoxin from *Bacillus thuringiensis* adopts a tetrameric configuration that is maintained on proteolysis. *Toxins.* 9(5), 165.
- Pandey, A., 2003. Solid - state fermentation. *Biochem. Eng. J.* 13, 81–84.
- Pandey, A., Soccol, C. R., Mitchell, D., 2000. New developments in solid state fermentation : I-bioprocesses and products. *Process Biochem.* 35, 1153–1169.

- Pandey, A., Soccol, C.R., Larroche, C., 2007. Current Developments in Solid-State Fermentation. Springer Science/Asiatech Publishers Inc, New York, USA/New Delhi, India, pp. 13–25.
- Pardo-López, L., Soberón, M., Bravo, A., 2013. *Bacillus thuringiensis* insecticidal three-domain Cry toxins: mode of action, insect resistance and consequences for crop protection. *Fems Microbiol. Rev.* 37, 3-22.
- 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*. *Bioresour. Technol.* 131, 545-547.
- Peart, R. M., Hafs, H., Brunswick, N., Pessarakli, M., Nielsen, D.R., Elsas, J.D., Van, Miyazaki, T., 2000. Microbial pest control. Bacterial Insecticide: *Bacillus thuringiensis*. Basel, New York, pp 3-42.
- Peng, W., Pivato, A., 2019. Sustainable management of digestate from the organic fraction of municipal solid waste and food waste under the concepts of back to earth alternatives and circular economy. *Waste Biomass Valorization.* 10, 465–481.
- Pirota, R.D.P.B., Miotto, L.S., Delabona, P.S., Farinas, C.S., 2013. Improving the extraction conditions of endoglucanase produced by *Aspergillus niger* under solid-state fermentation. *Braz. J. Chem. Eng.* 30, 117–123.
- Pivato, A., Vanin, S., Raga, R., Lavagnolo, M.C., Barausse, A., Rieple, A., Laurent, A., Cossu, R., 2016. Use of digestate from a decentralized on-farm biogas plant as fertilizer in soils: an ecotoxicological study for future indicators in risk and life cycle assessment. *Waste Manage.* 49, 378–389.
- Plan Estatal Marco de gestión de residuos (PEMAR) 2016-2022. Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente. <https://www.miteco.gob.es/es/calidad-y-evaluacion-ambiental/planes-y-estrategias/Planes-y-Programas.aspx>
- Pognani, M., Barrena, R., Font, X., Sánchez, A., 2012. Effect of freezing on the conservation of the biological activity of organic solid wastes. *Bioresour. Technol.* 104, 832-836.
- Ponsá, S., Gea, T., Sánchez A., 2010a. Different indices to express biodegradability in organic solid wastes. *J. Environ. Qual.* 39, 706–712.
- Ponsá, S., Gea, T., Sánchez, A., 2010b. The effect of storage and mechanical pretreatment on the biological stability of municipal solid wastes. *Waste Manage.* 30, 441–445.
- Poopathi, S., Kumar, K. A., 2003. Publish Novel Fermentation Media for Production of *Bacillus thuringiensis* subsp . *israelensis*. *J. Econ. Entomol.* 96(4), 4–6.
- Prabakaran, G., Hoti, S. L., 2012. Immobilization in alginate as a new technique for the separation of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* spore crystal complex. *Biol. Control.* 61, 128–133.
- Puyuelo, B., Gea, T., Sánchez, A., 2010. A new control strategy for the composting process based on the oxygen uptake rate. *Chem. Eng. J.* 165(1), 161–169.

- Rabinovitch, L., Vivoni, A.M., Machado, V., Knaak, N., Berlit, D.L., Polanczyk, R.A., Fiuza, L.M., 2017. *Bacillus thuringiensis* Characterization: Morphology, Physiology, Biochemistry, Pathotype, Cellular, and Molecular Aspects, in: Fiuza L., Polanczyk R., Crickmore N. (Eds.) *Bacillus thuringiensis* and *Lysinibacillus sphaericus*. Springer International Publisher, Cham. pp. 1-18.
- Raghavarao, K.S.M.S., Ranganathan, T.V., Karanth, N.G., 2003. Some engineering aspect of solid-state fermentation. *Biochem. Eng. J.* 13, 127-135.
- Rahbani-Mounsef, J., Salameh, D., Awad, M. K., Chamy, L., Brandam, C., Lteif, R., 2014b. A simple method for the separation of *Bacillus thuringiensis* spores and crystals. *J. Microbiol. Methods.* 107, 147-149.
- Rahbani-Mounsef, J., Salameh, D., Kallassy-Awad, M., Brandam, C., Lteif, R., 2014a. Evaluation of a cereal milling by product for the low-cost production of *Bacillus thuringiensis kurstaki* in submerged fermentation. *Eur. J. Biotechnol. Biosci.* 1 (6), 10–16.
- Rahbani–Mounsef, J., Salamehc, D., Loukac, N., Brandama, C., Lteif, R., 2015. The effect of aeration conditions, characterized by the volumetric mass transfer coefficient KLa, on the fermentation kinetics of *Bacillus thuringiensis kurstaki*. *J. Biotechnol.* 210, 100–106.
- Realpe, M.E., Hernández, C.A., Agudelo, C.I., 2002. Especies del género *Bacillus*: morfología macroscópica y microscópica. *Rev. Biomed.* 22(2), 106-109.
- Reddy, Y.C., Venkateswerlu, G., 2002. Intracellular Proteases of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* and a Protease-Deficient Mutant *Btk-q*. *Curr. Microbiol.* 45, 405–409.
- Rejeb, S.B., Lereclus, D., Slamti, L., 2017. Analysis of *abrB* expression during the infectious cycle of *Bacillus thuringiensis* reveals population heterogeneity. *Front Microbiol.* 8, 2471.
- Rios, E.M., Lopes, C.E., de Franca, F.P., 1997. On the use of froth flotation in the recovery of *Bacillus sphaericus* spores. *Braz. J. Chem. Eng.* 14, 119–125.
- Rizvi, P.Q., Ahmad, S.K., Choudhury, R.A., Ali, A., 2012. Biopesticides in ecologically-based integrated pest management, in: Abrol, D.P., Umashankar, U. (Eds.) *Integrated Pest Management; Principles and Practices* CAB International UK. Chapter 7, pp.133-161.
- Ruan, L., Yu1, Z., Fang, B., He, W., Wang, Y., Shen, P., 2004. Melanin pigment formation and increased UV resistance in *Bacillus thuringiensis* following high temperature induction. *Syst. Appl. Microbiol.* 27, 286–289.
- Rubio-Infante, N., Moreno-Fierros, L., 2015. An overview of the safety and biological effects of *Bacillus thuringiensis* Cry toxins in mammals. *J. Appl. Toxicol.* 36(5), 630–648.
- Sanchis, V., 2011. From microbial sprays to insect-resistant transgenic plants: history of the biopesticide *Bacillus thuringiensis* . A review. *Agron. Sustain. Dev.* 31(1), 217–231.
- Sarrafzadeh, M.H., Belloy, L., Esteban, G., Navarro, J.M., Ghommidh, C., 2005. Dielectric monitoring of growth and sporulation of *Bacillus thuringiensis*. *Biotechnol. Lett.* 27, 511–517.

- Schnepf, E., Crickmore, N., Van Rie, J., Lereclus, D., Baum, J., Feitelson, J., Zaigler, D. R., Dean, D.H., 1998. *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62, 775-806.
- Sharma, B., Vaish, B., Srivastava, V., Singh, S., Singh, P., Singh, R.P., 2019. Recycling of organic wastes in agriculture: an environmental perspective. *Int. J. Environ. Res.* 13, 409-429.
- Shi, J., Xu, F., Wang, Z., Stiverson, J.A., Yu, Z., Li, Y., 2014. Effects of microbial and nonmicrobial factors of liquid anaerobic digestion effluent as inoculum on solid-state anaerobic digestion of corn stover. *Bioresour. Technol.* 157, 188–196.
- Simione, F.P., 2009. Thermo Scientific nalgene and nunc cryopreservation guide. Thermo Fisher Scientific Inc. Academic Press Limited, San Diego, USA.
- Singhania, R.R., Patel, A.K., Soccol, C.R., Pandey, A., 2009. Recent advances in solid-state fermentation. *Biochem. Eng. J.* 44, 13–18.
- Smirnova, T.A., Zubasheva, M.V., Shevlyagina, N.V. Nikolaenko, M.A., Azizbekyan, R.R., 2013. Electron Microscopy of the Surfaces of *Bacillus* Spores. *Microb.* 82(6), 713-720.
- 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.
- Soares, V.F., Castilho, L.R., Bon, E.P., Freire, D.M., 2005. High-yield *Bacillus subtilis* protease production by solid-state fermentation. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 121–124, 311–319.
- Soberón, M., Bravo, A., 2007. Las toxinas Cry de *Bacillus thuringiensis*: modo de acción y consecuencias de su aplicación. In López-Munguía A. Una ventana al quehacer científico. Instituto de Biotecnología, UNAM. 25, 303-313.
- Spier, M.R., Vandenberghe, L.P.S., Medeiros, A.B.P., Soccol, C.R., 2011. Application of different types of bioreactors in bioprocesses, in: Antolli, P.G., Liu, Z. (Eds.), *Bioreactors: Design, properties and applications*, Nova Science Publishers, New York. pp. 53-88.
- Stanbury, P.F., Whitaker, A., Hall, S.J., 1995. *Principles of fermentation technology*, Second ed. Elsevier Science Ltd., New York.
- Stemele, M.A., 2017. Comparative effects of a selective insecticide, *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* and the broad-spectrum insecticide cypermethrin on diamondback moth and its parasitoid *Cotesia vestalis* (Hymenoptera; Braconidae)". *Crop Protection.* 101, 35.
- Subramaniam, R., Vimala, R., 2012. Solid state and submerged fermentation for the production of bioactive substances: a comparative study. *Int J Sci Nat.* 3(3), 480-486.
- Swiecicka, I., Bideshi, D.K., Federici, B. A., 2007. Novel Isolate of *Bacillus thuringiensis* subsp. *thuringiensis* That Produces a Quasicuboidal Crystal of Cry1Ab21 Toxic to Larvae of *Trichoplusia ni*. *Appl. Environ. Microbiol.* 74(4), 923–930.
- Tambone, F., Scaglia, B., D'Imporzano, G., Schievano, A., Orzi, V., Salati, S., Adani, F., 2010. Assessing amendment and fertilizing properties of digestates from anaerobic digestion

- through a comparative study with digested sludge and compost. *Chemosphere*. 81(5), 577–583
- Tampio, E., Salo, T., Rintala, J., 2016. Agronomic characteristics of five different urban waste digestates. *J. Environ. Manage.* 169, 293–302.
- Tchobanoglous, G., Burton, F.L., Stensel, H.D., 2010. *Wastewater Engineering: Treatment, Disposal, Reuse*. Fourth Edition, Metcalf & Eddy, Inc., New York, 1-12.
- The US Department of Agriculture, The US Composting Council, 2001. *Test Methods for the Examination of Composting and Compost*, First edition. Ed. Edaphos international, Houston, Texas.
- Thomas, L., Larroche, C., Pandey, A., 2013. Current developments in solid-state fermentation. *Biochem. Eng. J.* 81, 146–161.
- Tian, H., Gao, J., Hao, J., Lu, L., Zhu, C., Qiu, P., 2013. Atmospheric pollution problems and control proposals associated with solid waste management in China: a review. *J Hazard Mater.* 252, 142–154.
- Tirado Montiel, M. L., Tyagi, R. D., Valero, J. R., 2001. Wastewater treatment sludge as a raw material for the production of *Bacillus thuringiensis* based biopesticides. *Water Res.* 35(16), 3807–3816.
- Tounsi, S., Jaoua, S., 2003. Characterization of a novel cry2Aa-type gene from *Bacillus thuringiensis* subsp. *Kurstaki*. *Biotechnol. Lett.* 25, 1219-1223.
- Trocza, B.J., Williamson, M.S., Field, L.M., Davies, T.G.E., 2017. Rapid selection for resistance to diamide insecticides in *Plutella xylostella* via specific amino acid polymorphisms in the ryanodine receptor. *NeuroToxicology.* 60, 224-233.
- Tyagi, R.D., Sikati Foko, V., Barnabé, S., Vidyarthi, A., Valéro, J.R., 2002. Simultaneous production of biopesticide and alkaline proteases by *Bacillus thuringiensis* using wastewater as a raw material. *Water Sci. Technol.* 46, 247-254.
- Unión Europea. Reglamento (UE) 1107/2009 del Consejo, de 21 de octubre de 2009, relativo a la comercialización de productos fitosanitarios y por el que se derogan las Directivas 79/117/CEE y 91/414/CEE del Consejo. *Diario Oficial de la Unión Europea* L 309, 24 de noviembre de 2009, pp. 1-50.
- Unión Europea. Reglamento (UE) 2019/1009 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 5 de junio de 2019 por el que se establecen disposiciones relativas a la puesta a disposición en el mercado de los productos fertilizantes UE y se modifican los Reglamentos (CE) n. o 1069/2009 y (CE) n. o 1107/2009 y se deroga el Reglamento (CE) n. o 2003/2003. *Diario Oficial de la Unión Europea* L170, 5 de junio de 2019, pp. 1-114.
- Unión Europea. Directiva (UE) 2009/128 del Consejo, de 21 de octubre de 2009 por la que se establece el marco de la actuación comunitaria para conseguir un uso sostenible de los plaguicidas. *Diario Oficial de la Unión Europea* L 309, 21 de octubre de 2009, pp. 71-86.

- Valicente, F.H., Mourao, A.H., 2008. Use of by-products rich in carbon and nitrogen as a nutrient source to produce *Bacillus thuringiensis* (Berliner)-based biopesticide. *Neotrop. Entomol.* 37(6), 702–708.
- Van Soest, P., Robertson, J., Lewis, B., 1991. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and non-starch polysaccharides in relation to animal nutrition. *J. Dairy Sci.* 74(10), 3583–3597.
- Vargas, M^aC., López, M^aJ., Suárez F., Jurado, M., López J., Moreno, J., 2014. El Género *penicillium* en el compostaje de residuos vegetales: diversidad y persistencia. En Bernal M^a, Pascual J.A., Ros, M., Clemente, R. (Eds.) Red Española de Compostaje. De Residuo a Recurso. Estrategias de Gestión, Tratamiento y Valorización. Ediciones Mundi-Prensa Madrid. pp.376.
- Velivelli S.L.S., De Vos, P., Kromann, P., Declerck, S., Prestwich, B.D., 2014. Biological control agents: From field to market, problems, and challenges. *Trends Biotechnol.* 32(10), 493–496.
- Vettori, C., Paffetti, D., Saxena, D., Stotzky, G., Giannini, R., 2003. Persistence of toxins and cells of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* introduced in sprays to Sardinia soils. *Soil Biol. Biochem.* 35(12), 1635–1642.
- Vidarthi, A.S., Tyagi, R.D., Valéro, J.R., Surampalli, R.Y., 2002. Studies on the production of *B. thuringiensis* based biopesticides using wastewater sludge as a raw material. *Water Res.* 36, 4850–4860.
- Vishal, J., Aniruddha, P., 2012. Solid state fermentation (SSF) for the production of sophorolipids from *Starmerella bombicola* NRRLY-17069 using glucose, wheat bran and oleic acid. *Curr. Trends Biotechnol. Pharm.* 6(4), 418–424.
- Vu, K.D., Tyagi, R.D., Brar, S.K., Valéro, J.R., Valéro JR, Surampalli, R.Y., 2009. Starch industry wastewater for production of biopesticides – ramifications of solids concentrations. *Environ. Sci. Technol.* 30(4), 393–405.
- Vu, K.D., Tyagi, R.D., Surampalli, R.Y., Valéro, J. R., 2012. Mathematical relationships between spore concentrations, delta-endotoxin levels, and entomotoxicity of *Bacillus thuringiensis* preparations produced in different fermentation media *Bioresour. Technol.* 123, 303–311.
- Vu, K.D., Tyagi, R.D., Valéro, J.R., Surampalli, R.Y., 2010. Batch and fed-batch fermentation of *Bacillus thuringiensis* using starch industry wastewater as fermentation substrate. *Bioprocess Biosyst. Eng.* 33, 691–700.
- Walker, L., Charles, W., Cord-ruwisch, R., 2009. Comparison of static, in-vessel composting of MSW with thermophilic anaerobic digestion and combinations of the two processes. *Bioresour. Technol.* 100, 3799–3807.
- Wang, X., Xue, Y., Han, M., Bu, Y., Liu, C., 2014. The ecological roles of *Bacillus thuringiensis* within phyllosphere environments. *Chemosphere.* 108, 258–264.
- Wilson, D. C., Rodic, L., Scheinberg, A., Velis, C. A., Alabaster, G., 2012. Comparative analysis of solid waste management in 20 cities. *Waste Manage. Res.* 30(3), 237–254.

- Wood, J.P., Meyer, K.M., Kelly, T.J., Choi, Y.W., Rogers, J.V., Riggs, K.B., Willenberg, Z.J., 2015. Environmental Persistence of *Bacillus anthracis* and *Bacillus subtilis* Spores. *Plos One*. 15, 1-17.
- Wu, S., Lan, Y., Huang, D., Peng, Y., Huang, Z., Xu, L., Zou, S., 2014. Use of Spent Mushroom Substrate for Production of *Bacillus thuringiensis* by Solid-State Fermentation. *J. Econ. Entomol.* 107(1), 137–143.
- Yadav, A., Garg, V.K., 2011. Recycling of organic wastes by employing *Eisenia fetida*. *Bioresour. Technol.* 102(3), 2874–2880.
- Yao, J., Liu, Y., Tuo, Y., Liu, J., Chen, X., Zhou, Q., Dong, J., Qu, S., Yu, Z., 2003. Action of Cu_2^+ on *Bacillus thuringiensis* growth investigated by microcalorimetry. *Appl. Biochem. Microbiol.* 39, 576–580.
- Yazid, N.A., Barrena, R., Komilis, D., Sánchez, A., 2017. Solid-state fermentation as a novel paradigm for organic waste valorization: A review. *Sustainability*. 9, 1–28.
- Yeza, A., Tyagi, R.D., Valéro, J.R., Surampalli, R.Y., 2005. Production of *Bacillus thuringiensis*-based biopesticides in batch and fed batch cultures using wastewater sludge as a raw material. *J Chem Technol Biotechnol.* 80, 502–510.
- Yeza, A., Tyagi, R.D., Valéro, J.R., Surampalli, R.Y., 2006a. Bioconversion of industrial wastewater and wastewater sludge into *Bacillus thuringiensis* based biopesticides in pilot fermentor. *Bioresour. Technol.* 97, 1850–1857.
- Yeza, A., Tyagi, R.D., Valero, J.R., Surampalli, R.Y., 2006b. Correlation between entomotoxicity potency and protease activity produced by *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* grown in wastewater sludge. *Process Biochem.* 41(4), 794–800.
- 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., Xu, R., 2011. Cost-effective production of *Bacillus thuringiensis* biopesticides by solid-state fermentation using wastewater sludge: effects of heavy metals. *Bioresour. Technol.* 102(7), 4820–4826.
- Zou, H., Ding, S., Zhang, W., Yao, J., Jang, L., Liang, J., 2016. Study on influence factors in *Bacillus thuringiensis* production by semi-solid-state fermentation using food waste. *Procedia Environ. Sci.* 31, 127–135.
- Zouari, N., Jaoua, S., 1999. Production and characterization of metalloproteases synthesized concomitantly with d-endotoxin by *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* strain grown on gruel-based media. *Enzyme Microb. Technol.* 25, 364–71.

Anexos

I. Análisis microbiológico

Este informe de análisis microbiológico detalla las muestras analizadas, determinando por una parte los parámetros de *enterobacteriaceae* totales, coliformes totales, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* spp., *Clostridium perfringens*, *Listeria* spp., bacterias lácticas, bacterias anaerobias totales, bacterias aerobias totales, hongos miceliares y levaduras expresando los resultados Unidades Formadoras de Colonias por gramos de materia seca (UFC g⁻¹ MS). Y, por otro lado, los principales géneros de bacterias como de hongos que puedan encontrarse en las muestras analizadas.



Universitat Autònoma de Barcelona

ANÁLISIS SOLICITADOS: ESTUDIO DE PARÁMETROS MICROBIOLÓGICOS DE SEIS MUESTRAS

INFORME: Recibidas en el laboratorio seis muestras de referencias:

- Muestra 1: RESIDUO INICIAL
- Muestra 2: RESIDUO HIGIENIZADO (70°C, 1 hora)
- Muestra 3: TRAS 48h FERMENTACION
- Muestra 4: MUESTRA INOCULADA
- Muestra 5: MUESTRA TRAS 24h INOCULADA
- Muestra 6: MUESTRA TRAS 6 DIAS INOCULADA

Se procedió a la preparación de las mismas con el fin de llevar a cabo el análisis microbiológico de los parámetros siguientes

- a.- *Enterobacteriaceae* totales b.- Coliformes totales c.- *Escherichia coli*
- d.- *Staphylococcus aureus* e.- *Salmonella* spp. f.- *Clostridium perfringens*
- g.- *Listeria* spp. h.- Bacterias lácticas i.- Bacterias anaerobias totales
- j.- Bacterias aerobias totales k.- Recuento hongos miceliares l.- Recuento levaduras

Las metodologías utilizadas son las utilizadas tradicionalmente en Microbiología.

Los resultados obtenidos se resumen en las Tabla núm. 1

Tabla núm. 1.- Resultados obtenidos. Los recuentos se expresan en Unidades Formadoras de Colonia (UFC/g). A: Ausencia * en 10g ** en 25 g

Muestra	<i>Enterob.</i> totales	Coliform.	<i>E. coli</i> *	<i>S. aureus</i>	<i>Salmonella</i> ** sp.	<i>Listeria</i> sp.	Bacterias lácticas	Bacterias anaeróbicas
Muestra 1	3x10 ⁵	7x10 ⁷	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia	2x10 ⁶	6x10 ⁶
Muestra 2	4x10 ³	2x10 ³	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia	2x10 ³	2x10 ³
Muestra 3	3x10 ²	2x10 ²	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia	2x10 ²	7x10 ²
Muestra 4	5x10 ²	4x10 ²	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia	7x10 ²	3x10 ³
Muestra 5	6x10 ³	3x10 ³	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia	3x10 ³	8x10 ⁴
Muestra 6	3x10 ⁶	4x10 ⁵	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia	6x10 ⁵	5x10 ⁶

Muestra	Bacterias aeróbicas	<i>C.</i> <i>perfringens</i>	Hongos filamentos.	Levaduras	<i>Bacillus</i> <i>thurimgensis</i>
Muestra 1	5x10 ⁹	Ausencia	2x10 ⁹	7x10 ⁵	ND
Muestra 2	2x10 ⁴	Ausencia	3x10 ²	2x10 ²	NC
Muestra 3	3x10 ⁵	Ausencia	2x10 ²	2x10 ²	NC
Muestra 4	4x10 ⁹	Ausencia	3x10 ²	4x10 ²	2x10 ⁴
Muestra 5	7x10 ⁹	Ausencia	4x10 ²	5x10 ³	5x10 ⁴
Muestra 6	9x10 ⁹	Ausencia	5x10 ²	6x10 ³	6x10 ⁴
Muestra 6	9x10 ⁹	Ausencia	6x10 ²	6x10 ³	7x10 ⁴



Universitat Autònoma de Barcelona

Los principales géneros tanto de bacterias como de hongos aislados han sido:

Muestra 1: RESIDUO INICIAL

Hongos: *Aspergillus* spp., *Rhizopus* sp., *Penicillium* spp., *Saccharomyces* sp.
Bacterias: *Bacillus* spp., *Kocuria* spp., *Pseudomonas* spp., *Streptomyces* sp.,
Thermus sp., *Staphylococcus* spp., *Lactobacillus* spp., *Lactococcus* spp.,
Clostridium spp., *Serratia* sp.

Entre las cepas del género *Bacillus* se detectan *Bacillus subtilis* y *Bacillus stearothermophilus* fundamentalmente

Muestra 2: RESIDUO HIGIENIZADO (70°C, 1 hora)

Hongos: *Aspergillus* spp., *Rhizopus* sp., *Penicillium* spp., *Saccharomyces* sp.
Bacterias: *Bacillus* spp., *Kocuria* spp., *Streptomyces* sp., *Thermus* sp., *Lactobacillus* spp.,
Lactococcus spp., *Clostridium* spp.

Entre las cepas del género *Bacillus* se detectan *Bacillus stearothermophilus*

Muestra 3: TRAS 48h FERMENTACION

Hongos: *Rhizopus* sp., *Aspergillus* spp., *Fusarium* sp., *Saccharomyces* sp.
Bacterias: *Bacillus* spp., *Thermus* sp., *Lactobacillus* spp., *Lactococcus* spp.,
Clostridium spp.

Entre las cepas del género *Bacillus* se detectan *Bacillus stearothermophilus* fundamentalmente.

Muestra 4: MUESTRA INOCULADA

Hongos: *Aspergillus* spp., *Rhizopus* sp., *Fusarium* spp., *Saccharomyces* sp.
Bacterias: *Bacillus* spp., *Kocuria* spp., *Streptomyces* sp., *Thermus* sp., *Lactobacillus* spp.,
Lactococcus spp., *Clostridium* spp.

Entre las cepas del género *Bacillus* se detectan *Bacillus subtilis*, *Bacillus stearothermophilus* y *Bacillus thuringensis*

Muestra 5: MUESTRA TRAS 24h INOCULADA

Hongos: *Aspergillus* spp., *Rhizopus* sp., *Penicillium* sp., *Fusarium* spp., *Saccharomyces* sp.

Bacterias: *Bacillus* spp., *Kocuria* spp., *Streptomyces* sp., *Thermus* sp., *Lactobacillus* spp.,
Lactococcus spp., *Clostridium* spp.



Universitat Autònoma de Barcelona

Entre las cepas del género *Bacillus* se detectan *Bacillus subtilis*, *Bacillus stearothermophilus* y *Bacillus thuringensis*.

Muestra 6: MUESTRA TRAS 6 DIAS INOCULADA

Hongos: *Aspergillus* spp., *Rhizopus* sp., *Penicillium* sp., *Fusarium* spp., *Saccharomyces* sp.

Bacterias: *Bacillus* spp., *Kocuria* spp., *Streptomyces* sp., *Thermus* sp., *Lactobacillus* spp., *Lactococcus* spp., *Clostridium* spp.

Entre las cepas del género *Bacillus* se detectan *Bacillus subtilis*, *Bacillus stearothermophilus* y *Bacillus thuringensis*

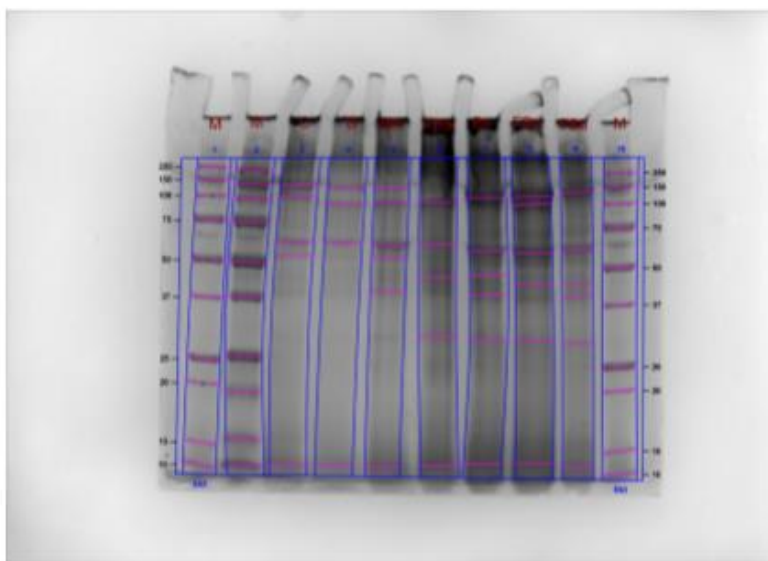
Bellaterra, ocho de Julio de dos mil diecisiete

Fdo.: Dra. M. ANGELS CALVO

II. Análisis electroforesis

Este informe se ha realizado con el programa Image Lab de BioRad ® y detalla las proteínas y pesos moleculares de cada una de las muestras de los carriles. El valor se determina a partir del volumen y la intensidad de la banda, teniendo una descripción completa para cada carril. El peso molecular de la proteína y la concentración de ésta en las mismas unidades que el marcador, en este caso nanogramos para cada uno de los carriles.

Image Report: laborator1 2019-06-18 14hr 45min



C:\Users\Pequeña\Downloads\laborator1 2019-06-18 14hr 45min.scn

Acquisition Information

Imager	Gel Doc™ EZ
Exposure Time (sec)	0.642 (Auto - Intense Bands)
Application	Coomassie Blue
Dark Type	Referenced
Ref. Bkgd. Time (sec)	10
Flat Field	Applied
Serial Number	735BR01196
Software Version	4.0
Illumination Mode	White Transillumination

Image Information

Acquisition Date	18/06/2019 2:45:59
User Name	laborator1
Image Area (mm)	X: 150.0 Y: 107.8
Pixel Size (µm)	X: 107.8 Y: 107.8
Data Range (Int)	670 - 3951

Analysis Settings

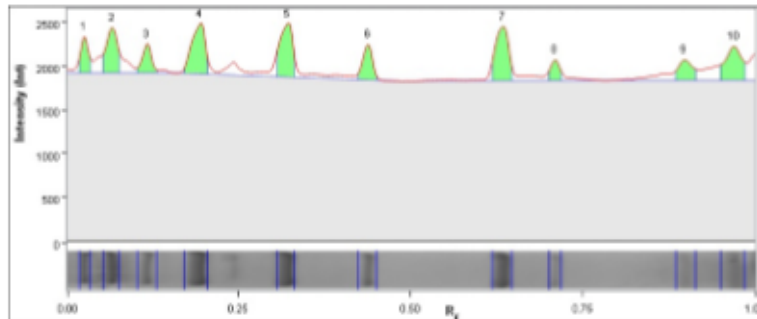
Detection	Lane detection: Manually created lanes Band detection: Automatically detected bands with sensitivity: Low Manually adjusted bands Lane Background Subtraction: Background subtracted with different disk sizes Lane width: Variable
Mol. Weight Analysis	Standard: Bio-Rad Precision Plus Standard lanes: first last Regression method: Point to Point (semi-log)
Quantity Analysis	Quantity Standard Bands: Lane 1 Band 3 Quantity 150.0 Lane 1 Band 5 Quantity 750.0 Lane 1 Band 8 Quantity 150.0 Quantity regression method: Linear Regression equation: $y = 0.00185 * x - 141$ R-squared value: $R^2 = 0.972433$

Lane Statistics

Lane No.	Adj. Total Band Vol. (Int)	Total Band Vol. (Int)	Adj. Total Lane Vol. (Int)	Total Lane Vol. (Int)	Bkgd. Vol. (Int)	Norm. Factor
1	3,208,260	22,757,160	4,633,260	75,666,120	71,032,860	N/A
2	7,583,972	39,064,028	11,150,164	96,350,832	85,200,668	N/A
3	2,541,432	16,738,132	7,126,128	92,860,868	85,734,740	N/A
4	1,876,732	12,143,644	6,832,776	90,007,928	83,175,152	N/A
5	2,614,311	21,797,307	8,227,044	89,064,486	80,837,442	N/A
6	3,770,464	27,642,272	13,228,312	106,296,104	93,067,792	N/A
7	3,434,068	24,055,476	11,307,992	108,852,428	97,544,436	N/A
8	5,297,472	34,520,880	11,605,220	110,455,188	98,849,968	N/A
9	2,411,248	17,996,944	8,019,536	83,608,336	75,588,800	N/A
10	3,813,062	23,429,118	6,545,340	80,806,522	74,261,182	N/A

Lane And Band Analysis

Lane 1 - Bio-Rad Precision Plus



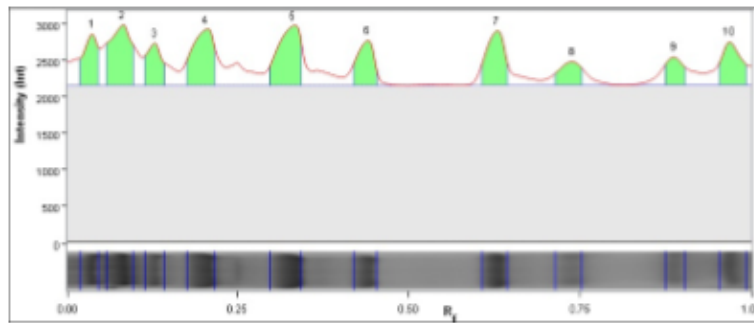
Band No.	Band Label	Mol. Wt. (KDa)	Relative Front	Adj. Volume (Int)	Volume (Int)	Abs. Quant.	Rel. Quant.	Band %	Lane %
1		250.0	0.026	194,160	1,480,560	217.4	N/A	6.1	4.2
2		150.0	0.067	359,520	2,160,480	522.7	N/A	11.2	7.8

Referencias

3	100.0	0.118	191.340	2.249.580	150.0	N/A	6.0	4.1
4	75.0	0.195	498.420	3.060.000	779.2	N/A	15.5	10.8
5	50.0	0.321	476.640	2.360.100	750.0	N/A	14.9	10.3
6	37.0	0.439	249.000	2.221.560	318.7	N/A	7.8	5.4
7	25.0	0.635	509.220	2.595.120	799.1	N/A	15.9	11.0
8	20.0	0.711	129.900	1.480.920	150.0	N/A	4.0	2.8
9	15.0	0.898	199.260	2.166.300	226.9	N/A	6.2	4.3
10	10.0	0.970	400.800	2.982.540	599.0	N/A	12.5	8.7

Band Detection	Automatically detected bands with sensitivity: Low
Lane Background	Lane background subtracted with disk size: 70.7
Lane Width	6.47 mm
Regression Equation	A single equation is not available for this method

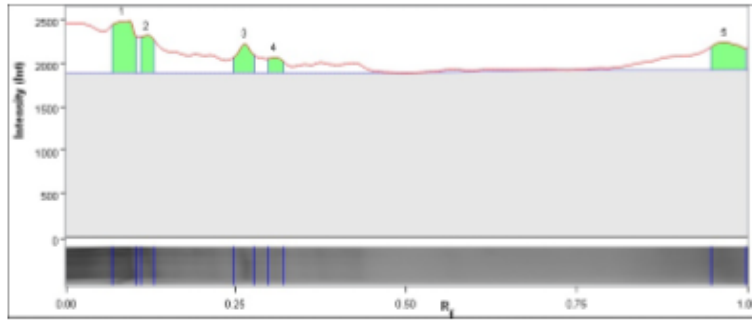
Lane 2



Band No.	Band Label	Mol. Wt. (KDa)	Relative Front	Adj. Volume (Int)	Volume (Int)	Abs. Quant.	Rel. Quant.	Band %	Lane %
1		220.6	0.039	626.416	3.011.312	1.015.5	N/A	8.3	5.6
2		135.3	0.082	1.109.760	4.538.048	1.907.9	N/A	14.6	10.0
3		96.6	0.130	551.820	3.085.772	877.8	N/A	7.3	4.9
4		73.6	0.203	1.059.304	4.636.648	1.814.7	N/A	14.0	9.5
5		49.0	0.331	1.211.352	5.235.864	2.095.5	N/A	16.0	10.9
6		37.1	0.440	652.868	3.633.988	1.064.3	N/A	8.6	5.9
7		25.4	0.629	866.592	4.151.400	1.458.9	N/A	11.4	7.8
8		19.2	0.739	441.048	4.026.552	673.3	N/A	5.8	4.0
9		15.3	0.888	371.348	2.762.772	544.6	N/A	4.9	3.3
10		10.2	0.968	693.464	3.981.672	1.139.3	N/A	9.1	6.2

Band Detection	Automatically detected bands with sensitivity: Low
Lane Background	Lane background subtracted with disk size: 70.7
Lane Width	7.33 mm
Regression Equation	A single equation is not available for this method

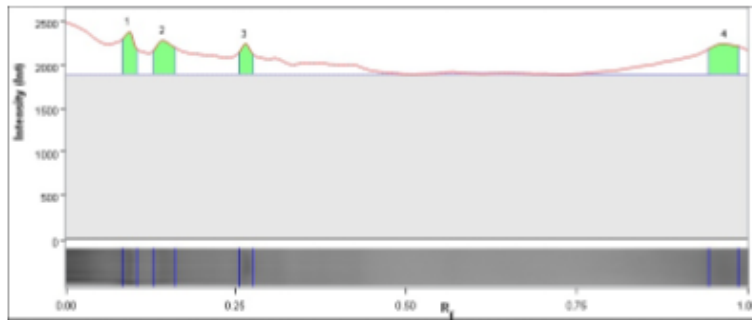
Lane 3



Band No.	Band Label	Mol. Wt. (KDa)	Relative Front	Adj. Volume (Int)	Volume (Int)	Abs. Quant.	Rel. Quant.	Band %	Lane %
1		135.0	0.068	881.824	3.853.424	1.487.1	N/A	34.7	12.4
2		102.3	0.120	422.212	2.353.752	638.5	N/A	16.6	5.9
3		61.1	0.264	356.592	2.882.452	517.3	N/A	14.0	5.0
4		53.1	0.307	190.740	2.419.440	211.1	N/A	7.5	2.7
5		10.3	0.967	690.064	5.229.064	1.133.0	N/A	27.2	9.7

Band Detection	Automatically detected bands with sensitivity: Low
Lane Background	Lane background subtracted with disk size: 70.7
Lane Width	7.33 mm
Regression Equation	A single equation is not available for this method

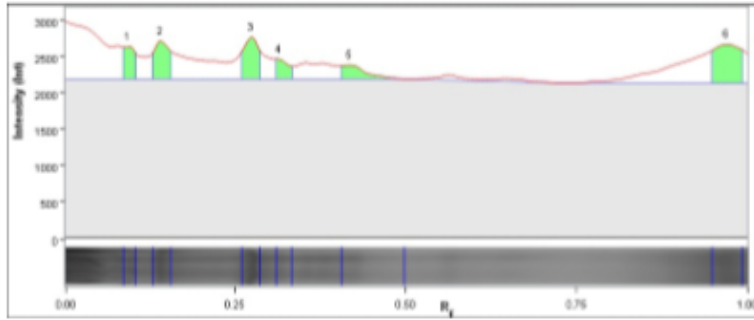
Lane 4



Band No.	Band Label	Mol. Wt. (KDa)	Relative Front	Adj. Volume (Int)	Volume (Int)	Abs. Quant.	Rel. Quant.	Band %	Lane %
1		129.3	0.094	410.176	2.291.328	616.3	N/A	21.9	6.0
2		93.4	0.144	522.444	3.416.524	823.5	N/A	27.8	7.6
3		61.5	0.264	274.448	2.010.896	365.7	N/A	14.6	4.0
4		10.4	0.967	669.664	4.424.896	1.095.3	N/A	35.7	9.8

Band Detection	Automatically detected bands with sensitivity: Low
Lane Background	Lane background subtracted with disk size: 70.7
Lane Width	7.33 mm
Regression Equation	A single equation is not available for this method

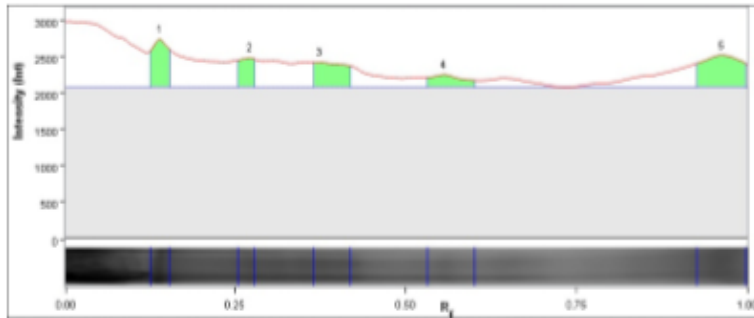
Lane 5



Band No.	Band Label	Mol. Wt. (KDa)	Relative Front	Adj. Volume (Int)	Volume (Int)	Abs. Quant.	Rel. Quant.	Band %	Lane %
1		132.4	0.094	297.612	1.856.862	408.4	N/A	11.4	3.6
2		95.8	0.141	450.072	2.576.322	689.9	N/A	17.2	5.5
3		60.0	0.274	509.670	2.777.670	800.0	N/A	19.5	6.2
4		52.7	0.314	210.861	2.195.361	248.3	N/A	8.1	2.6
5		39.9	0.418	297.297	7.951.797	407.9	N/A	11.4	3.6
6		10.3	0.970	848.799	4.439.295	1.426.1	N/A	32.5	10.3

Band Detection	Automatically detected bands with sensitivity: Low
Lane Background	Lane background subtracted with disk size: 70.7
Lane Width	6.79 mm
Regression Equation	A single equation is not available for this method

Lane 6

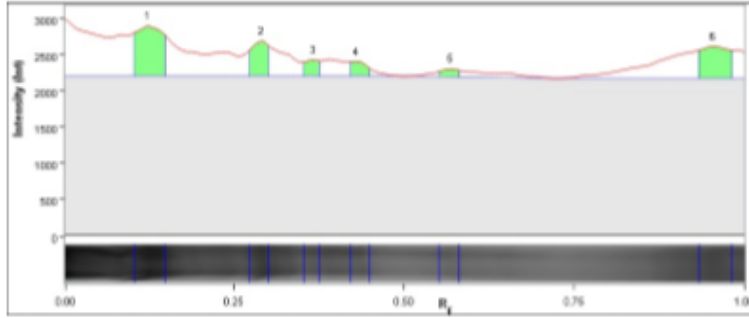


Band No.	Band Label	Mol. Wt. (KDa)	Relative Front	Adj. Volume (Int)	Volume (Int)	Abs. Quant.	Rel. Quant.	Band %	Lane %
1		97.0	0.140	816.340	3.719.688	1.366.2	N/A	21.7	6.2
2		61.0	0.272	454.648	2.874.088	698.4	N/A	12.1	3.4
3		44.9	0.374	821.984	6.144.752	1.376.6	N/A	21.8	6.2
4		29.8	0.556	424.388	7.037.524	642.5	N/A	11.3	3.2

5	10.8	0.864	1.253.104	7.866.240	2.172.5	N/A	33.2	9.5
---	------	-------	-----------	-----------	---------	-----	------	-----

Band Detection	Automatically detected bands with sensitivity: Low
Lane Background	Lane background subtracted with disk size: 70.7
Lane Width	7.33 mm
Regression Equation	A single equation is not available for this method

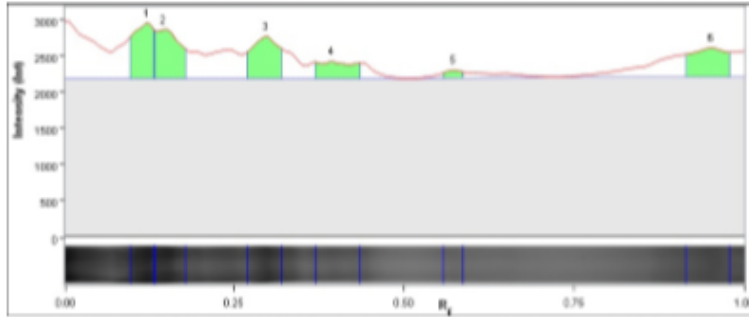
Lane 7



Band No.	Band Label	Mol. Wt. (KDa)	Relative Front	Adj. Volume (Int)	Volume (Int)	Abs. Quant.	Rel. Quant.	Band %	Lane %
1		108.8	0.125	1.340.484	5.921.304	2.333.9	N/A	39.0	11.9
2		57.9	0.291	584.324	3.468.544	937.8	N/A	17.0	5.2
3		46.1	0.367	229.908	2.605.148	283.4	N/A	6.7	2.0
4		39.0	0.431	241.264	3.295.144	304.4	N/A	7.0	2.1
5		29.2	0.569	135.048	3.176.552	108.3	N/A	3.9	1.2
6		11.4	0.955	903.040	5.588.784	1.526.2	N/A	26.3	8.0

Band Detection	Automatically detected bands with sensitivity: Low
Lane Background	Lane background subtracted with disk size: 75.7
Lane Width	7.33 mm
Regression Equation	A single equation is not available for this method

Lane 8

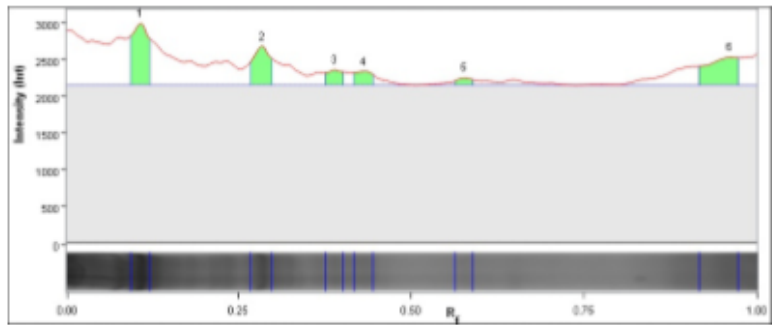


Referencias

Band No.	Band Label	Mol. Wt. (KDa)	Relative Front	Adj. Volume (Int)	Volume (Int)	Abs. Quant.	Rel. Quant.	Band %	Lane %
1		113.4	0.122	1.090.390	4.479.500	1.872.1	N/A	20.6	9.4
2		97.0	0.146	1.185.580	5.591.436	2.047.9	N/A	22.4	10.2
3		57.0	0.298	1.177.896	6.431.032	2.033.7	N/A	22.2	10.1
4		43.2	0.394	639.200	7.247.984	1.039.1	N/A	12.1	5.5
5		29.0	0.573	133.756	3.193.756	105.9	N/A	2.5	1.2
6		11.7	0.952	1.070.660	7.577.172	1.835.7	N/A	20.2	9.2

Band Detection	Automatically detected bands with sensitivity: Low
Lane Background	Lane background subtracted with disk size: 70.7
Lane Width	7.33 mm
Regression Equation	A single equation is not available for this method

Lane 9

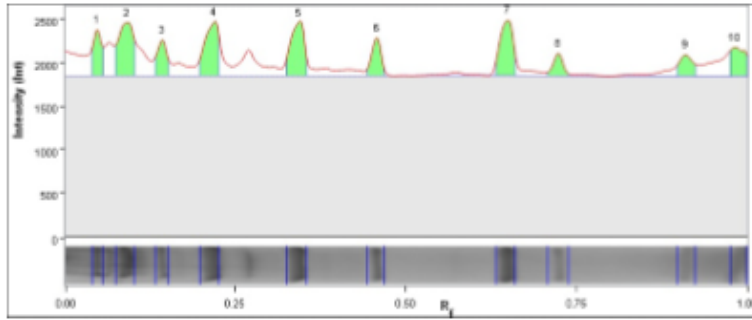


Band No.	Band Label	Mol. Wt. (KDa)	Relative Front	Adj. Volume (Int)	Volume (Int)	Abs. Quant.	Rel. Quant.	Band %	Lane %
1		129.6	0.108	804.216	3.142.776	1.343.6	N/A	33.4	10.0
2		59.9	0.285	481.040	2.819.600	747.1	N/A	19.9	6.0
3		43.9	0.390	180.768	2.259.488	192.7	N/A	7.5	2.3
4		39.5	0.431	187.824	2.526.384	205.7	N/A	7.8	2.3
5		28.9	0.577	82.040	2.159.864	10.4	N/A	3.4	1.0
6		11.1	0.962	675.360	5.088.832	1.105.9	N/A	28.0	8.4

Band Detection	Automatically detected bands with sensitivity: Low
Lane Background	Lane background subtracted with disk size: 70.7
Lane Width	6.03 mm
Regression Equation	A single equation is not available for this method

Lane 10 - Bio-Rad Precision Plus

Referencias



Band No.	Band Label	Mol. Wt. (KDa)	Relative Front	Adj. Volume (Int)	Volume (Int)	Abs. Quant.	Rel. Quant.	Band %	Lane %
1		250.0	0.048	273.358	1.420.048	363.7	N/A	7.2	4.2
2		150.0	0.093	635.748	2.929.128	1.032.7	N/A	16.7	9.7
3		100.0	0.144	256.184	1.785.104	332.0	N/A	6.7	3.9
4		75.0	0.220	570.524	2.736.494	912.3	N/A	15.0	8.7
5		50.0	0.343	568.230	2.861.610	908.1	N/A	14.9	8.7
6		37.0	0.458	277.760	2.188.910	371.8	N/A	7.3	4.2
7		25.0	0.650	556.016	2.724.838	885.5	N/A	14.6	8.5
8		20.0	0.724	175.460	2.595.506	182.9	N/A	4.6	2.7
9		15.0	0.911	205.716	2.113.146	238.8	N/A	5.4	3.1
10		10.0	0.983	294.066	2.074.334	401.9	N/A	7.7	4.5

Band Detection	Automatically detected bands with sensitivity: Low
Lane Background	Lane background subtracted with disk size: 70.7
Lane Width	6.68 mm
Regression Equation	A single equation is not available for this method

III. Artículos científicos

Este anexo incluye los siguientes artículos científicos:

- Cerda, A., Mejias, L., Rodríguez, P., Rodríguez, A., Artola, A., Font, X., Gea, T., Sánchez, A., 2019. Valorisation of digestate from biowaste through solid-state fermentation to obtain value added bioproducts: A first approach. *Bioresource Technology*. 271, 409–416.
- Rodríguez, P., Cerda, A., Font, X., Sánchez, A., Artola, A., 2019. Valorisation of biowaste digestate through solid state fermentation to produce biopesticides from *Bacillus thuringiensis* *Waste Management*. 93, 63-71.



Valorisation of digestate from biowaste through solid-state fermentation to obtain value added bioproducts: A first approach

Alejandra Cerda^a, Laura Mejias^{a,b}, Paula Rodríguez^a, Alejandra Rodríguez^a, Adriana Artola^a, Xavier Font^a, Teresa Gea^a, Antoni Sánchez^{a,*}

^a GICOM Research Group, Department of Chemical, Biological and Environmental Engineering, School of Engineering, Edifici Q, Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Bellaterra, Barcelona, Spain

^b Aeris Tecnologías Ambientales S.L., Carrer Santa Rosa, 38, local, 08290 Cerdanyola del Vallès, Barcelona, Spain

ARTICLE INFO

Keywords:

Solid state fermentation
Digestate
Valorisation
Bioproducts
Biopesticide

ABSTRACT

Digestate from biowaste was assessed as a potential source of bioproducts of commercial and industrial interest through solid-state fermentation. The targeted bioproducts were hydrolytic enzymes (cellulases and proteases from autochthonous microbiome), biosurfactants (sophorolipids produced from *Starmella bombicola*) and biopesticides (produced from *Bacillus thuringiensis*). Low cellulase production was observed within the range of 0.5–1.5 FPU g⁻¹ DM while protease production showed two discrete peaks of 66 ± 8 and 65 ± 3 U g⁻¹ DM at 3.5 and 48 h, respectively. Low sophorolipids production was also obtained, with a maximum yield of 0.02 g g⁻¹ DM using hygienised digestate supplemented with external sugar and fat sources. Biopesticides produced by *B. thuringiensis* were successfully at 72 h of operation, reaching a maximum spore production of 8.15 ± 0.04 (10⁷) CFU g⁻¹ DM and 2.85 ± 0.22 (10⁷) CFU g⁻¹ DM using sterile and hygienised digestate, respectively. These biopesticides could contribute to the substitution of chemically produced pesticides, moving towards a sustainable digestate management in a circular economy scheme.

1. Introduction

In the last years, the EU has developed legislation that affected the waste management of organic materials. The Landfill Directive 199/31/EC aims to divert waste disposal from landfills and the Waste Directive 2008/98/EC aims to develop a new waste management hierarchy that promotes the use of wastes as secondary raw materials. In this context, anaerobic digestion (AD) is a widely used technology that can produce biogas, which contributes to the substitution of fossil fuels, providing a highly efficient method for resource recycling that allows to close the production cycle. However, the sustainability of AD processes will depend on the ability of the plant operator to properly manage the digestate remaining after the AD process (Dahlin et al., 2015).

Digestate is a heterogeneous material produced in large amounts during the anaerobic digestion process (Dahlin et al., 2017; Monlau et al., 2015). Nearly 95% of the digestate produced in Europe can be used as organic fertiliser reducing the needs of for chemically produced fertilizers (Fuldauer et al., 2018; Saveyn & Eder, 2013). Digestate obtained from source selected biowaste is conventionally sent to composting or to direct soil application, however its use is currently limited due to nutrient content, quality of the digestate (Paavola & Rintala,

2008), possible land contamination and, in some countries, the lack of fertile land (Fuldauer et al., 2018). In this sense, a more sustainable approach is proposed by the DECISIVE project (www.decisive2020.eu) in terms of digestate management, considering this waste as a feedstock for further biotransformation through solid-state fermentation in a circular economy context.

Solid-state fermentation (SSF) is defined as a process that takes place in a solid matrix in absence or near absence of free water (Thomas et al., 2013). SSF is an attractive technology that allows the use of solid substrates for biotransformation into value-added bioproducts (El-Bakry et al., 2015). Hydrolytic enzymes (El-Bakry et al., 2015), biosurfactants (Jiménez-Peñalver et al., 2016; Vishal and Aniruddha, 2012), aromas (Martínez et al., 2017), biopesticides (Ballardo et al., 2017; Monlau et al., 2015) or bioplastics (Castilho et al., 2009) have been successfully produced by SSF using different organic wastes. Conventionally, these bioproducts are produced in established and highly controlled conditions using specific microorganisms, defined substrates and carried out under sterile conditions which imply high operational costs. In order to reduce these costs, authors have developed a SSF process carried out using non sterile and heterogeneous solid substrates for the production of hydrolytic enzymes (Abraham

* Corresponding author.

E-mail address: antoni.sanchez@uab.cat (A. Sánchez).

<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.09.131>

Received 19 July 2018; Received in revised form 25 September 2018; Accepted 26 September 2018

Available online 27 September 2018

0960-8524/ © 2018 Elsevier Ltd. All rights reserved.

et al., 2013; Cerda et al., 2017a), biopesticides (Ballardo et al., 2017) and biosurfactants (Jiménez-Peñalver et al., 2016). These authors reported robust and reproducible processes working at laboratory, bench and pilot scale (Abraham et al., 2017; Ballardo et al., 2017; Cerda et al., 2017b; Martínez et al., 2018). A first approach to biowaste digestate valorisation via SSF has been recently proposed by Mejias et al. (2018) for cellulase and xylanase production using *Trichoderma reesei*, which is a well-known cellulase producer. However, these authors found low productivities mainly due to the poor nutritional quality of digestate. Thus, it seems interesting to further assess the potential of digestate as a source for the production of different specific bioproducts. Developing bio-based products represents economic and environmental benefits such as the replacement of chemically produced or fossil fuels derived materials, which is of great relevance in the circular economy concept.

In this context, the main goal of this work is to assess the potential of digestate without any pretreatment as a source of value added bioproducts by means of solid-state fermentation. A screening of bioproducts with industrial interest was carried out to achieve this goal. This first screening will provide information for the potential selection of the most suitable bioproduct to be obtained from digestate and to be further optimised. The selected targeted bioproducts were hydrolytic enzymes (cellulases and proteases), biosurfactants (sophorolipids) and biopesticides (derived from *Bacillus thuringiensis*). To the best of our knowledge, this is the first work targeting biowaste digestate as a source of value added bioproducts within a biorefinery concept.

2. Materials and methods

2.1. Raw material

Digestate was kindly provided by a biowaste treatment plant (Granollers, Spain). This material was obtained from the anaerobic digestion of source selected biowaste. The process consisted in a mechanical pretreatment to reduce impurities followed by a mesophilic wet anaerobic digestion followed by a solid/liquid separation stage carried out using a screw press. Initial characterization of the digestate is presented in Table 1. Given the variability of biowaste digestate, standard deviation in this table corresponds to the average of more than 10 samples analysed during a year and collected from the municipal waste treatment plant. In this plant, digestate is further composted.

Once digestate was received in the facilities, the material was subjected to an hygienisation process as required by the European Regulation 142/2011. This process consisted in maintaining the residue for 1 h into a previously heated oven at 70 °C. In order to avoid moisture losses, digestate was covered during the hygienisation process. After this process, the material remained stored in a cold room at 4 °C for a

Table 1

Average digestate characterisation. Standard deviation corresponds to the average of more than 10 samples analysed during one year.

Parameter	Units	Digestate (n = 10)
Moisture	% (wb)	75.60 ± 5.11
Dry Matter	% (wb)	24.40 ± 5.11
Organic Matter	% (db)	63.00 ± 1.62
pH (1:5)	–	8.31 ± 0.07
Carbon	% (db)	34.14 ± 2.38
Nitrogen	% (db)	4.32 ± 0.33
Hydrogen	% (db)	2.89 ± 0.25
Sulphur	% (db)	0.33 ± 0.14
C/N ratio	–	11.85 ± 0.70
Dynamic respiration index	mgO ₂ g ⁻¹ DM h ⁻¹	1.38 ± 0.38
Protein	% (db)	16.95 ± 0.50
Hemicellulose	% (db)	10.06 ± 0.90
Cellulose	% (db)	10.42 ± 1.25
Lignin	% (db)	17.54 ± 1.96
Soluble sugars	% (db)	0.18 ± 0.16
Fats	% (db)	5.05 ± 0.04

maximum of 15 days.

2.2. Experimental set-up

This setup consisted of 12 lines, each one able to carry out 3 independent fermentations using specific reactors (0.45 L). These reactors were cylindrical polyvinylchloride packed-bed reactors (13 × 7 cm) each one provided with one mass airflow-meter with the exhaust gases outlet connected to carbon dioxide and oxygen sensors. The reactors were submerged in thermostatic baths in order to keep the temperature stable in a fixed value. The temperature depended on the process carried out and the optimum temperature of the specific microorganisms.

Airflow, temperature and oxygen content were continuously monitored in all fermentations. Using the on-line measurements of the oxygen content and airflow, the specific oxygen uptake rate (sOUR) was calculated according to Ponsá et al. (2010) for continuous monitoring in order to provide accurate information on biological activity. Monitoring was performed by a self-made acquisition and control system based on Arduino® and self-made software.

2.3. Bioproducts

Digestate was assessed as a source for the production of selected bioproducts through solid-state fermentation. In all experiments, raw digestate was used without any pretreatment as the main objective of this work is to evaluate the possibilities of digestate as obtained. Two of the main concerns when working with digestate are the low porosity of the material and the high moisture content (Paavola and Rintala, 2008). For these reasons, sponge cloth (Spontex®) pieces were added as bulking agent in all fermentations. Sponge cloth is an inert material that provided adequate porosity and moisture levels to the solid mixture hence promoting the oxygen transfer through the solid matrix (Rodríguez-Couto, 2012; Ruggieri et al., 2009).

The targeted bioproducts were: hydrolytic enzymes (cellulases and proteases), biosurfactants (sophorolipids) and biopesticides derived from *Bacillus thuringiensis* (Bt). Hydrolytic enzymes are bioproducts obtained from a wide spectrum of microorganisms (El-Bakry et al., 2015) and often by the autochthonous microorganisms present in the waste (Abraham et al., 2013; Cerda et al., 2017a). The latter studies showed that it is possible to obtain hydrolytic enzymes using non sterile substrates thus reducing sterilisation related operational costs. Therefore, in the present study the potential of hydrolytic enzymes production from autochthonous microorganisms was assessed using hygienised digestate as the substrate. Different cases are those related to biopesticides and biosurfactants: these are specific bioproducts that require the inoculation of specific microorganisms (Ballardo et al., 2017; Jiménez-Peñalver et al., 2016). Therefore, the effect of the sterile and hygienised digestate was assessed. The main objective of these activities was to study the potential synergetic/antagonist effect that the autochthonous microorganisms may have on the externally added strain. Experimental conditions were selected on the basis of previous studies where we observed that some combinations did not produce a significant amount of bioproducts. This is the case, for instance, of sophorolipids production with no sterilisation.

A complete experimental methodology is detailed in the following section for each bioproduct.

2.3.1. Hydrolytic enzymes production using autochthonous microbiome

2.3.1.1. Procedure. Fermentations were performed using hygienised digestate as the substrate and sponge cloth (Spontex®) as the bulking agent in a ratio of 95:5 (w/w). The fermentations were carried out in triplicates in 0.45 L reactors with a total weight of 120 g of material in each reactor. The processes were performed at 37 °C using a fixed airflow of 20 mL min⁻¹ during 96 h as previously reported by Abraham et al. (2013).

Sampling was performed at 0, 24 and 48 h of fermentation by

removing 3 g of the content of each reactor. During the process, protease and cellulase activity and biological activity measured as sOUR were continuously monitored in addition to routine analysis, among them dry matter, moisture content and pH.

2.3.1.2. Specific analytical methods. Extraction for cellulase determination was done by mixing fermented solids with 0.05 M citrate buffer (pH 4.8) in a ratio 1:15 (w/v), shaking for 30 min. Extract was then centrifuged at 10,000 rpm during 10 min and filtered to 0.45 μm . Supernatant was used for cellulase assay. Total cellulase activity was measured using filter paper assay (FPase), recommended by IUPAC (Ghose, 1987). Results were expressed as FPU g^{-1} DM, where one unit of FPase (FPU) was defined as the amount of enzyme that releases 1 μmol of reducing sugars from Whatman filter paper per minute.

Extraction for protease determination was carried out by mixing the fermented solid with 50 mM HCl-Tris (tris(hydroxymethyl)amino-methane) buffer, pH 8.10, in a ratio 1:5 (w/v) for 45 min and the extract was separated by centrifugation at 10,000 rpm for 10 min at 4 °C and further filtration through 0.45 μm (Abraham et al., 2013). Supernatant was used as crude enzyme extract. Alkaline protease activity was determined using a method previously described by Alef and Nannipieri (1995). One unit of protease activity was defined as 1 μg of tyrosine released under the assay conditions.

2.3.2. Biosurfactants production using *Starmella bombicola* as inoculum

2.3.2.1. Inoculum preparation. *Starmella bombicola* ATCC 22214 was obtained from the American Type Culture Collection (Manassas, USA). The microorganism was preserved at -80 °C according to the provider's recommendations, and a new agar slant was cultivated when needed. *S. bombicola* growth conditions for inoculum preparation were performed according to the methodology presented by Jiménez-Peñalver et al. (2016).

2.3.2.2. Procedure. Digestate is a material with low sugar (0.18%) and fat content (5%) (Table 1), which are the two main mandatory substrates for an efficient sophorolipids production as reported by Jiménez-Peñalver et al. (2016) and Vishal and Aniruddha, (2012). In order to tackle the nutritional requirements, external sugar and/or fat sources were considered using glucose and oleic acid as model substrates. Additionally, considering the high operational costs associated to a sterilization process, the use of sterile (121 °C, 20 min) and hygienised digestate (70 °C, 1 h) was also assessed. Specifically, in a first stage four combinations were assessed using sterile digestate: i) digestate (D), ii) digestate supplemented with glucose 1% (DG), iii) digestate supplemented with oleic acid 10% (w/w) (DA) and iv) digestate supplemented with glucose 1% and oleic acid 10% (w/w) (DGA). Digestate sterilisation process was performed in an autoclave at 121 °C for a period of 20 min.

In a second stage, the most successful combinations from the first stage were tested using hygienised digestate: i) digestate supplemented with glucose 1%(w/w) (DG_s) and ii) digestate supplemented with glucose 1% (w/w) and oleic acid 10% (w/w) (DGA_s). Digestate hygienisation was performed by maintaining the material at 70 °C in an oven for a period of 1 h.

All experiments were carried out in triplicates in 0.45 L reactors according to the methodology described by Jiménez-Peñalver et al. (2016) and are summarised in Table 2. A total of 100 g of mixture were assessed under controlled conditions of airflow (20 mL min^{-1}) and temperature (30 °C) for a period of 5 days. In all experiments, sponge cloth (Spontex®) was added in a 5% (w/w) ratio as the bulking agent. Sampling was performed at the end of the fermentation by removing 3 g of the content of each reactor. Specific and routine measurements were performed with the collected samples.

Regarding mixing, some authors (Jiménez-Peñalver et al., 2016) showed that intermittent mixing at 3, 5 and 7 days increased

Table 2

Experimental description of solid-state fermentation trials for sophorolipids production.

Operational Conditions	Solid mixture for SSF
Experiment 1: Sterile digestate	
Airflow: 20 mL min^{-1}	Substrate: Digestate
Temperature: 30 °C	Digestate + Glucose 1% (DG)
Time: 5 days	Digestate + OleicAcid 10% (DA)
Sterile digestate:	Digestate + Glucose1% + OleicAcid 10% (DGA)
121 °C, 20 min	Inoculum: <i>S. bombicola</i>
Experiment 2: Hygienised digestate	
Airflow: 20 mL min^{-1}	Substrate: Digestate + Glucose 1% (DG_s)
Temperature: 30 °C	Digestate + Glucose 1% + Oleic Acid 10% (DGA_s)
Time: 5 days	Inoculum: <i>S. bombicola</i>
Hygienised digestate:	
70 °C, 1 h	

sophorolipids production in 25% compared to static conditions, when using different wastes. Hence, this strategy was implemented in the present work, selecting 96 h instead of 72 h due to the lag phase observed in our system.

2.3.2.3. Specific analytical methods. Sophorolipids were extracted from the fermentation mixture according to Jiménez-Peñalver et al. (2016). Sophorolipids yield is defined as grams of sophorolipids per g of total dry mass of fermentation. In the text, the yield is also reported as grams of sophorolipid per 100 g of substrate mixture for comparison with yields reported in the literature.

Water-soluble sugar content was measured in the supernatant using the anthrone method (Scott and Melvin, 1953).

2.3.3. Biopesticides production using *Bacillus thuringiensis* as inoculum

2.3.3.1. Inoculum preparation. *B. thuringiensis* var. *Kurstaky* NRRL HD-73 (CECT 4497) (Bt) used in this study was acquired from the "Colección Española de cultivos tipo" (Valencia, Spain). The strain was rehydrated and stored at -80 °C in cryovials with 10% (v/v) glycerol according to provider's recommendation. Bt growth conditions for inoculum preparation were carried out according to the methodology presented by Ballardo et al. (2017).

2.3.3.2. Procedure. Ballardo et al. (2017) have already proven that *B. thuringiensis* is able to grow in a complex matrix of different substrates (soy fibre, OFMSW, among others) without any nutrient supplementation, and then no supplementation was planned for biopesticide production experiments.

Fermentations were carried out in 0.45 L reactors using a mixture of digestate as substrate and sponge cloth (Spontex®) as the bulking agent (BA) in a 5% (w/w) ratio. The total weight of the inoculated solid matrix was 120 g of mixture per fermentation. Due to the nature of the substrate two sets of experiments were performed: one using sterile digestate and another without sterilization. Bt-containing inoculum with a concentration of 10⁷ CFU mL^{-1} was added in a 10% (w/w) ratio to the solid matrix. These fermentations were carried out in triplicates at 30 °C using a constant airflow of 20 mL min^{-1} during 96 h. Samples of 3 g of each reactor were collected at 0, 12, 24, 48 and 96 h of the fermentation time to ascertain the evolution of viable Bt cells and spores.

2.3.3.3. Specific analytical methods. Viable cell count and spore count were performed according to Ballardo et al. (2016). Briefly, viable cells were extracted from the solid phase using Ringer solution in a 1:9 (w/v) ratio stirred at 130 rpm for 20 min. Serial dilutions were prepared, plated in Petri dishes and incubated at 30 °C for 20 h. After that, manual counting of viable cells was performed. For spore count, the diluted

sample was maintained at 80 °C at 10 min and then placed in a cold bath for 5 min. After that, the same procedure for viable cells was followed. All the counts were done in triplicate and were expressed as colony forming units per gram of dry matter (CFU g DM⁻¹). Images of sporulated and vegetative forms of Bt were observed by using an OLYMPUS optical microscope BH-2 with an objective of x100. Bt cells and spores were visually identified. In previous experiments, Ballardo et al. (2016) gram stain was used to differentiate and identify Bt in the mixture, and malachite green was used as a differential stain for bacterial endospores. After a large number of experiments, it was noted that these last staining procedure was not necessary to identify Bt cells and spores.

2.4. Dynamic respiration index

Dynamic respiration index (DRI) is an index that reflects the stabilisation of organic wastes. This parameter was determined according to the methodology described by Ponsá et al. (2010). Briefly, DRI can be calculated from oxygen and air flow data from a given time through Equation (1) derived from a steady state mass balance:

$$DRI = \frac{(O_{2,i} - O_{2,o}) \times F \times 31.98 \times 60 \times 1000^a}{1000^b \times 22.4 \times DM} \quad (1)$$

where DRI is the dynamic respiration index expressed in mg O₂ g⁻¹ DM h⁻¹; (O_{2,i} - O_{2,o}), the difference in oxygen content between airflow in and out the reactor at a given time; F is the volumetric airflow under normal conditions, mL min⁻¹; 60, the conversion factor, min h⁻¹; 1000^a, the conversion factor, mg g⁻¹; 1000^b, the conversion factor mL L⁻¹; 22.4, the volume occupied by one mol of ideal gas under normal conditions, L; DM, the dry matter of sample loaded in the reactor, g.

DRI when is measuring the biological activity of a sample in a specific moment of fermentations is named as specific oxygen uptake rate (sOUR) with the same units.

2.5. Routine methods

Moisture content, total and volatile solids, pH and electrical conductivity were determined according to standard procedures (Composting Council, 2001). Cellulose, hemicellulose and lignin content were determined by the method of Van Soest et al. (1991) using the Ankom 200 Fiber Analyzer incubator (Ankom Technology, Macedon, NY).

2.6. Statistical analysis

All experimental data has been analysed using pairwise comparisons were based on the Tukey test (p < 0.05). Statistics were performed with MINITAB™ V17. If some experimental value exceeded a 95% of confidence, it was marked with an asterisk in Figures.

3. Results and discussion

3.1. Hydrolytic enzymes production

Results of digestate characterisation (Table 1) showed in that it contains significant amounts of protein and lignocellulosic material, hence it was hypothesized that digestate could have potential as a source for proteases and cellulases production.

The average sOUR profile obtained in the SSF for hydrolytic enzymes production is presented in Fig. 1. The initial biological activity observed in the fermentations reflected that digestate presented a considerable content of aerobically biodegradable organic matter (Barrena et al., 2006). Maximum sOUR was found at 10 h of fermentation with a value of 2.6 ± 0.2 mg O₂ g⁻¹ DM h⁻¹. After that peak, biological activity decreased to a value of near 2.2 mg O₂ g⁻¹ DM h⁻¹

which remained stable until the end of the fermentation. This is a typical behaviour of organic wastes under aerobic biodegradation that never reach a sOUR near to zero.

Cellulase production ranged between 0.5 and 1.5 FPU g⁻¹ DM, which is in the lower range reported at laboratory scale at similar conditions (Cerda et al., 2017a) and even lower when compared with SSF using sterile substrates or adding a single strain (Dhillon et al., 2012; El-Bakry et al., 2015).

Fig. 1 also shows that there is no clear correlation between maximum biological activity measured as sOUR and maximum cellulase activity. This is not in agreement with the reported by Cerda et al. (2017a), who found that the moment of maximum cellulase and sOUR activities consistently matched. Despite these findings, these authors also observed that there was not a direct correlation between cellulase production and any other relevant parameter, indicating a highly complex process with different microorganisms and/or metabolites working together in a synergetic or antagonistic manner (Cerda et al., 2017a; Eichorst et al., 2013).

Digestate presented a significant initial cellulase activity when compared with the rest of the fermentation (1.57 ± 0.52 FPU g⁻¹ DM). This is probably associated with the previous anaerobic digestion process. The produced enzymes could remain immobilized in the solid substrate and hence, obtaining a high initial enzymatic content in the digestate.

In general, there is a consistent decline in cellulase production, followed by a slight recovery at the end of the fermentation, which could indicate shifts in the microbial population or even in the substrate structure (Cerda et al., 2017b; López-González et al., 2014). This can be explained by a change between anaerobic conditions (in which is obtained the digestate) and aerobic conditions (in SSF). However, this should be confirmed by specific microbial analysis and characterisation.

During the performance of the SSF the substrate structure is altered, i.e. the generation of more accessible and simple hydrolysates. These hydrolysates can be of any origin such as proteins, lipids or carbohydrates and therefore do not imply an improvement of the cellulase production. The low cellulase production can be attributed to the fact that during the fermentation the pH achieved values between 8 and 9 and cellulase production conventionally occurs at acid pH (4–6) (Dhillon et al., 2012; El-Bakry et al., 2015; Li et al., 2013). Another aspect to take into consideration is the extraction ratio of cellulases. Several options for a further study on cellulase production can be assessed such as the optimisation of the extraction ratio or even the extracting agent (Pirota et al., 2013), the adaptation of the native microorganisms using a sequential batch operation strategy (Cerda et al., 2017a) or the inoculation with specific strains. Another unexplored alternative could be direct enzyme extraction followed by stabilization of the exhausted solid by means of composting as proposed by Marín et al. (2018).

Fig. 1 also shows the protease production profiles. Two discrete enzymatic peaks were observed, one at the beginning and another at the end of the fermentation. Both peaks reported a protease production of nearly 65 U g⁻¹ DM. Again, as proteases are produced by anaerobic and aerobic microorganisms it is possible that going from one condition to another one can be reflected as two peaks of proteases production. A similar production profile was reported by Novelli et al. (2016), observing many protease activity peaks when using several fungi strains as mixed inoculum. These authors attributed this profile to underlying adaptations in the molecular and physiological machinery of the microbiome present in the substrate mixture.

The obtained values of proteases production are in the lower range of those reported in literature using different substrates. Abraham et al. (2013) used the same SSF configuration for protease production using soy fibre, coffee husk and hair waste with values of 310.33 ± 9.17, 89.01 ± 0.59, and 141.75 ± 17.6 U g⁻¹ DM, respectively.

It is likely that the pH observed during the fermentation (8.7–9)

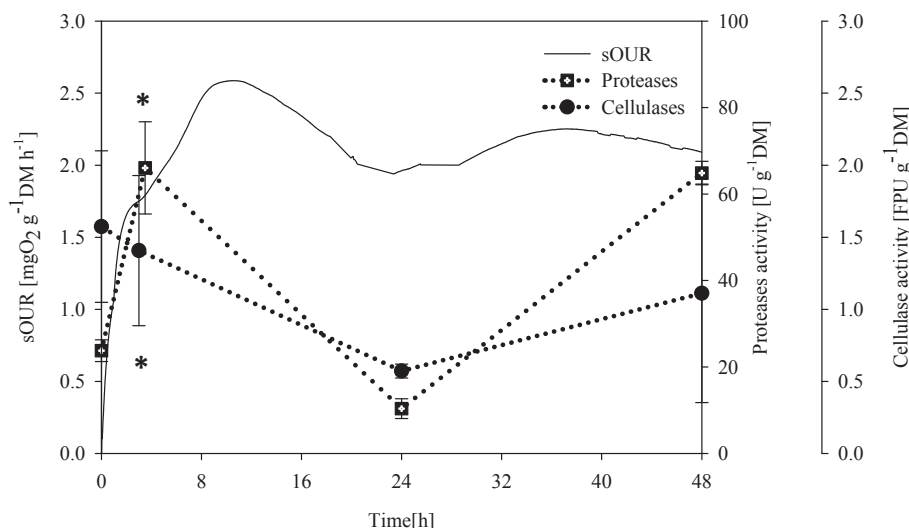


Fig. 1. Operational profiles of SSF carried out in triplicates using digestate as substrate in a 0.45 L reactor for hydrolytic enzymes production. Cellulase (circles) and protease (squares) production and sOUR profiles (s.d < 10%) are presented. Experimental points with an asterisk indicates high deviation ($p > 0.05$).

promoted protease production as stated by several authors (Abraham et al., 2013; El-Bakry et al., 2015; Soares et al., 2005). Moreover, proteases hydrolytic capacity is also boosted by alkaline conditions. The release of protease to the solid media at suitable hydrolytic conditions could have induced the hydrolysis of other enzymatic components, such as the produced cellulases, hence affecting cellulase production yield.

Summarizing, in this first screening digestate was not found suitable as a substrate for cellulase and protease production using only autochthonous microbiome. Further optimisation must be performed in order to increase the production yields. One of the difficulties of using digestate as a substrate is the low biodegradable matter content, therefore, one alternative to boost microbial activity can be the use of a biodegradable co-substrate such as the organic fraction of municipal solid wastes.

Another interesting alternative to be assessed is the development of different operational strategies such as working in a sequential batch configuration thus allowing the adaptation of the autochthonous microbiome as reported by Cerda et al. (2017a). Another approach would be to work with specific strains to overproduce, by instance, proteases, as successfully reported by El-Bakry et al. (2016).

3.2. Biosurfactant production

In a first set of experiments the incorporation of external fat and sugar sources were considered. The addition of glucose (G) and oleic acid (A) to sterile digestate was carried out under specific conditions summarized in Table 2. *S. bombicola* was inoculated in all cases since the beginning of the experiment. In all fermentations, pH slightly increased from 8.8 to an average value of 9.2 ± 0.2 . It is known that pH drops to acidic values when *S. bombicola* metabolises the nutrients and synthesizes the sophorolipid. Due to the high buffering capacity of digestate, lowering the pH prior to fermentation was discarded since high amounts acidic solutions would be required.

Fig. 2a shows the sOUR profiles of the first set of fermentations, using respectively D, DG, DA and DGA. A lag phase was present in all fermentations, however, this was of particular relevance in those fermentations using an external fat source (DA and DGA). After 96 h, mixing was performed, generating an increase of sOUR in the DA from 1 to $1.5 \text{ mg O}_2 \text{ g}^{-1} \text{ DM h}^{-1}$. Mixing increased the bioavailability of substrates to the yeast and, therefore, more oxygen and fats were consumed (Jiménez-Peñalver et al., 2016).

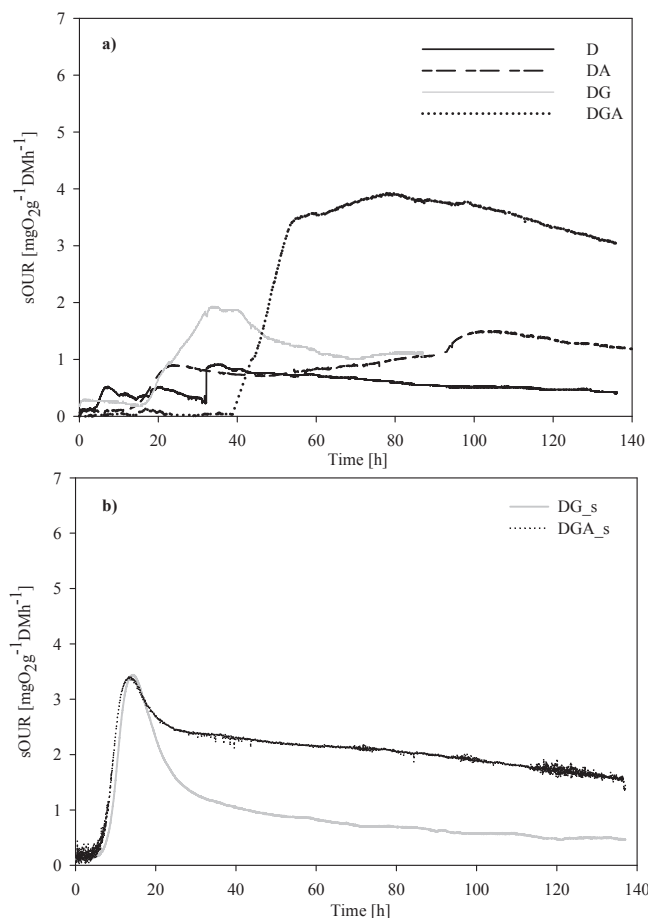


Fig. 2. Average sOUR profiles during SSF carried out in triplicates using 0.45 L reactors for sophorolipids production. Fig. 3a shows the effect of the addition of external sugar and/or fat sources to sterile digestate using: digestate (D), digestate and glucose (DG), digestate and oleic acid (DA) and digestate with glucose and oleic acid (s.d < 5%). Fig. 3b shows the effect of the use of hygienised digestate (non-sterile) supplemented with: glucose (DG_s) and using glucose and oleic acid (DGA_s) (s.d < 5%).

Fig. 2a shows positive results in terms of biological activity when external sources of fats and sugars were added. sOUR of DGA fermentation presented a substantial increase, where the three substrates were used, achieving a maximum value of $3.8 \text{ mg O}_2 \text{ g}^{-1} \text{ DM h}^{-1}$ at 76 h of operation. After that peak, sOUR showed a slow decrease, reaching at the end of the fermentation a value of $3 \text{ mg O}_2 \text{ g}^{-1} \text{ DM h}^{-1}$. In spite of the good results, obtained in terms of biological activity, no sophorolipids production was observed. This fact can be attributed to different aspects of the fermentation such as the pH observed during the process (Thomas et al., 2013). *S. bombicola* cultivation is associated with a strong pH drop for optimal sophorolipid production, where the pH should be kept at 3.5 after a spontaneous decrease (Göbbert et al., 1984). Additionally, in order to attain the proper growth and sophorolipids production, this yeast requires a high initial sugar concentration (100 g L^{-1} or more) which was not provided in the presented fermentations (Rosa and Lachance, 1998; Vishal and Aniruddha, 2012). Therefore, the addition of an external sugar source was considered. In this sense, there is no consensus among reported research on the subject, observing that while Vishal and Aniruddha (2012) reported positive effects, Jiménez-Peñalver et al. (2016) obtained no improvements on sophorolipids production. It is also possible that the sterilization process may have some impact in the substrate structure that made the substrate more accessible for the microorganisms present during the fermentation. It also has to be considered that sterilization of large amounts of solids is a complex process that may only reduce biodiversity but not completely eliminate microorganisms initially present. For that reason, it is possible that the surviving microorganisms would be able to thrive in the substrate, competing *S. Bombicola* thus hindering the production process. However, in our experience, the use of short times (2–5 days) of fermentation makes very difficult to observe the growth of opportunistic microorganisms, especially when the inoculation of a specific strain is performed.

Additional fermentations were carried out using hygienised digestate at the conditions described in Table 2. These results are presented in Fig. 2b.

The highest sOUR in both fermentations was found at 20 h of operation with values of nearly $3.4 \text{ mg O}_2 \text{ g}^{-1} \text{ DM h}^{-1}$ for DGA_s and DG_s. After that time, both fermentations decreased their biological activity. Although sOUR peak was similar for both conditions, showing similar easiness of biodegradability, DGA_s kept higher sOUR values showing a higher microbial activity due to a higher biodegradable OM content (Ponsá et al., 2010). The only positive result obtained from these series of experiment was in DGA fermentation, where the sophorolipid production yield was $0.020 \text{ g g}^{-1} \text{ DM}$, which is a low value when compared with that reported by Jiménez-Peñalver et al. (2016). These authors reported a yield of $19.1 \text{ g g}^{-1} \text{ DM}$ using winterization residue and molasses as the substrate and *S. Bombicola* as the inoculum. Moreover, the obtained yield using digestate supplemented with sugar and fat sources was lower than that obtained by Vishal and Aniruddha (2012) which observed $38 \text{ g g}^{-1} \text{ DM}$ using wheat bran supplemented with oleic acid and glucose.

The overall results of this part of the work indicate that sophorolipids production using digestate as the main substrate is not a suitable option without exhaustive optimisation. These optimisations must meet the nutritional requirements for the proper *S. Bombicola* growth (acid pH) and sugar and fat content for sophorolipids production. A potential alternative to achieve these goals could be the use of residual streams derived from a productive process, thus promoting waste valorisation and circular economy.

3.3. Biopesticide production

Fig. 3 shows the results of the SSF carried out using digestate as sole substrate under sterile (Fig. 3a) and non-sterile conditions (Fig. 3b) for biopesticide production using Bt.

In fermentations using sterile digestate (Fig. 3a), the maximum

sOUR was obtained at nearly 9 h of operation reaching a value of $0.80 \pm 0.08 \text{ mg O}_2 \text{ g}^{-1} \text{ DM h}^{-1}$ and decreased afterwards until the end of the process. Bt inoculation generated a rapid start-up of the process, generating 2-fold increase on the biological activity reflected as sOUR when compared with sterile digestate non inoculated with Bt (data not shown). Also, the differences among the triplicates were minimal (s.d < 5%), which indicates that the process is reliable and reproducible as reported by other authors in similar processes (Abraham et al., 2017; Cerda et al., 2017b).

Fig. 3a also shows the viable cell and spore counts during the fermentations. Viable cell count in all replicates showed an initial increase in the first 48 h until values of $8.49 \pm 2.12 (10^8) \text{ CFU g}^{-1} \text{ DM}$. After that period, viable cell count decreased until values of $9.09 \pm 0.81 (10^7) \text{ CFU g}^{-1} \text{ DM}$. These results are very positive, because they reflect the ability of Bt of not only surviving in a complex solid matrix based on digestate, but to thrive and achieve an almost 3-fold increase the initial viable cell count. It is likely that the decrease in viable cell count is related to changes in the solid environment, highly attributed to a depletion of substrate, hence leading to the bacteria to create their resistant form, i.e spores. Digestate has a low content of readily metabolizable compounds, then it seems plausible to assume that in a non-sterile fermentation this material would be quickly depleted. Martínez et al. (2017) showed that when using a high soluble sugar content substrate (30% d.b) such as sugar beet molasses in a non-sterile SSF, the sugar content was reduced in nearly 80% in 24 h.

In this sense, the fermentations started with no spore presence in the solid matrix, being only detected from the first sampling at 24 h of fermentation, reaching a maximum at 72 h with a value of $8.15 \pm 0.04 (10^7) \text{ CFU g}^{-1} \text{ DM}$. After that period, spore count remained almost stable until the end of the fermentation. One hypothesis to explain why spore count remains stable at 72 h could be that a steady-state may be reached, where part of the spores produced can germinate if a favourable microenvironment is created in the reactor, while other viable cells start the sporulation process due to stressful situations in other non-favourable microenvironment.

Other studies using different substrates working at similar conditions observed a final cell count of $6.6 \cdot 10^{10} \text{ CFU g}^{-1} \text{ DM}$ (Devi et al., 2005), $1.0 \cdot 10^{10} \text{ CFU g}^{-1} \text{ DM}$ (Zhuang et al., 2011) and $6.2 \cdot 10^{11} \text{ CFU g}^{-1} \text{ DM}$ (Ballardo et al., 2016), which are higher than those obtained in the present study using digestate as the substrate. On the other hand, spore counts reported by the same authors ranged between 10^7 and $10^9 \text{ CFU g}^{-1} \text{ DM}$, which indicates that the results obtained in this work are in the middle range of those reported in other publications. It has to be considered that the substrates used by Devi et al. (2005) and Ballardo et al. (2016) were wheat bran and soy fibre, respectively. These materials present low variability in their composition and were (in the case of Devi et al. (2005)) supplemented with external carbon and nitrogen sources.

This is of great importance considering that it is during the sporulation stage that Bt is able to produce the insecticidal crystal (Cry or Cytoxins) (Bravo et al., 2011). In this context, it can be stated that digestate presents a limited amount of nutrients that provokes Bt sporulation in a short time.

Fig. 3b presents the results obtained using non-sterile digestate. Biological activity observed in this case increased faster and was overall higher than under sterile conditions, which is likely related to the higher presence of microbial populations in the reactors. Maximum sOUR was found at 4 h with an average value of $2.53 \pm 0.83 \text{ mg O}_2 \text{ g}^{-1} \text{ DM h}^{-1}$. The non-sterility of the fermentation implied a higher number of microorganisms able to colonize the solid matrix, which generated an overall increase on biological activity and higher deviation among replicates.

In contrast with that observed in the experiments using sterile digestate, Bt was not able to thrive onto the hygienised digestate in the same magnitude than when using sterile digestate. In this sense, a maximum of cell growth was observed at 24 h with a viable cell count

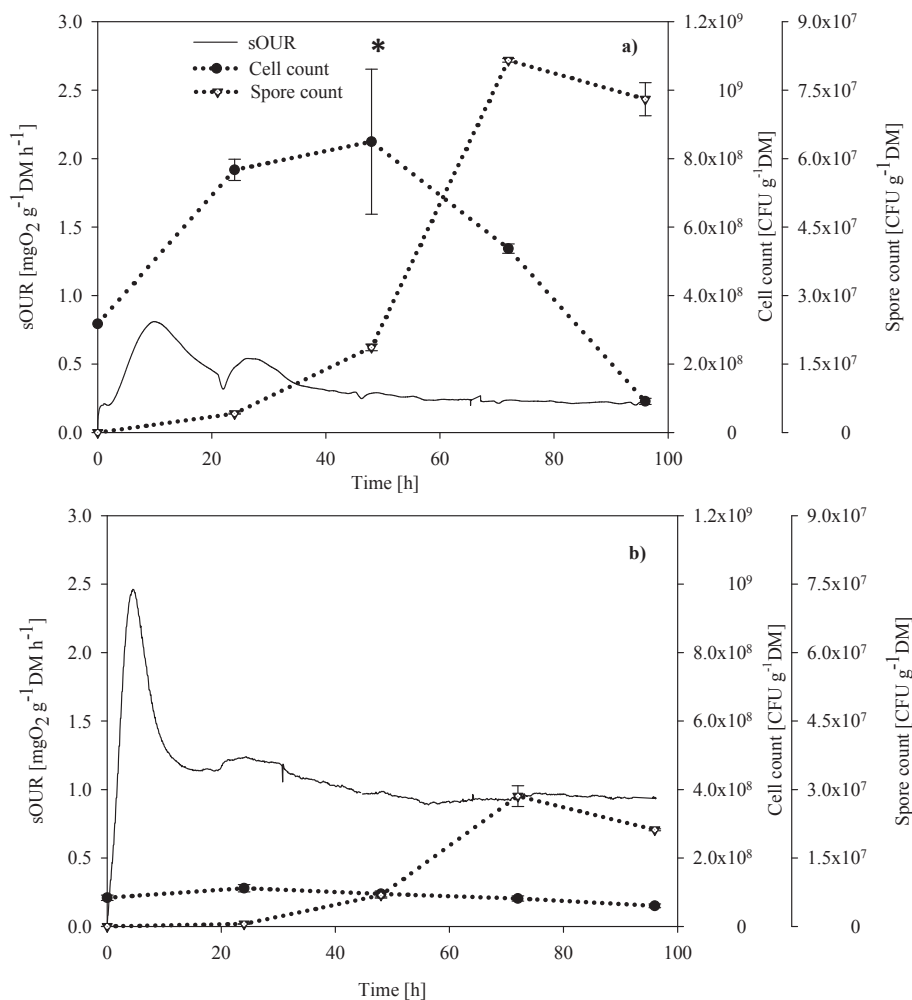


Fig. 3. sOUR and viable cell (circles) and spore (triangles) count profiles obtained in 0.45 L SSF reactors using a) sterile and b) non-sterile digestate as substrate for biopesticide production. Experimental points with an asterisk indicates high deviation ($p > 0.05$).

of 1.11 ± 0.10 (10^8) CFU g^{-1} DM, representing a 1.34-fold increase of the initial cell count. After that moment, viable cells decreased until the end of the fermentation until values of 6.02 ± 0.56 (10^7) CFU g^{-1} DM. As for the spore production, the fermentation started with no spore content detected in the digestate and only became accountable after the first 24 h of operation, when the viable cell started to decrease. Spore counts reached its maximum at 72 h of fermentation, with a value of 2.85 ± 0.22 (10^7) CFU g^{-1} DM.

Previous research performed at the same conditions using soy fibre and biowaste as substrates, presented a higher viable cell count of $3.8 \cdot 10^{11}$ CFU g^{-1} DM (Ballardo et al., 2016) but a spore count of $2.1 \cdot 10^7$ CFU g^{-1} DM (Ballardo et al., 2017), which is in the range of that obtained in the present work. It is possible that the substrates used by these authors had more available nutrients and hence providing a more suitable environment for the growth of Bt. The same authors confirmed that the final cell and spore counts depended on the initial inoculum added to the solid matrix. In this sense, they stated that when Bt was added in a 7%, 9% and 12% to the substrate (biowaste) the final viable cell counts obtained were $9.9 \cdot 10^5$ CFU g^{-1} DM, $1.1 \cdot 10^7$ CFU g^{-1} DM and $2.5 \cdot 10^7$ CFU g^{-1} DM, respectively (Ballardo et al., 2017). All these values are lower than the observed in the present work, showing that unfavourable conditions for Bt growth promote its sporulation.

More interestingly, from the present study it can be stated that it is possible the use of digestate as a sole substrate for biopesticide production. Bt was able to grow and to sporulate onto the solid matrix using hygienised digestate at a controlled temperature. This will be of

great importance looking towards the development of the productive process and the assessment of its associated costs.

The use of digestate as a substrate for bioconversion into a value-added product will contribute to close the organic matter cycle, hence optimising its management into a circular approach. The positive outcomes obtained in this work open new alternatives for the valorisation of digestate as a substrate for biopesticide production. Further studies have to be performed in order to validate these results at a larger scale (bench or pilot) to assess the process technical, economic and environmental feasibility. Moreover, different biopesticide production could be assessed by using other microorganisms such as other bacteria or even fungi.

4. Conclusions

Digestate was assessed as a substrate for bioproducts via SSF, approaching a new waste management strategy. In spite several production strategies have been tested, hydrolytic enzymes and biosurfactant production reported low production yields. Further studies are required to enhance productivities.

The best results were obtained for Bt-produced biopesticide. This microorganism was able to grow and to sporulate using hygienised digestate (non-sterile) as a sole substrate. Spore production obtained was in the middle range of the values reported in other references. Further studies will be performed for optimisation, scale-up and field tests on biopesticide action.

Acknowledgments

This research was funded by the Horizon 2020 Programme in the DECISIVE project (grant agreement No 689229). Laura Mejias thanks Generalitat de Catalunya for her pre-doctoral grant (reference 2017 DI019). The authors thank Consorci per a la Gestió dels Residus del Vallès Oriental, for providing the digestate.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.09.131>.

References

- Abraham, J., Gea, T., Komilis, D., Sanchez, A., 2017. Reproducibility of solid-state fermentation at bench-scale: the case of protease production. *Global NEST J.* 19 (2), 183–190.
- 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. *Biochem. Eng. J.* 74, 15–19.
- Alef, K., Nannipieri, P., 1995. 7 – Enzyme activities A2 – Alef, Kassem. In: Nannipieri, P. (Ed.), *Methods in Applied Soil Microbiology and Biochemistry*. Academic Press, London, pp. 311–373.
- Ballardo, C., Abraham, J., Barrena, R., Artola, A., Gea, T., Sánchez, A., 2016. Valorization of soy waste through SSF for the production of compost enriched with *Bacillus thuringiensis* with biopesticide properties. *J. Environ. Manage.* 169, 126–131.
- Ballardo, C., Barrena, R., Artola, A., Sánchez, A., 2017. A novel strategy for producing compost with enhanced biopesticide properties through solid-state fermentation of biowaste and inoculation with *Bacillus thuringiensis*. *Waste Manage.* 70, 53–58.
- Barrena, R., Vázquez, F., Sánchez, A., 2006. The use of respiration indices in the composting process: a review. *Waste Manage. Res.* 24 (1), 37–47.
- Bravo, A., Likitvivanavong, S., Gill, S.S., Soberón, M., 2011. *Bacillus thuringiensis*: a story of a successful bioinsecticide. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 41 (7), 423–431.
- Castilho, L.R., Mitchell, D.A., Freire, D.M., 2009. Production of polyhydroxyalkanoates (PHAs) from waste materials and by-products by submerged and solid-state fermentation. *Bioresour. Technol.* 100 (23), 5996–6009.
- Cerda, A., Gea, T., Vargas-García, M., Sánchez, A., 2017a. Towards a competitive solid state fermentation: cellulases production from coffee husk by sequential batch operation and role of microbial diversity. *Sci. Total Environ.* 589, 56–65.
- Cerda, A., Mejías, L., Gea, T., Sánchez, A., 2017b. Cellulase and xylanase production at pilot scale by solid-state fermentation from coffee husk using specialized consortia: the consistency of the process and the microbial communities involved. *Bioresour. Technol.* 243, 1059–1068.
- Composting Council, U.S., 2001. *Test Methods for the Examination of Composting and Compost*. Edaphos International, Houston, U.S.
- Dahlin, J., Herbes, C., Nelles, M., 2015. Biogas digestate marketing: qualitative insights into the supply side. *Resour. Conserv. Recycl.* 104, 152–161.
- Dahlin, J., Nelles, M., Herbes, C., 2017. Biogas digestate management: evaluating the attitudes and perceptions of German gardeners towards digestate-based soil amendments. *Resour. Conserv. Recycl.* 118, 27–38.
- Devi, P.S., Ravinder, T., Jaidev, C., 2005. Cost-effective production of *Bacillus thuringiensis* by solid-state fermentation. *J. Invertebr. Pathol.* 88 (2), 163–168.
- Dhillon, G., Kaur, S., Brar, S., Verma, M., 2012. Potential of apple pomace as a solid substrate for fungal cellulase and hemicellulase bioproduction through solid-state fermentation. *Ind. Crops Prod.* 38, 6–13.
- Eichorst, S., Varanasi, P., Stavila, V., Zemla, M., Auer, M., Singh, S., Simmons, B., Singer, S., 2013. Community dynamics of cellulose-adapted thermophilic bacterial consortia. *Environ. Microbiol.* 15 (9), 2573–2587.
- El-Bakry, M., Abraham, J., Cerda, A., Barrena, R., Ponsá, S., Gea, T., Sánchez, A., 2015. From wastes to high value added products: novel aspects of SSF in the production of enzymes. *Crit. Rev. Environ. Sci. Technol.* 45 (18), 1999–2042.
- El-Bakry, M., Gea, T., Sánchez, A., 2016. Inoculation effect of thermophilic microorganisms on protease production through solid-state fermentation under non-sterile conditions at lab and bench scale (SSF). *Bioprocess Biosyst. Eng.* 39 (4), 585–592.
- Fuldauer, L.I., Parker, B.M., Yaman, R., Borrión, A., 2018. Managing anaerobic digestate from food waste in the urban environment: evaluating the feasibility from an interdisciplinary perspective. *J. Clean. Prod.* 185, 929–940.
- Ghose, T., 1987. Measurement of cellulase activities. *Pure Appl. Chem.* 59 (2), 257–268.
- Göbbert, U., Lang, S., Wagner, F., 1984. Sophorose lipid formation by resting cells of *Torulopsis bombicola*. *Biotechnol. Lett.* 6 (4), 225–230.
- Jiménez-Peñalver, P., Gea, T., Sánchez, A., Font, X., 2016. Production of sophorolipids from winterization oil cake by solid-state fermentation: optimization, monitoring and effect of mixing. *Biochem. Eng. J.* 115, 93–100.
- Li, C., Yang, Z., He Can Zhang, R., Zhang, D., Chen, S., Ma, L., 2013. Effect of pH on cellulase production and morphology of *Trichoderma reesei* and the application in cellulosic material hydrolysis. *J. Biotechnol.* 168 (4), 470–477.
- López-González, J., Vargas-García, M., López, M., Suárez-Estrella, F., Jurado, M., Moreno, J., 2014. Enzymatic characterization of microbial isolates from lignocellulose waste composting: chronological evolution. *J. Environ. Manage.* 145, 137–146.
- Marín, M., Artola, A., Sánchez, A., 2018. Optimization of down-stream for cellulases produced under solid-state fermentation of coffee husk. *Waste Biomass Valori.* <https://doi.org/10.1007/s12649-018-0327-5>.
- Martínez, O., Sánchez, A., Font, X., Barrena, R., 2018. Enhancing the bioproduction of value-added aroma compounds via solid-state fermentation of sugarcane bagasse and sugar beet molasses: operational strategies and scaling-up of the process. *Bioresour. Technol.* 263, 136–144.
- Martínez, O., Sánchez, A., Font, X., Barrena, R., 2017. Valorization of sugarcane bagasse and sugar beet molasses using *Kluyveromyces marxianus* for producing value-added aroma compounds via solid-state fermentation. *J. Clean. Prod.* 158, 8–17.
- Mejias, L., Cerda, A., Barrena, R., Gea, T., Sánchez, A., 2018. Microbial strategies for cellulase and xylanase production through solid-state fermentation of digestate from biowaste. *Sustainability* 10 (7), 2433–2448.
- Monlau, F., Sambusiti, C., Ficara, E., Aboulkas, A., Barakat, A., Carrere, H., 2015. New opportunities for agricultural digestate valorization: current situation and perspectives. *Energy Environ. Sci.* 8 (9), 2600–2621.
- Novelli, P.K., Barros, M.M., Fleuri, L.F., 2016. Novel inexpensive fungi proteases: production by solid state fermentation and characterization. *Food Chem.* 198, 119–124.
- Paavola, T., Rintala, J., 2008. Effects of storage on characteristics and hygienic quality of digestates from four co-digestion concepts of manure and biowaste. *Bioresour. Technol.* 99 (15), 7041–7050.
- Pirotta, R.D.P.B., Miotto, L.S., Delabona, P.S., Farinas, C.S., 2013. Improving the extraction conditions of endoglucanase produced by *Aspergillus niger* under solid-state fermentation. *Bra. J. Chem. Eng.* 30, 117–123.
- Ponsá, S., Gea, T., Sánchez, A., 2010. Different indices to express biodegradability in organic solid wastes. *J. Environ. Qual.* 39 (2), 706–712.
- Rodríguez-Couto, S., 2012. A promising inert support for laccase production and decoloration of textile wastewater by the white-rot fungus *Trametes pubescens*. *J. Hazard. Mater.* 233–234, 158–162.
- Rosa, C.A., Lachance, M.A., 1998. The yeast genus *Starmerella gen. nov.* and *Starmerella bombicola sp. nov.*, the teleomorph of *Candida bombicola* (Spencer, Gorin & Tullock) Meyer & Yarrow. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 48, 1413–1417.
- Ruggieri, L., Gea, T., Artola, A., Sánchez, A., 2009. Air filled porosity measurements by air pycnometry in the composting process: a review and a correlation analysis. *Bioresour. Technol.* 100 (10), 2655–2666.
- Saveyn, H., Eder, P., 2013. End-of-waste criteria for biodegradable waste subjected to biological treatment (compost & digestate): Technical proposals, Publications Office of the European Union. Brussels.
- Scott, T.A., Melvin, E.H., 1953. Determination of dextran with anthrone. *Anal. Chem.* 25 (11), 1656–1661.
- Soares, V.F., Castilho, L.R., Bon, E.P., Freire, D.M., 2005. High-yield *Bacillus subtilis* protease production by solid-state fermentation. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 121–124, 311–319.
- Thomas, L., Larroche, C., Pandey, A., 2013. Current developments in solid-state fermentation. *Biochem. Eng. J.* 81, 146–161.
- Soest, P., Robertson, J., Lewis, B., 1991. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and non starch polysaccharides in relation to animal nutrition. *J. Dairy Sci.* 74 (10), 3583–3597.
- Vishal, J., Aniruddha, P., 2012. Solid state fermentation (SSF) for the production of sophorolipids from *Starmerella bombicola NRRL Y-17069* using glucose, wheat bran and oleic acid. *Curr. Trends Biotechnol. Pharm.* 6 (4), 418–424.
- 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. *Bioresour. Technol.* 102 (7), 4820–4826.



Valorisation of biowaste digestate through solid state fermentation to produce biopesticides from *Bacillus thuringiensis*



P. Rodríguez, A. Cerda, X. Font, A. Sánchez*, A. Artola

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 11 March 2019

Revised 10 May 2019

Accepted 15 May 2019

Keywords:

Bacillus thuringiensis

Digestate

Biopesticides

Solid-state fermentation

Pilot scale

ABSTRACT

The main goal of this work is the production of a biopesticide through solid-state fermentation of biowaste digestate inoculated with *Bacillus thuringiensis* (Bt) at pilot scale using different configurations of reactors. Fermentations were carried out using insulated and non-insulated, stirred and non-stirred reactors at different scales (10, 22 and 100 L) in order to assess the influence of the reactor configuration on the biopesticide production process. A maximum temperature of 60 °C was reached in 10-L insulated non-stirred reactors where increments of Bt viable cells and spores with respect to initial values of 1.9 and 171.6 respectively, were attained. In contrast, when temperature was regulated by using 22-L non-insulated stirred reactors the increment of viable cells and spores were 0.8 and 1.9, respectively, at a stable temperature of 27 °C. When the non-insulated stirred reactor was scaled up to 100-L, the increase of viable cells and spore counts were 1.2 and 3.8 respectively, with an average temperature of 28 °C. These results demonstrated that the election of a proper reactor configuration is important when considering the development of a new SSF process, especially when dealing with non-conventional substrates as digestate.

© 2019 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Biowaste is one of the most challenging waste to manage for its increasing volume of production and the significant environmental impact associated with its disposal.

As a consequence, the European Union (EU) has published directives that aim to reduce biowaste diversion to landfills (1999/31/EC), thus encouraging waste valorisation.

Conventionally, biowaste is treated by anaerobic digestion (AD) and/or composting, allowing energy production and organic matter stabilisation. The obtained solid fraction, i.e. digestate, contains a combination of remaining undigested organic and inorganic materials biomass and micronutrients that makes it a suitable material to be used as fertiliser (Lin et al., 2014). However, it is necessary to develop a new value chain for this material by considering it as a raw material as promoted by the EU in the Waste Hierarchy 2008/98/EC.

In this context, Solid State Fermentation (SSF) is an interesting alternative for digestate valorisation as it is a technology that allows the use of solid substrates for microorganisms' growth. SSF is by definition a process that occurs in the absence or near

absence of free water in the solid substrate but containing sufficient moisture for the growth of microorganisms (Pandey, 2003). Different authors have proven the effectiveness of SSF as a technology for the bioconversion of wastes into valuable bioproducts such as hydrolytic enzymes (Cerda et al., 2017), biofuels (Botton et al., 2018), biosurfactants (Jiménez-Peñalver et al., 2016), aromas (Martínez et al., 2017) and biopesticides (Ballardo et al., 2017). All of these authors agreed on the fact that the main challenges to overcome when developing SSF based production process are upscaling and reactor design. In this sense, some authors have consistently reported issues related to the potential loss of productivity due to the heat and mass transfer phenomena in the solid-liquid gas interfaces gaining importance as the fermentation volume increases (Zhang et al., 2013; Cerdà et al., 2017; Cerda et al., 2017).

In addition to those constraints, likely all the previously mentioned works have been developed using rich materials as agroindustrial wastes or fresh biowaste. To the best of the authors knowledge, only one work tackles the issue of handling digestate as substrate for bioproducts generation (Cerda et al., 2019). These authors reported a productive process developed at lab scale for biopesticide production using *Bacillus thuringiensis* (Bt) as the inoculum. Biopesticides derived from Bt (BDB) are widely produced (Parnell et al., 2016; Kumar et al., 2018) and reported as

* Corresponding author.

E-mail address: antoni.sanchez@uab.cat (A. Sánchez).

commonly biodegradable since they can decompose quickly and do not negatively impact surface water and groundwater (Abubaker et al., 2015). More importantly, BDB are highly specific towards pests such *Lepidoptera*, *Coleoptera* and *Diptera* (Mnif and Ghribi, 2015), but they are innocuous for plants, animals and human beings (Betz et al., 2000; Rubio-Infante and Moreno-Fierros, 2015).

Traditionally, BDB production has been carried out by means of submerged fermentation (Smitha et al., 2013). These processes are reported to be very expensive to implement, especially considering the downstream (concentration and purification processes (Zhuang et al., 2011) and the costs associated with the culture medium (Tirado et al., 2001; Yezza et al., 2006). As a result, some authors have observed a reduction in the overall production costs by replacing medium ingredients such as peptone, corn extract, yeast extract, potato and carrot by soy flour, or even agroindustrial wastes (Khuzhamshukurov et al., 2001; Yezza et al., 2006).

BDB production through SSF has been consistently reported using different solid substrates such as soy residues (Ballardo et al., 2016), wastewater treatment sludge (Zhuang et al., 2011), kitchen waste (Zhang et al., 2013) and wheat bran (Odeniyi and Adeola, 2017). Most of these studies have been performed under sterile conditions and using few grams of substrate, thus hindering the validation of the processes at a large scale. Nevertheless, authors such as Ballardo et al. (2016) and Cerda et al. (2017) have reported the ability of Bt to survive in SSF processes without temperature control using non-sterilised solid substrates at lab scale.

In this work the main objectives are to assess the scale-up of the production of biopesticides from Bt through SSF. One of the main challenges to develop SSF in current research is precisely to overcome the problems associated to scale-up, especially in terms of oxygen transfer and heat removal. We have proposed several configurations of pilot scale reactors to solve these problems and end up with a ready-to-scale-up process. Simultaneously, a problematic waste such as digestate with several unfavourable characteristics (water excess and lack of nutrients and porosity) has been used as a model to develop successful SSF process at pilot scale. To our knowledge, there is no literature on the production of Bt biopesticides at such scale using digestate as substrate.

2. Materials and methods

2.1. Substrate conditioning

Digestate was kindly provided by an Organic Fraction of Municipal Solid Waste (OFMSW) Treatment Plant (Consorci per a la Gestió de Residus del Vallès Oriental, Granollers, Spain). This material comes from a wet anaerobic digestion process followed by a dewatering stage, where the solid fraction is separated. This solid fraction is the raw material (digestate) used in the SSF processes. Once collected at the waste treatment plant, digestate is stored in a cold chamber at 4 °C for a maximum period of one week until use.

According to EU Regulation 142/2011, digestate must be hygienised for its valorization. In this case, previously to its use in the SSF process, hygienisation consisted of maintaining the material for 1 h at 70 °C, as required in the above mentioned EU regulation. Being a digested material coming from source selected biowaste, the presence of pathogens is supposed to be insignificant. Then, the digestate is let to cool down at room temperature. Shredded pallets wood chips were used as bulking agent. The ratio of digestate and bulking agent used was 1:1 (v:v). The main role of wood chips was to adjust moisture and air filled porosity, hence promoting the correct oxygen transfer through the solid matrix (Ruggieri et al., 2009). However, under SSF conditions biodegradation of wood chips hardly occurs due to the presence of mainly

slowly biodegradable carbon in this material. The main properties of digestate and wood chips are listed in Table 1.

2.2. Inoculum requirements

2.2.1. *Bacillus thuringiensis* strain

B. thuringiensis var. *kurstaky* NRRL HD-73 (CECT 4497) was purchased from Colección Española de Cultivos Tipo (CECT, Valencia, Spain). Bt was maintained in cryovials containing impregnated pearls with the strain at –80 °C.

2.2.2. Inoculum preparation

In order to obtain the necessary amount of inoculum for bench and pilot scale fermentations, several propagation steps had to be followed according to provider's protocol. The first step consisted of the incubation of Bt pearls in 100 mL of nutrient broth (Oxoid, Powder 1%, Peptone 1%, NaCl 0.5%) sterilised at 121 °C for 30 min. The flask was incubated in a rotating shaker (180 rpm) at 30 °C for 20 h. Then, 10 mL of the fermented culture were used as inoculum for 1.1 L of nutrient broth. This step is performed in a 2-L reactor for 20 h at 30 °C with an airflow of 20 mL min⁻¹. Finally, the culture broth was centrifuged at 3500 rpm for 10 min and the solid fraction was used to inoculate the digestate. Approximately 2 g of Bt inoculum (dry weight) were obtained from a 2-L reactor. Optical density, dry matter and cell count values were 3.5 ± 0.3, 1.6 ± 0.2 g L⁻¹ and 2.35 ± 0.04 · 10⁷ CFU mL⁻¹, respectively.

2.3. SSF set up

All fermentation systems were provided with a continuous supply of humidified air by means of an airflow meter (Bronkhorst, Spain) from the bottom of each reactor. The air circulated through the solid matrix from the bottom to the top, where the exhausted gases outlet was located. The gases passed through a water trap to remove the excess of moisture and then to an oxygen sensor (O2A2, Alphasense, UK). Additionally, bench and pilot systems were provided with a temperature probe to measure temperature in the solid matrix. In the case of bench scale insulated reactors, the temperature probe was located in the centre of the reactor at 1/3 of the reactor height (Supplementary information, Fig. 1S). In non-insulated reactor the temperature probe was located next to the stirrer (Supplementary information, Fig. 2S). Finally, in the pilot scale reactor the temperature probe was located at 1/3 of the reactor height in a specific compartment (Supplementary information, Fig. 2S). Temperature and oxygen content data were collected and

Table 1

Characteristics of the digestate and wood chips used in the fermentation processes.

Parameter	Digestate (Average ± standard deviation = 10 ^a)	Wood chips
Moisture Content (% wb)	76 ± 5	11.8
Organic Matter (% db)	63 ± 2	95.3
pH (1:5)	8.3 ± 0.1	–
Particle size (mm)	–	1–5
Carbon (% db)	34 ± 2	–
Nitrogen (% db)	4.3 ± 0.3	0.1
Hydrogen (% db)	2.8 ± 0.2	–
Sulphur (% db)	0.3 ± 0.1	–
C/N ratio	11.8 ± 0.7	500
Hemicellulose (% db)	10.0 ± 0.9	–
Cellulose (% db)	10.4 ± 1.2	–
Lignin (% db)	17.5 ± 1.9	–
Dynamic respirometry index at 24 h (g O ₂ kg ⁻¹ DM h ⁻¹)	1.5 ± 0.3	–

wb: wet basis, db: dry basis, DM: dry matter.

^a n: number of samples analysed.

stored by a self-made software that allowed the on-line monitoring through a data acquisition system based on an Arduino® system. These data were used for the calculation of the oxygen uptake rate (OUR) and cumulative oxygen consumption (COC), as explained below.

2.3.1. Bench scale insulated reactors

A complete description of the reactors can be found elsewhere (Abraham et al., 2013). Briefly, thermally insulated air-tight packed-bed reactors (adapted Dewar® vessels) with a volume of 10-L were used. This system provides near-to-adiabatic conditions, i.e., there is negligible heat exchange with the surroundings, hence allowing to work at non-isothermal conditions (Supplementary information Fig. 1S).

2.3.2. Bench scale non-insulated reactor

A complete description of the reactor can be found in Martínez et al. (2018). Briefly, the reactor consisted on a cylindrical vessel of 22-L provided with a helical stirrer connected to a rotor located on top of the reactor. The reactor also had an inner removable basket to facilitate solids handling during sampling (Supplementary information Fig. 2S).

2.3.3. Pilot scale non-insulated reactor

Experiments at pilot scale were performed in a 100-L non-insulated reactor. The reactor had the same configuration that the 22-L reactor (see point 2.3.3). The main difference consisted in the fact that the 100-L reactor had a removable bottom cover through which the material can be discharged instead of a removable basket (Supplementary information Fig. 3S).

2.3.4. Monitoring parameters

Temperature and oxygen content were monitored during the process. Specific oxygen uptake rate (sOUR) was used to determine the biological activity during the SSF process. sOUR calculations were made according to Ponsá et al. (2010) using Eq. (1):

$$sOUR = \frac{(O_{2,i} - O_{2,0}) \cdot F \cdot 31.98 \cdot 60}{1000^b \cdot 22.4 \cdot DM} \quad (1)$$

where sOUR is the specific oxygen uptake rate ($\text{mg O}_2 \text{ g}^{-1} \text{ DM h}^{-1}$); ($O_{2,i} - O_{2,0}$), the difference in oxygen content between airflow in and out of the reactor at a given time in molar fraction; F, the volumetric airflow measured under normal conditions (1 atm and 273 K); 31.98, the oxygen molecular weight (g mol^{-1}); 22.4, the volume occupied by one mol of ideal gas under normal conditions (L); DM, the dry mass of the substrate under study that is loaded in the reactor (g).

Cumulative oxygen consumption (COC) corresponds to the area below the sOUR curve. COC was calculated according to Eq. (2) (Ponsá et al., 2010):

$$COC = \int_0^t sOUR \cdot dt \quad (2)$$

2.4. Experimental methodology

All fermentations were carried out under non-sterile conditions for 4 days using an initial solid mixture consisting on digestate and bulking agent. Each set of experiments consisted in a control reactor (digestate without Bt inoculation) and a duplicate of digestate inoculated with Bt. In all experiments hygienised digestate was used.

In the experiments at 10-L insulated reactors a ratio of 0.0030 g Bt g^{-1} digestate and a total amount of 3.5 kg of solid

mixture were used. The airflow was manually controlled and ranged between 400 and 800 mL min^{-1} .

In the 22-L non-insulated stirred reactors a total amount of 4 kg of solid mixture was used and inoculated at a ratio of 0.0030 g Bt g^{-1} digestate. The airflow was fixed on a value of 1000 mL min^{-1} with a stirring regime of 12 rpm for 15 min each 24 h. The stirring aimed specifically to reduce compaction of the mixture thus promoting a proper oxygen transfer and to provide an adequate homogenisation of the solid material.

Experiments with 100-L reactors used 20 kg of solid mixture and an inoculum of 0.001 g Bt g^{-1} digestate. The airflow was set at 3000 mL min^{-1} .

Airflow values for each reactor scale were based on previous experience operating the same or similar reactors with different wastes (Mejias et al., 2017).

In all the experiments, sampling of the reactor was performed at 0, 24, 48, 72 and 96 h. Viable cells and spore count, sOUR, respirometric indices and other routine parameters such as moisture, organic matter, pH and electrical conductivity (EC) were measured.

2.5. Analytical methods

2.5.1. Respirometric indices

Dynamic respiration index ($\text{DRI}_{24\text{h}}$) and the cumulative respiration activity after four days (AT_4), were measured (Barrena et al., 2011) in order to evaluate the stability of the final materials (Ponsá et al., 2010). Briefly, a dynamic respirometer was used to determine the oxygen consumption in 100 g of the waste in 0.45-L cylindrical polyvinylchloride packed-bed bioreactors placed in a water bath at 37 °C and fixed airflow of 20 mL min^{-1} .

2.5.2. Sampling method

The amount of sample needed for the analytical monitoring (cells, spores and routine parameters) was 10 g. In insulated and non-insulated reactors, the collected sample was composed of three equal parts taken from the bottom, the middle and the top parts of the reactor. The same procedure was used in the pilot scale reactor, but two additional sampling points were included to obtain the material close to the reactor walls.

2.5.3. Cell and spore count

To determine total cell count (CC), 10 g of solid sample were mixed with 90 mL of Ringer solution (NaCl 0.225%, KCl 0.001%, CaCl_2 0.012%, NaHCO_3 0.005%) in a shaker at 130 rpm for 30 min. 1 mL of the solution was serially diluted with saline solution of NaCl 0.85% (w:v) under sterile conditions. 0.1 mL of the appropriate dilution were plated on nutrient agar plates and incubated at 30 °C for 24 h to allow the development of the colonies. For spore count (SC), a diluted sample was heated at 80 °C for 10 min and then chilled on ice for 5 min. This method allows distinguishing between viable cells and spores of Bt. Then, this solution was also plated in nutrient agar for cell count. All the counts were done in triplicate and results were expressed as colony forming units per mL (CFU mL^{-1}). For enumeration, 30–300 colonies were enumerated per plate (Ballardo et al., 2016). Realpe et al. (2002) described the morphology of different bacilli. In the case of Bt the colonies were reported as 3–8 mm in diameter with an appearance of frosted glass and regular edges (Fig. 4S), which form group is in chains that can be observed macroscopically (Realpe et al., 2002). The sporulation percentage was calculated as the ratio of the final spores to the final colonies in each batch.

2.5.4. Scanning electron microscopy (SEM)

SEM was used (Evo® MA10, Carl Zeiss) to identify the Bt toxin morphologically and to differentiate between cells, spores and

parasporal crystals, as explained later. The spores were not fixed, dehydrated, or dried as described in Smirnova et al. (2013). They were sputter coated with gold (5 nm). Spore samples were placed on a silicon stub, which was mounted on an aluminium stage with conductive adhesive tape. The samples were examined under low and high vacuum at 7–15 kV.

2.5.5. Routine analysis

Routine analysis of pH, water (WC) and organic matter (OM) content were performed according to standard methods (The US Composting Council, 2001). Cellulose, hemicellulose and lignin content were determined according to Van Soest et al. (1991) using the Ankom200 Fiber Analyzer incubator (Ankom Technology, Macedon, NY).

2.5.6. Statistical analysis

A statistical analysis was performed using the Student's *t* test with basic ANOVA techniques with Minitab Software version 15.1. A probability level of $p < 0.05$ was based on the Tukey test was selected to determine statistically significant differences in increments of viable cells and increments of spores, when comparing SSF experiments in all reactors.

3. Results and discussion

To evaluate the feasibility of digestate as substrate to produce BDB, different experiments were proposed at bench scale (10 L and 22 L) and pilot scale (100 L). Insulated and non-insulated agitation reactors were used. The most relevant parameters of SSF are collected in Table 2.

3.1. Bench scale

Fig. 1 shows the overall performance of the fermentation process of digestate inoculated with Bt in a 10-L insulated non-stirred reactor. Table 2 summarizes the initial and final values for the main parameters in the SSF process. At 24 h of fermentation the system presents the highest biological activity measured as the highest sOUR and temperature. These parameters reached values of $7.88 \pm 0.15 \text{ mg O}_2 \text{ g}^{-1} \text{ DM h}^{-1}$ and $68.2 \text{ }^\circ\text{C}$, respectively. The system kept this behaviour for nearly 24 h and decreased until stable conditions.

The cumulative oxygen consumption for four days (COC) was $332 \pm 28.83 \text{ mg O}_2 \text{ g}^{-1} \text{ DM h}^{-1}$. These results are higher than those observed in the control fermentation where sOUR, COC and temperature reached were $4.49 \text{ mg O}_2 \text{ g}^{-1} \text{ DM h}^{-1}$, $190.02 \text{ mg O}_2 \text{ g}^{-1} \text{ DM h}^{-1}$ and $55.82 \text{ }^\circ\text{C}$, respectively. Comparing

sOUR, temperature and COC values in the reactor with Bt and the control reactor, increments of 1.7, 1.2 and 1.7-fold are observed, respectively. These values confirm a higher biological activity in Bt inoculated reactors that can be due to the combine action of the microorganisms existing in the digestate and the inoculated Bt. Thus, in the inoculated reactor, Bt is able to growth and colonize the solid matrix, increasing the temperature and biological activity.

Fig. 1 also shows the evolution of the total cell and spore count during fermentation course. The initial values of viable cells and spores were $2.14 \pm 0.27 \cdot (10^9) \text{ CFU g}^{-1} \text{ DM}$ and $1.98 \pm 0.15 \cdot (10^7) \text{ spores g}^{-1} \text{ DM}$, respectively. Viable cells increase throughout the process, reaching a maximum of $4.69 \pm 0.46 (10^9) \text{ CFU g}^{-1} \text{ DM}$ at 72 h of operation. At the end of the fermentation the value was $4.06 \pm 0.46 (10^9) \text{ CFU g}^{-1} \text{ DM}$, a 1.9 fold increase with respect to the beginning of the process. In contrast, the production of spores began at 24 h showing a faster behaviour, reaching a maximum of $3.41 \pm 0.15 (10^9) \text{ spores g}^{-1} \text{ DM}$ at 48 h with a 171.6-fold increment at the end of the fermentation. The fast spore generation can be a consequence of the stressful conditions on the solid matrix, likely associated to parameters such as the lack of nutrients or the thermophilic conditions achieved (Nicholson et al., 2000). In this context, Yeza et al. (2006) observed high sporulation and low growth of viable cells when low carbohydrate content substrates are used and nitrogen is consumed. These results show that Bt was able to thrive and sporulate under the provided conditions. However, other authors have reported a decrease in Bt viable cells related to a temperature increment in the reactor. This is the case of Ballardo et al. (2016) using soy fibre residue as substrate. In that study, temperatures over $60 \text{ }^\circ\text{C}$ were attained while initial viable cells value was $9.5 (10^7) \text{ CFU g}^{-1} \text{ DM}$ dropping after 20 days of fermentation to $1.1 (10^7) \text{ CFU g}^{-1} \text{ DM}$, representing a nearly 80% decrease. Ballardo et al. (2017) and Zhuang et al. (2011) also observed temperature rises using a highly biodegradable substrate such as the Organic Fraction of Municipal Solid Waste (OFMSW) or sewage sludge, thus losing cell viability.

To overcome the possible effect of temperature increase and to improve matrix homogenisation, a 22-L stirred, non-insulated reactor was used. Agitation was used to improve the organic matrix homogenization and the oxygen transfer rate, as pointed by Luna-Finkler and Finkler (2012). These authors also point out that agitation is useful to remove CO_2 and the metabolic heat produced during the fermentation. The results obtained are presented in Fig. 2 and Table 2. The system showed a rapid start, with a sOUR of $1.72 \pm 0.12 \text{ mg O}_2 \text{ g}^{-1} \text{ DM h}^{-1}$ after 15 h of fermentation. The overall trend of sOUR was stable in values in the range of 1.3 and $1.8 \text{ mg O}_2 \text{ g}^{-1} \text{ DM h}^{-1}$ during the 4 days of operation. sOUR peaks observed in Fig. 2 are related to agitation, associated with an

Table 2
Main parameters in solid-state fermentation process in the different SSF-reactors.

		10-L	22-L	100-L
Initial Moisture	(%, wb)	67.0 ± 0.2	57.2 ± 2.3	60.0 ± 0.6
Final Moisture	(%, wb)	69.9 ± 0.8	60.4 ± 1.1	60.4 ± 1.1
Initial Organic Matter	(%, wb)	75.0 ± 0.5	79.7 ± 0.7	77.8 ± 0.6
Final Organic Matter	(%, wb)	61.0 ± 0.7	67.9 ± 0.5	72.3 ± 0.4
Initial pH (1:5)		8.85 ± 0.01	8.78 ± 0.01	8.67 ± 0.01
Final pH (1:5)		8.76 ± 0.01	8.92 ± 0.01	8.76 ± 0.01
Initial Ec	(mS cm^{-1})	1.92 ± 0.01	2.68 ± 0.01	1.68 ± 0.01
Final Ec	(mS cm^{-1})	2.15 ± 0.01	3.13 ± 0.01	2.10 ± 0.01
sOUR	($\text{mg O}_2 \text{ g}^{-1} \text{ DM h}^{-1}$)	7.88	1.72	0.90
COC	($\text{mg O}_2 \text{ g}^{-1} \text{ DM h}^{-1}$)	332.17	150.24	63.92
Tmax	($^\circ\text{C}$)	68.17	27.43	28.23
Initial Viable Cell	($\text{CFU g}^{-1} \text{ DM}$)	$2.14 \pm 0.27 \cdot (10^9)$	$7.40 \pm 0.76 \cdot (10^9)$	$1.60 \pm 0.34 \cdot (10^9)$
Final Viable Cell	($\text{CFU g}^{-1} \text{ DM}$)	$4.06 \pm 0.70 \cdot (10^9)$	$5.93 \pm 0.26 \cdot (10^9)$	$1.87 \pm 0.21 \cdot (10^9)$
Initial Spore	($\text{spore g}^{-1} \text{ DM}$)	$1.98 \pm 0.15 \cdot (10^7)$	$2.96 \pm 0.59 \cdot (10^9)$	$4.44 \pm 0.12 \cdot (10^8)$
Final Spore	($\text{spore g}^{-1} \text{ DM}$)	$3.40 \pm 0.61 \cdot (10^9)$	$5.72 \pm 0.95 \cdot (10^9)$	$1.67 \pm 0.45 \cdot (10^9)$
Sporulation	(%)	84	97	89

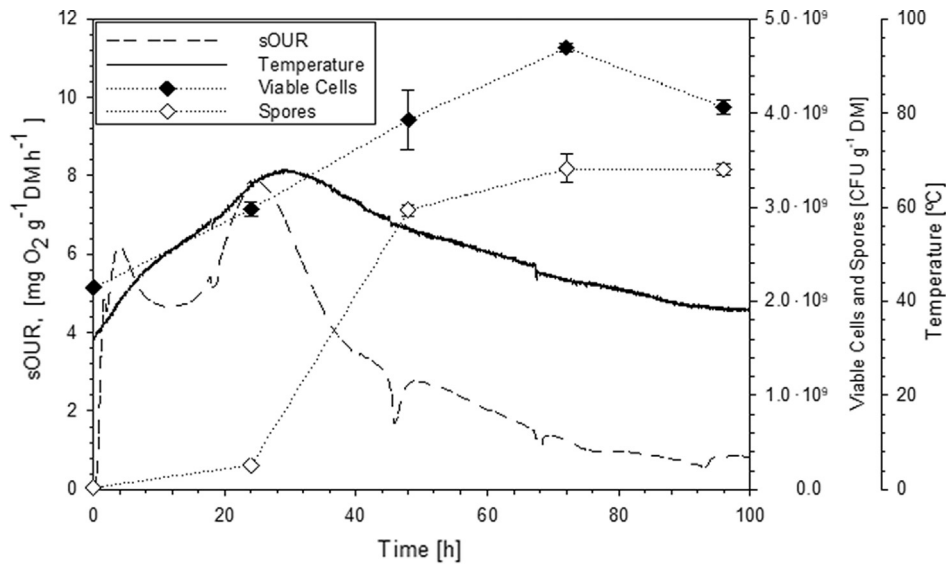


Fig. 1. Average sOUR, temperature, viable cells and spores evolution in SSF of digestate inoculated at 0 h with *Bacillus thuringiensis* under non-sterile conditions in an insulated 10-L reactor.

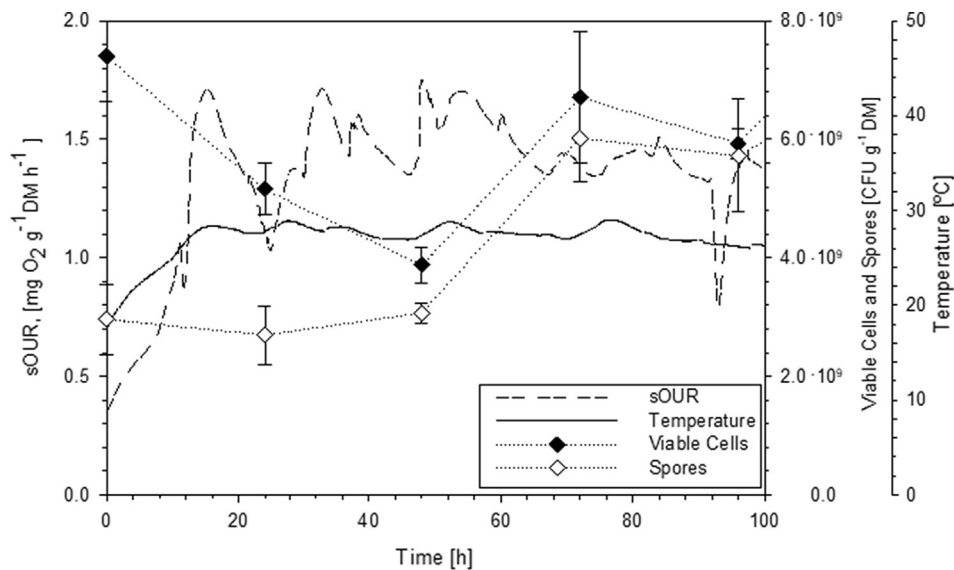


Fig. 2. Average sOUR, temperature, viable cells and spores evolution in SSF of digestate inoculated at 0 h with *Bacillus thuringiensis* under non-sterile conditions in a non-insulated stirred 22-L reactor.

improvement in oxygen transfer in the reactors and mixing the nutrients for microorganisms. Additionally, temperature remained also stable in a value around 27 ± 2 $^{\circ}\text{C}$. The cumulative oxygen consumption for four days (COC) was 150.24 ± 10.45 $\text{mg O}_2 \text{ g}^{-1} \text{ DM h}^{-1}$. These values are higher than those observed in the control fermentation where sOUR, COC and temperature reached were 1.04 $\text{mg O}_2 \text{ g}^{-1} \text{ DM h}^{-1}$, 126.21 $\text{mg O}_2 \text{ g}^{-1} \text{ DM h}^{-1}$, 21.05 ± 1 $^{\circ}\text{C}$. Comparing sOUR, temperature and COC values in the Bt inoculated reactor with the control reactor, 1.6, 1.3 and 1.2-fold increments were observed, respectively.

sOUR, temperature and COC increments (with respect to control reactors) were similar in insulated and non-insulated reactors, although the absolute temperature values and temperature profile were clearly different thus providing diverse environmental conditions in the solid matrix. As there is no heat exchange with the surroundings, fermentation using 10-L insulated reactors provided a temperature gradient throughout the process, generating

mesophilic and thermophilic phases. These conditions can directly affect the moisture content, thus affecting microbial development of both autochthonous microbiome and Bt (Zou et al., 2016; Pandey et al., 2007).

In contrast, non-insulated reactors showed a stable temperature, around 25–30 $^{\circ}\text{C}$, which is the optimum growth temperature for Bt (El-Bendary, 2006). This can be attributed to the head space of the reactor, specifically to the stirring regime provided and the lack of isolation. As pointed above, it is reported that periodical stirring during a certain time is positive to decrease the metabolic overheating in solid matter (Cerdeja et al., 2019).

The initial viable cells and spore values were $7.40 \pm 0.76(10^9)$ $\text{CFU g}^{-1} \text{ DM}$ and $2.96 \pm 0.59(10^9)$ spores $\text{g}^{-1} \text{ DM}$, respectively, as shown in Fig. 2. Viable cells presented a constant decrease during the first 48 h of fermentation. After that moment the content increased reaching stable values until the end of the fermentation. In contrast, spore content remained stable around the initial value

for the first 48 h, after which spore content started increasing. Probably, this is due to the fact that digestate presents a limited amount of nutrients that provokes Bt sporulation in a short time. This is of great importance since sporulation is related to the release of the crystal that has the biopesticidal effect (Bravo et al., 2011). Final values of viable cells and spores were $5.93 \pm 0.26 (10^9)$ CFU g^{-1} DM and $5.72 \pm 0.95 (10^9)$ spores g^{-1} DM, respectively, 0.8 and 1.93-fold increase respect to initial counts. If these values are compared to those obtained in 10 L insulated reactors, it can be hypothesized that the higher temperatures attained contribute to a greater increase in spore counts (169.7 times higher than in non-insulated).

Spore count has been used as an indicator of BDB production, as the Bt toxin has been associated to the sporulation process (Tirado et al., 2001). Several authors have developed processes for BDB production, with spore counts ranging from 10^7 to 10^{10} at lab conditions using highly biodegradable substrates such as wheat bran or OFMSW, among others (Patil et al., 2013; Zou et al., 2016; Ballardo et al., 2017). In this sense, the results obtained in the present work are in the middle range of the values reported in scientific literature. However, it must be considered that the conditions were not sterile, so competition with other microorganisms has been a challenge. In addition, a poorer biodegradable substrate, digestate, was used and processed in higher scale reactors.

In the insulated reactor the temperature remained in the mesophilic range for 2.5 days, exceeding 60°C between 20 and 42 h from the beginning of the fermentation process, which can help creating adequate conditions for sporulation. Some authors have studied the effect of temperature on Bt growth observing that temperatures higher than 60°C benefit the sporulation process, thus the BDB production. In contrast, the BDB produced, showed less toxic effect on plagues when compared with BDB produced under more favourable conditions (Zhuang et al., 2011).

To the best of the authors' knowledge, this is the first attempt of producing BDB using this reactor configuration, therefore a comparison with other studies can only be given as referential. The most relevant parameters in large scale SSF are the temperature gradient through the solid matrix, evaporation, aeration control, and local pH changes (Singhania et al., 2009).

In general, insulated reactors showed appropriate conditions for Bt colonization, sporulation and, more importantly, for BDB production, leading to a sporulation of 84% (related to final viable

cells). On the other hand, working with non-insulated reactors allowed to provide favourable conditions for BDB production, achieving a sporulation of 97%. However, by increasing reactor scale in adiabatic conditions, maximum temperature reached can be higher as well as the time during which it is maintained. This fact can have undesirable effects on the growth of Bt. Thus, a non-insulated reactor was chosen for further scale up.

3.2. Scale up

In order to assess the upscaling of the process developed in the 22-L reactor, an experiment was performed in a 100-L reactor. The results obtained are shown in Fig. 3 and the main SSF process parameters' values summarized in Table 2.

sOUR trend was different to that observed in 22-L reactors, as the system only achieved a maximum sOUR of $0.90 \pm 0.23 \text{ mg O}_2 g^{-1} \text{ DM h}^{-1}$ at 24 h of operation. After that period, sOUR decreased to values between 0.60 and $0.8 \text{ mg O}_2 g^{-1} \text{ DM h}^{-1}$. Average temperature achieved in the system was $28 \pm 2^\circ\text{C}$, similar to the values observed in the 22 L reactor. The cumulative oxygen consumption for four days (COC) was $63.92 \pm 6.34 \text{ mg O}_2 g^{-1} \text{ DM h}^{-1}$. In this case, the inoculated fermentation showed no significant differences to the control, as maximum temperature and sOUR values were $26 \pm 1^\circ\text{C}$ and $0.86 \text{ mg O}_2 g^{-1} \text{ DM h}^{-1}$, respectively. The increase of values of sOUR, temperature and COC in relation to the control were 1.05, 1.08 and 0.71 respectively. As in the 22-L reactor, there was a sOUR increase after the stirring period, accompanied by the corresponding slight temperature increase. Additionally, it was observed that sOUR in control fermentations (22-L and 100-L) were lower than the obtained in the inoculated fermentations. The maximum temperatures in the 100-L reactor, both in those inoculated with Bt and in the control, were slightly higher than those obtained in the 22-L reactor.

The initial viable cells and spore values were $1.60 \pm 0.34(10^9)$ CFU g^{-1} DM and $4.44 \pm 0.12(10^8)$ spores g^{-1} DM, respectively. Viable cells decreased slightly during the first 24 h, subsequently increasing to the initial value by the end of the fermentation ($1.87 \pm 0.21(10^9)$ CFU g^{-1} DM). Meanwhile, spore counts consistently increased until the end of the fermentation, achieving average values of $1.67 \pm 0.45(10^9)$ spores g^{-1} DM. Increments of colonies and spores at the end of the fermentation of 1.2 and 3.8-fold, respectively were obtained compared with the initial

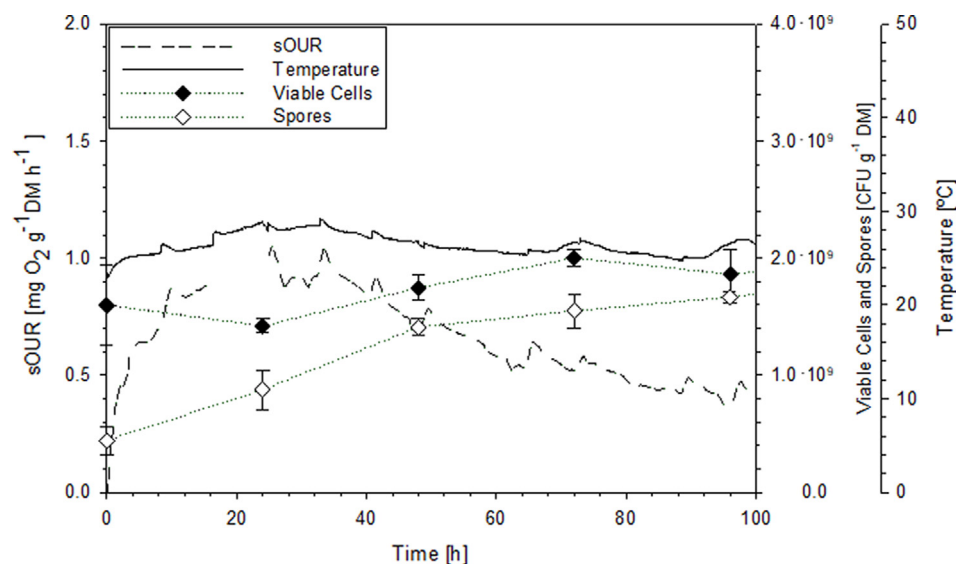


Fig. 3. Average sOUR, temperature, viable cells and spores evolution in SSF of digestate inoculated at 0 h with *Bacillus thuringiensis* under non-sterile conditions in a non-insulated stirred 100-L reactor.

values. Spore production values are similar to those reported by El-Bendary (2006) when working in trays reactors with sugar beet wastes and Zhang et al. (2013) working with kitchen waste and obtaining values in the range of 10^9 spore g^{-1} DM.

A comparative between Bt production in different reactors (10-L, 22-L and 100-L) is shown in Fig. 4. Increments of viable cells were similar in the 10-L insulated reactor and the 100-L non-insulated reactor whereas the increases of spores at the end of the fermentation were higher in the insulated reactor.

Summarizing, increasing the amount of mass in the reactor (100-L) did produce a substantial increase in spore content, when compared with the 22-L reactor. The results obtained at 100-L scale showed that the proposed bioprocess for BDB production is technically feasible using non-sterile digestate as a sole substrate. Moreover, the production values are in the range of the reported in literature, showing a slight decrease in the sporulation ratio when performing the scaling up (97% in 22-L reactor and 89% in 100-L reactor) (Table 2). Other authors have reported a significant scale effect, when increasing the amount of substrate from 35 to 40 kg observing an almost negligible BDB production (reduction of 99%) (Zhang et al., 2013). The difference with this research was the addition of daily agitation in the reactor to improve the transfer of oxygen and nutrients to produce BDB, one of the problems associated with process scaling.

Fig. 5 presents SEM (Scanning Electron Microscopy) images of Bt cell, spores and toxin crystals. Images in Fig. 5 show the material at the end of the SSF process. Fig. 5a shows viable cells and spores. Size was used to differentiate them. As reported in the literature by Iriarte and Caballero (2001) Bt cells were 3 to 5 μm long and 1 to 1.2 μm wide, In this work, size of Bt cells produced in the SSF with digestate was 3.26 μm length and 1.19 μm width. In Fig. 5b some spores are circled presenting similar sizes (1.64 μm length and 0.54 μm width) than those measured by Smitha et al. (2013) also in a SSF process, with values ranging from 0.7 to 2.0 μm length and from 0.6 to 1 μm width. However, the toxicity of Bt lies in the formation of the parasporal crystal. As explained by Nair et al. (2018) Bt produces bipyramidal and cuboidal crystals as can be observed in Fig. 5c where these crystals have been also circled.

Generally, the presence of bipyramidal crystals is associated with active strains against lepidoptera (Enger et al., 2018). The size of the crystal was 1.8 μm length and 0.8 μm width, in the range

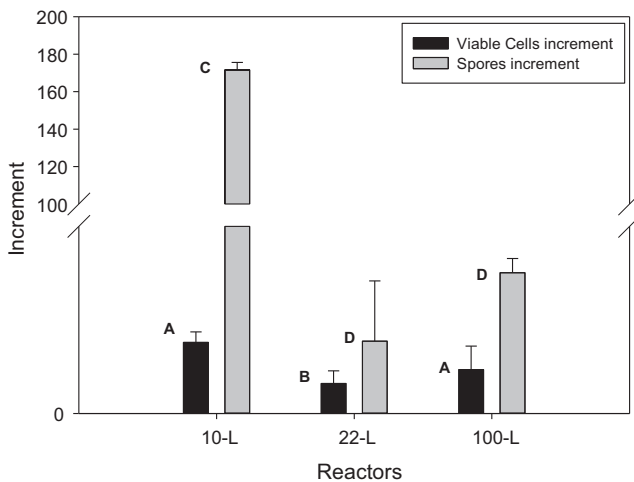


Fig. 4. Increment of viable cells and spores at the end of SSF process in the different reactors. Different capital letters indicate significant differences between values obtained ($p < 0.05$).

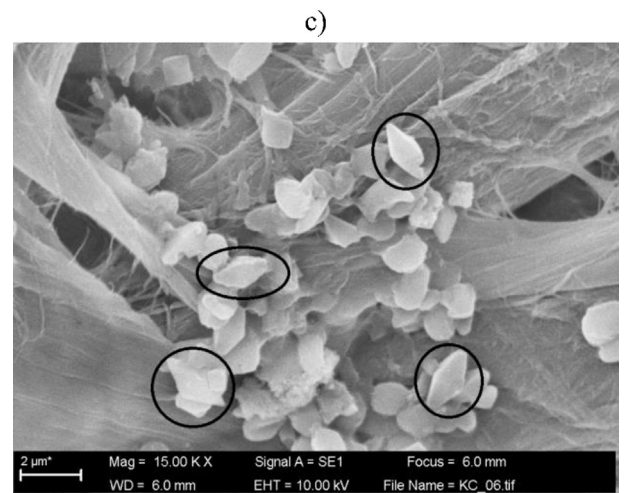
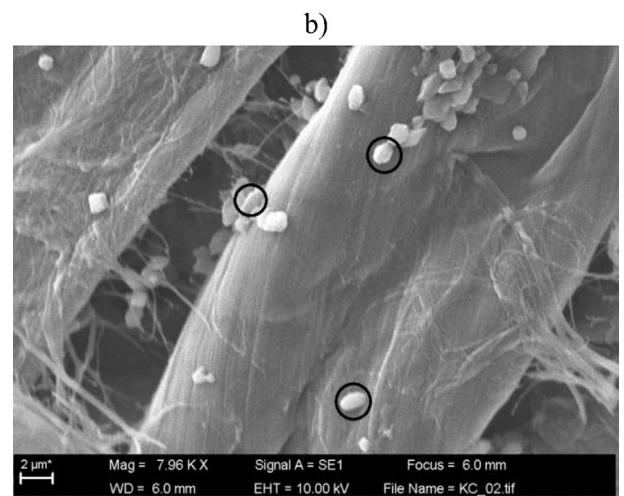
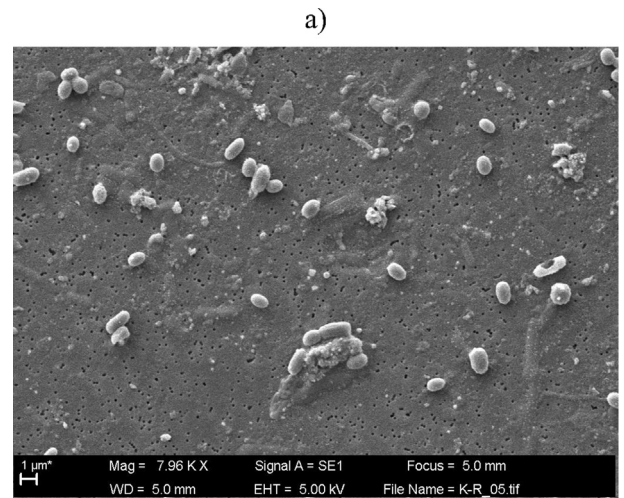


Fig. 5. SEM images of viable cells, spores and parasporal Bt crystal in digestate at the end of the SSF process. (a) Viable cells and spores (b) Spores (c) Parasporal Bt crystal.

described by Caballero et al. (2001), from 350 nm to 2 μm length. Zhuang et al. (2011) associated the size of parasporal crystal with its entomotoxicity. In this sense, the crystals obtained are in the upper size range.

4. Conclusions

Digestate was used as raw material to produce an organic amendment with biopesticide potential through SSF using Btk under non-sterile conditions. Two types of reactors were tested: insulated reactor and non-insulated with agitation. In both cases, Bt was able to colonize and sporulate, obtaining a final product from digestate with biopesticide content. The final percentages of Bt sporulation were over 84% in the 10-L, reaching 97% in the 22-L reactor. In all cases, the final count of viable cells was over 10^9 CFU g^{-1} DM.

The process was scaled up to 100-L packed bed non-insulated and stirred reactor observing a sporulation of (89%) with a spore growth 3 times higher than the initial, showing BDB productions comparable to those reported by other authors.

These results showed that *Bacillus thuringiensis* biopesticides production from biowaste digestate is feasible and that high production levels can be obtained at different scales and under different operational conditions. These findings also highlight the importance of the proper reactor selection when scaling up a SSF process.

Acknowledgements

This work was supported by the Horizon 2020 Programme (project DECISIVE) under grant agreement No. 689229. Authors thank Consorci per a la Gestió dels Residus del Vallès Oriental, for providing the digestate.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2019.05.026>.

References

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. *Biochem. Eng. J.* 74, 15–19.

Abubaker, A., Mohamed, I., Abdalla, F., Adam, M., Abdelkreim, M., Gammareldain, A., 2015. Analysis of soil NPK, pH and electrical conductivity at Adham area- renk, upper Nile state. *Int. J. Sien. Tech. Res.* 4 (12), 341–347.

Ballardo, C., Abraham, J., Barrera, R., Artola, A., Gea, T., Sánchez, A., 2016. Valorization of soy waste through SSF for the production of compost enriched with *Bacillus thuringiensis* with biopesticide properties. *J. Environ. Manage.* 169, 126–131.

Ballardo, C., Barrera, R., Artola, A., Sánchez, A., 2017. A novel strategy for producing compost with enhanced biopesticide properties through solid-state fermentation of biowaste and inoculation with *Bacillus thuringiensis*. *Waste Manage.* 70, 53–58.

Barrera, R., Gea, T., Ponsá, S., Ruggieri, L., Artola, A., Font, X., Sánchez, A., 2011. Categorizing raw organic material biodegradability via respiration activity measurement: a review. *Compost Sci. Util.* 19 (2), 105–113.

Betz, F.S., Hammond, B.G., Fuchs, R.L., 2000. Safety and Advantages of *Bacillus thuringiensis*-Protected Plants to Control Insect Pests. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 32, 156–173.

Botton, V., Piován, L., Meier, H.F., Mitchell, D.A., Cordova, J., Krieger, N., 2018. Optimization of biodiesel synthesis by esterification using a fermented solid produced by *Rhizopus microsporus* on sugarcane bagasse. *Bioprocess Biosyst. Eng.* 41 (4), 573–583.

Bravo, A., Likitvivanavong, S., Gill, S.S., Soberon, M., 2011. *Bacillus thuringiensis*: a story of a successful bioinsecticide. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 41 (7), 423–431.

Cerda, A., Mejias, L., Gea, T., Sanchez, A., 2017. Cellulase and xylanase production at pilot scale by solid-state fermentation from coffee husk using specialized consortia: the consistency of the process and the microbial communities involved. *Biores. Technol.* 243, 1059–1068.

Cerda, A., Mejias, L., Rodríguez, P., Rodríguez, A., Artola, A., Font, X., Gea, T., Sánchez, A., 2019. Valorisation of digestate from biowaste through solid-state fermentation to obtain value added bioproducts: a first approach. *Bior. Technol.* 271, 409–416.

Cerdà, A., Rodrigo-comino, J., Giménez-morera, A., Keesstra, S.D., 2017. An economic, perception and biophysical approach to the use of oat straw as mulch in Mediterranean rainfed agriculture land. *Ecol. Eng.* 108, 162–171.

El-Bendary, M.A., 2006. *Bacillus Thuringiensis* and *Bacillus Sphaericus* biopesticides production. *J. Basic. Microb.* 46 (2), 158–170.

Enger, K.S., Mitchell, J., Murali, B., Birdsell, D.N., Keim, P., Gurian, P.L., Wagner, D.M., 2018. Evaluating the long-term persistence of *Bacillus* spores on common surfaces. *Microb. Biotechnol.* 11 (6), 1048–1059.

Iriarte, J., Caballero, P., 2001. Biología y ecología de *Bacillus thuringiensis*. In: *Bioinsecticidas: fundamentos y aplicaciones de Bacillus thuringiensis en el control integrado de plagas*. Servicio de Publicaciones de la Universidad Pública de Navarra, pp. 15–44.

Jiménez-Peñalver, P., Gea, T., Sánchez, A., Font, X., 2016. Production of sophorolipids from winterization oil cake by solid-state fermentation : optimization, monitoring and effect of mixing. *Biochem. Eng.* 115, 93–100.

Khuzhamshukurov, N.A., Yusupov, T.Y., Khalilov, I.M., Guzalova, A.G., Muradov, M. M., Davranov, K.D., 2001. The insecticidal activity of *Bacillus thuringiensis* cells. *Prikl. Biokhim. Mikrobiol.* 37 (6), 698–701.

Kumar, K.K., Sridhar, J., Murali-Baskaran, R.K., Senthil-Nathan, S., Kaushal, P., Dara, S. K., Arthurs, S., 2018. Microbial biopesticides for insect pest management in India: current status and future prospects. *J. Inver. Path.* <https://doi.org/10.1016/j.jip.2018.10.008>.

Lin, L., Yang, L., Xu, F., Michel, F.C., Li, Y., 2014. Comparison of solid-state anaerobic digestion and composting of yard trimmings with effluent from liquid anaerobic digestion. *Biores. Technol.* 169, 439–446.

Luna-Finkler, C.L., Finkler, L., 2012. *Bacillus sphaericus* and *Bacillus thuringiensis* to Insect Control: Process Development of Small Scale Production to Pilot-Plant-Fermenters. In: *Insecticides – Advances in Integrated Pest Management, Chapter 27*.

Martínez, O., Sánchez, A., Font, X., Barrera, R., 2017. Valorization of sugarcane bagasse and sugar beet molasses using *Kluyveromyces marxianus* for producing value-added aroma compounds via solid-state fermentation. *J. Clean. Prod.* 158, 8–17.

Martínez, O., Sánchez, A., Font, X., Barrera, R., 2018. Enhancing the bioproduction of value-added aroma compounds via solid-state fermentation of sugarcane bagasse and sugar beet molasses: operational strategies and scaling-up of the process. *Bioresour. Technol.* 263, 136–144.

Mejias, L., Komilis, D., Gea, T., Sánchez, A., 2017. The effect of airflow rates and aeration mode on the respiration activity of four organic wastes: implications on the composting process. *Waste Manage.* 65, 22–28.

Mnif, I., Ghribi, D., 2015. Potential of bacterial derived biopesticides in pest management. *Crop Prot.* 77, 52–64.

Nair, K., Al-Thani, R., Al-Thani, D., Al-Yafei, F., Ahmed, T., Jaoua, S., 2018. Diversity of *Bacillus thuringiensis* strains from Qatar as shown by crystal morphology, d-endotoxins and cry gene content. *Front. Microbiol.* 9, 708.

Nicholson, W.L., Munakata, N., Horneck, G., Melosh, H.J., Peter, S., 2000. Resistance of *Bacillus* endospores to extreme terrestrial and extraterrestrial environments. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 64 (3), 548–572.

Odeniyi, O.A., Adeola, O.J., 2017. Production and characterization of polyhydroxyalkanoic acid from *Bacillus thuringiensis* using different carbon substrates. *Int. J. Biol. Macromol.* 104, 407–413.

Pandey, A., 2003. Solid-state fermentation. *Biochem. Eng. J.* 13, 81–84.

Pandey, A., Soccol, C.R., Larroche, C., 2007. *Current Developments in Solid-State Fermentation*. Springer Science/Asiatech Publishers Inc, New York, USA/New Delhi, India, pp. 13–25.

Parnell, J.J., Berka, R., Young, H.A., Sturino, J.M., Kang, Y., Barnhart, D.M., DiLeo, M.V., 2016. From the lab to the farm: an industrial perspective of plant beneficial microorganisms. *Front. Plant Sci.* 7, 1110.

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*. *Biores. Technol.* 131, 545–547.

Ponsá, S., Gea, T., Sánchez, A., 2010. The effect of storage and mechanical pretreatment on the biological stability of municipal solid wastes. *Waste Manage.* 30, 441–445.

Realpe, M.E., Hernández, C.A., Agudelo, C.I., 2002. Especies del género *Bacillus*: morfología macroscópica y microscópica. *Rev. Biomed.* 22 (2), 106–109.

Rubio-Infante, N., Moreno-Fierros, L., 2015. An overview of the safety and biological effects of *Bacillus thuringiensis* Cry toxins in mammals. *J. Appl. Toxicol.* 36 (5), 630–648.

Ruggieri, L., Gea, T., Artola, A., Sánchez, A., 2009. Influence of different cosubstrates biochemical composition on raw sludge co-composting. *Biodegradation* 19 (3), 403–415.

Singhania, R.R., Patel, A.K., Soccol, C.R., Pandey, A., 2009. Recent advances in solid-state fermentation. *Biochem. Eng.* 44, 13–18.

Smirnova, T.A., Zubasheva, M.V., Shevlyagina, N.V., Nikolaenko, M.A., Azizbekyan, R. R., 2013. Electron microscopy of the surfaces of *Bacillus* spores. *Microb.* 82 (6), 713–720.

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.

Test Methods for the Examination of Composting and Compost, 2001. The US Department of Agriculture and The US Composting Council, Edaphos International, Houston, USA.

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 Res.* 35 (16), 3807–3816.

Van Soest, P., Robertson, J., Lewis, B., 1991. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and non starch polysaccharides in relation to animal nutrition. *J. Dairy Sci.* 74 (10), 3583–3597.

- 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. *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., Xu, R., 2011. Cost-effective production of *Bacillus thuringiensis* biopesticides by solid-state fermentation using wastewater sludge: effects of heavy metals. *Biores. Technol.* 102, 4820–4826.
- Zou, H., Ding, S., Zhang, W., Yao, J., Jang, L., Liang, J., 2016. Study on influence factors in *Bacillus thuringiensis* production by semi-solid state fermentation using food waste. *Procedia Environ. Sci.* 31, 127–135.

