

“Valorización de los desechos blandos del proceso de concha de abanico mediante la producción biotecnológica de hidrolizado enriquecido con microorganismos caracterizados molecularmente y benéficos para aplicaciones agropecuarias y ambientales”

Luis LÓPEZ-LUNA¹, Benoit DIRINGER², Fredy FABIÁN¹, Lourdes ROJAS³, Vanessa BAYLON³, Carlos CONDEMARIN^{1,2}, Stalyn CORDOVA³, Cesar MOGOLLÓN¹, Segundo ASTUDILLO³, Jimmy LÓPEZ³, Tatiana TORIBIO³, Melitza CORNEJO¹, Candy LUCERO⁴, Enedia VIEYRA-PEÑA³, y Eric MIALHE².

(1) INNOVATE-PERÚ (PVE-1-P-151-15), (2) INCABIOTEC SAC, (3) UNIVERSIDAD NACIONAL DE TUMBES y (4) FIEST & RIVA SRL.

Resumen:

El correcto manejo de los residuos del procesamiento de la concha de abanico es un desafío ambiental, social y económico para la industria acuícola Peruana. Los subproductos orgánicos pueden ser valorizados a partir de un proceso de hidrolizado biológico de concha de abanico (HIBIOCA) que ha mostrado aplicaciones agropecuarias y acuícolas interesantes. Con el afán de incrementar su valor agregado, se desarrolló formulaciones de HIBIOCA potenciadas con microorganismo nativos benéficos aislados de diferentes sectores de producción peruana. Las formulaciones desarrolladas integraron consorcios microbianos con acciones 1) promotores de crecimiento y prevención de enfermedades para la agricultura (Arroz, Uva), 2) sustitución de alimento y promotores de crecimiento en especies pecuarias (Cerdos y Pollos) 3) actividad celulolítica para el compostaje del bagazo de caña de azúcar y la cascarilla de arroz, y 4) aplicación en biorremediación de cianuro en aguas y suelos contaminados por la actividad minera aurífera.

Palabras claves: HIBIOCA, microorganismos, consorcios, formulaciones, valorización, subproductos.

Introducción:

Los diversos tipos de transformaciones de producción de pesca y acuicultura generan cantidades considerables de desechos hidrobiológicos que se recuperan parcialmente sobre la base de procesos simples de secado o, más generalmente, se eliminan en ambientes naturales terrestres o acuáticos generando serios problemas de contaminación ambiental.

La conciencia mundial sobre la protección del medio ambiente, la presión del consumidor y las regulaciones internacionales, los avances significativos en microbiología molecular y biotecnología conducen conjuntamente a la consideración de los desechos biológicos, agrícolas, pesqueros y acuícolas como fuentes valiosas de material orgánico que se pueden valorar para aplicaciones diversas en función de

los niveles tecnológicos que se pueden implementar.

Procesos biotecnológicos muy avanzados permiten la caracterización, extracción y purificación de moléculas de alto valor para los sectores farmacéutico, cosmético o nutricional (Wang *et al.*, 2019, Shavandi *et al.*, 2019, Suleria *et al.*, 2016).

Procesos biotecnológicos más simples, esencialmente microbiológicos con análisis moleculares para aislar, identificar, domesticar y controlar cepas microbianas, son más frecuentes en el campo del procesamiento de desechos biológicos, agrícolas, pesqueros y acuícolas con miras a su valorización como productos para los sectores agrícolas y para la biorremediación.

El presente proyecto de innovación concierne la validación de formulaciones basadas en un hidrolizado microbiológico de residuos de

concha de abanico enriquecido con bacterias probióticas de diversos tipos según las aplicaciones consideradas correspondientes al cultivo de arroz o vid, biocontrol de nematodos fitopatógenos, compostaje de residuos de la producción de arroz o caña de azúcar, y biorremediación de agua o suelo contaminado con cianuro en relación con la minería (Proyecto N° 140 - FIDECOM - INNOVATE PERÚ - PVE – 2016 - “Validación de formulaciones de hidrolizado microbiológico controlado de desechos blandos del proceso de concha de abanico, como componentes de biofertilizantes, biocompostajes, biorremediadores o como aditivos de alimentos para especies pecuarias”).

Metodología:

El cultivo masivo de las cepas que conformaron los diversos consorcios fueron optimizados cepa por cepa con medios preparados a partir de hidrolizado biológico de concha de abanico (HIBIOCA-(117-FINCYT-FIDECOM-PIPEI-2013)) a diferentes concentraciones (1, 2, 5, 10 y 15 %); como referencias se usaron los medios clásicos de microbiología.

La evaluación de la multiplicación considera conteos microbiológicos correlacionados con densidades ópticas, evaluando siempre parámetros como pH, oxígeno, temperatura y salinidad; los cultivos estandarizados fueron utilizados como "starters" a concentraciones diferentes en las diversas presentaciones de los HIBIOCAs enriquecidos (arroz, uva, nematicida, pollos, cerdos, bioinoculantes para compostaje y degradador de cianuro).

La aplicación del consorcio HIBIOCA-Arroz (*Bacillus megaterium*, *B. amyloliquefaciens*, *B. pumilus*, *B. aryabhatai*) se desarrolló en invernadero y campo definitivo donde se realizaron 4 tratamientos (T1: HIBIOCA 5%, T2: HIBIOCA 5% + consorcio bacteriano, T3: HIBIOCA 5% + ALGA 5% y T4: HIBIOCA 100%), un testigo control positivo (T5:

Fertilizante químico) y uno negativo (T6: Sin fertilización); todo se desarrolló en condiciones estándares de manejo agronómico y se utilizó un diseño de bloques al azar con tres repeticiones.

El consorcio HIBIOCA-Uva (*Pseudomonas spp.* PV1 y PV2 y *Bacillus sp.* BV1) fue aplicado en 90 plantas de uva de variedad Salt Creek como patrón y variedad Crimpson como injerto. Se consideró que las plantas estén lo más uniforme posible para el desarrollo del ensayo. El diseño experimental se desarrolló con 9 tratamientos usando 10 plantas por tratamiento detallados como T1 (control), T2, T3, T4 y T5 se aplicó 50 ml de HIBIOCA al 1%; T6, T7, T8 y T9 se aplicó 50 ml HIBIOCA más el consorcio de microorganismos. Las frecuencias de aplicación se consideraron que T2 y T6 sea aplicado una sola vez; T3 y T7 cada mes; T4 y T8 cada 15 días; T5 y T9 cada semana. Para el control sólo se agregó agua y nutrientes cada semana así como en los demás tratamientos.

Los ensayos para evaluar el efecto de HIBIOCA Nematicida (*Pseudomonas spp.* PN1 y PN2 y *Bacillus sp.* BN1) se realizaron a partir de los huevos de *Meloidogyne javanica* provenientes de las raíces de los plantones de uva, que fueron seleccionados para los tratamientos. Los huevos fueron sometidos a una eclosión inducida para obtener Juveniles infectivos viables frescos, los cuales fueron inoculados con las cepas bacterianas. Se tomó como variable para la prueba de antagonismo, el tiempo de muerte de los Juveniles infectivos a las 72 horas de exposición a las cepas.

HIBIOCA Pollos (*Enterococcus faecium*, *Pediococcus pentosaceus* y *Weissella sp.*,) se aplicó en 2 grupos experimentales con 100 pollos de engorde en etapa de inicio, grupo I, (consorcio bacteriano 1.2×10^9 UFC/ml) conformado por 80 pollos y grupo control (suero fisiológico NaCl 0.9 %); formado por 20 pollos, la administración de bacterias probióticas fue durante 15 días, la

dosis fue de 0.5 ml durante los 7 primeros días, luego la dosis fue de 2 ml del día 8 al 15, al final se evaluó la ganancia de peso.

HIBIOCA Cerdos (*Lactobacillus farciminis*, *L. plantarum*, *Pediococcus pentosaceus*, *L. brevis*, *L. johnsonii* y *Weissella sp.*) se aplicó a 48 cerdos en la última semana de la etapa de lactancia y 7 días después del destete, se formaron 3 tratamientos de 12 cerdos cada uno, y un grupo control con la misma cantidad, al grupo I se le aplicó una concentración = 1.5×10^8 UFC/ml, al grupo II (3×10^8 UFC/ml), el grupo III (4.5×10^8 UFC/ml) y el grupo control (suero fisiológico NaCl 0.9 %). Por otra parte, se evaluó a HIBIOCA Cerdo como sustituto parcial del alimento en la dieta nutricional de los porcinos a diferentes etapas de cría.

En el proceso de biocompostaje, el HIBIOCA Cascarilla-arroz (*Enterobacter cloacae*, *Pantoea dispersa* S1 y S2 y las cepas B.sp21 y B.sp24) y el HIBIOCA bagazo (*Enterobacter sp.* E. kabei., *Klesiella sp.*, *Kosakonia cowanii*, *Pantoea sp.*, *P. dispersa*, *Bacillus niacini*, y *B. subtilis*) fue empleado como fuente de nitrógeno para la estabilización de microorganismos nativos del proceso de compostaje, y como medio de masificación de microorganismos seleccionados su capacidad de degradar la celulosa, principal constituyente de la materia prima a compostar. Estos últimos fueron incorporados al inicio y posteriormente a través de irrigación esporádica como estrategia de bioaumentación.

El HIBIOCA Cianuro (*Pseudomonas sp* C1) enriquecido con una cepa degradadora del cianuro se aplicó en diferentes porcentajes (5, 10 y 20 %) en concentraciones de 10^6 a 10^8 UFC/ml con única aplicación para la degradación de cianuro y derivados tóxicos en suelos y aguas. Las evaluaciones preliminares fueron realizadas en laboratorio. Los mejores resultados fueron extrapolados *in situ* en suelos y aguas contaminadas por actividades mineras. Se

monitoreo la evolución de los parámetros ambientales, la evolución de la degradación de cianuro, y la evolución de la microbiota nativa en los ambientes tratados.

Resultados:

HIBIOCA-Arroz

La formulación de HIBIOCA específica para el cultivo de arroz permitió obtener mayores crecimiento radicular y foliar (+68%) y un mayor número de hojas (+33%) que el tratamiento control T6 en base a un protocolo de aplicación de 0.4L/Ha con 4 aplicaciones por ciclo. La aplicación del HIBIOCA puro (T4) o al 5% con el consorcio mostró ser un buen sustituto del fertilizante químico comercial.



Fig.1 Medición de las plántulas de arroz a los 14 días.

HIBIOCA-Uva

La formulación de HIBIOCA específica para el cultivo de plántulas de vid permitió un aumento elevado del crecimiento de la planta (310%), pero no demostró un efecto significativo en el número de hojas y tamaño de la raíz, con una aplicación semanal de 0.5ml/plántula.

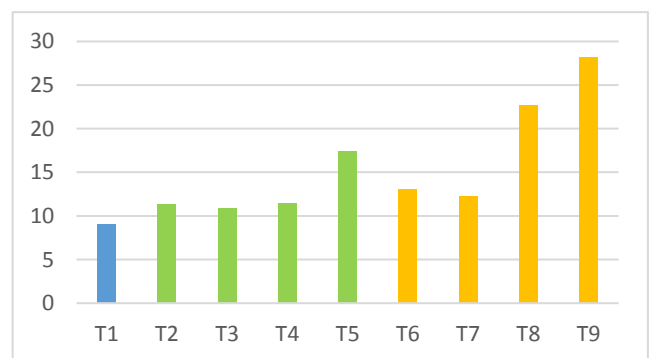


Fig.2 Tasas de crecimiento en % de plántulas de vid sometidas a diferentes tratamientos después de 60 días.

HIBIOCA-Nematicida.

Los tres consorcios bacterianos masificados en HIBIOCA mostraron efecto inhibitor del 100 % en los nematodos cuando se aplicaron al 1 %. Además se observó una reducción de los números de agallas (36%), huevos (20%) y juveniles J2 (35%) con una aplicación mensual de 0.5ml/plántula.

HIBIOCA-Pollos.

La formulación específica para la crianza de pollos está enriquecida con cepas nativas probióticas reductoras de efectos negativos causados por *Eimeria spp.*, principal coccidia causante de pérdidas e la producción avícola. Su aplicación no ha conducido a diferencia significativa en peso, siendo la dosis de 1ml/L de agua de bebida.



Fig.3 Pollitos tomando agua suplementada con HIBIOCA pollo.

Por otra parte, El HIBIOCA Pollo demostró ser un buen sustituto a la alimentación de pollo pudiendo ser incluido hasta el 15%.

HIBIOCA-Cerdos.

La aplicación de HIBIOCA cerdos a dosis de 1ml/día durante 4 días antes y 7 días después del destete para los lechones en periodo de destete permitió una ganancia de peso significativamente superior al control (+20%) además de la ausencia de síntomas de signos entéricos (diarrea) y alergia.



Fig.4 Inoculación de la solución de HIBIOCA cerdo en lechones en periodo de destete.

El HIBIOCA Cerdo demostró igualmente ser un excelente sustituto de alimento balanceado, pudiendo reemplazar hasta el 75% de la dieta en marranas, el 50% en porcinos de engorde, y el 10% en lechones destetados sin generar problemas gastroentéricos o alergias.

HIBIOCA-Bagazo de caña de azúcar

La formulación de HIBIOCA específica para el compostaje del bagazo de caña de azúcar, enriquecida con cepas celulolíticas aceleró el proceso de descomposición con un incremento significativo de ácidos orgánicos, siendo una dosis de 500ml de HIBIOCA por tonelada en pilas de 190 toneladas. Los análisis metagenómicos indicaron que la madurez del compostaje se alcanzaba a los 60 días y que estaba relacionada con una mayor diversidad microbiana.

HIBIOCA-Cascara de arroz

La aplicación de 1.5L de la formulación de HIBIOCA específica para el compostaje de la cascara de arroz enriquecida con cepas celulolíticas aceleró por un factor 2 el proceso de descomposición de este residuo considerado recalcitrante y entonces difícil de valorizar.



Fig.5 Evaluación a nivel laboratorio de diferentes dosis de HIBIOCA-cascara de arroz para la descomposición de cascarillas de arroz.

HIBIOCA- Cianuro.

La formulación de HIBIOCA específica para la biorremediación de aguas y suelos contaminados por cianuro fue enriquecida con una cepa nativa de *Pseudomonas sp C1* cuya efectividad para la degradación del cianuro ha sido previamente establecida (PIPEI-7-P-286-073-13). La desaparición del cianuro debe ser controlada periódicamente y fue máxima con la aplicación de HIBIOCA-Suelo/agua-cianuro de 30ml por m³ de agua y de 500ml por m² de suelos (de preferencia por micro aspersión).



Fig.6 Evaluación del tratamiento de suelos contaminados con cianuro con HIBIOCA-cianuro.

Conclusiones:

Este proyecto ha permitido crear una alternativa a las descargas en el medio ambiente de desechos de concha de abanico con la producción de hidrolizado microbiológico (HIBIOCA) y de formulaciones enriquecidas que condujeron a la

obtención de 9 protocolos de producción y de aplicación de productos derivados denominados respectivamente; HIBIOCA Arroz, HIBIOCA Vid, HIBIOCA Nematicida, HIBIOCA Pollo, HIBIOCA Cerdo, HIBIOCA Cascarilla, HIBIOCA Bagazo, HIBIOCA Agua-Cianuro, y HIBIOCA Suelo-Cianuro.

Estos productos deberían orientar a una utilización total de los residuos de conchas de abanico. Estas nuevas formulaciones también facilitarían la conversión de la agricultura química en agricultura orgánica con una reducción en el uso de fertilizantes y productos fitosanitarios químicos.

Los conocimientos adquiridos por Incabiotec y sus asociados deben extrapolarse rápidamente a otros tipos de desechos hidrobiológicos y agrícolas y a otros tipos de aplicaciones, buscando aquellas correspondientes a productos y moléculas de muy alto valor agregado, en particular para los sectores farmacéutico, cosmético y nutricional.

Bibliografía:

Wang CH, Doan CT, Nguyen AD, Wang SL. 2019. Reclamation of Fishery Processing Waste: A Mini-Review. *Molecules* 14;24(12). pii: E2234. doi: 10.3390/molecules24122234.

Shavandi A, Hou Y, Carne A, McConnell M, Bekhit AEA. 2019. Marine Waste Utilization as a Source of Functional and Health Compounds. *Adv Food Nutr Res.* 2019;87:187-254. doi: 10.1016/bs.afnr.2018.08.001. Epub

Suleria HA, Masci P, Gobe G, Osborne S. 2016. Current and potential uses of bioactive molecules from marine processing waste. *J. Sci. Food Agric.* 15;96(4):1064-7. doi: 10.1002/jsfa.7444. Epub.