

## EVALUACIÓN DE LA DIGESTIÓN ANAERÓBICA PARA LA PRODUCCIÓN DE FITORREGULADORES

[ASSESSMENT OF ANAEROBIC DIGESTION FOR PHYTOREGULATORS PRODUCTION]

Job Jonathan Castro-Ramos<sup>1§</sup>, María Myrna Solís-Oba<sup>1</sup>, Rigoberto Castro-Rivera<sup>1</sup>, Carlos Ligne Calderón-Vázquez<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Instituto Politécnico Nacional, Centro de Investigación en Tecnología Aplicada. Tlaxcala, México. CP. 90700. <sup>2</sup>Instituto Politécnico Nacional, Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional. Sinaloa, México. CP. 81101.

§Autor para correspondencia: (jonathan\_castro@live.com.mx).

### RESUMEN

Durante la digestión anaeróbica (DA) se forma el digestato, este es utilizado en la agricultura por su contenido de nutrientes (N, P y K) y fitorreguladores (FRs) como el ácido giberélico (GA<sub>3</sub>), indolacético (IAA) y abscísico (ABA). La producción de FRs durante la DA ha sido poco estudiada, desconociéndose los microorganismos productores y las condiciones que favorecen su producción. El objetivo fue evaluar la producción de fitorreguladores y su correlación con las comunidades microbianas durante la DA de estiércol de vaca modificando el pH inicial. Se realizaron dos DAs a 37 °C a pH inicial 5.5 (DA1) y 8.5 (DA2), se determinó el contenido de IAA, GA<sub>3</sub>, ABA, pH y metano cada 4 d hasta los 20 d. Se realizaron análisis metagenómicos a los 0, 4, 8 y 20 d y un análisis de correlación entre la abundancia relativa de los taxones y la concentración de FR. El pH inicial modificó la producción de IAA y GA<sub>3</sub>, el ABA no fue detectado. En DA1 se obtuvo un máximo de IAA de 4.9 mg l<sup>-1</sup> (4 d) y de GA<sub>3</sub> de 48.6 mg l<sup>-1</sup> (20 d). En DA2 se obtuvo un máximo de GA<sub>3</sub> de 48 mg l<sup>-1</sup> (8 d) y no se produjo IAA. La alta correlación de algunos taxones del orden *Clostridiales* sugiere a estos microorganismos como posibles productores de IAA y GA<sub>3</sub>. No se detectó metano debido a que el pH del medio en ambas digestiones disminuyó hasta valores que inhiben a los microorganismos metanogénicos; indicando que el IAA y GA<sub>3</sub> se produjeron en condiciones acidogénicas.

**Palabras clave:** Ácido giberélico, ácido indolacético, metagenómica.

### ABSTRACT

During anaerobic digestion (AD) the digestate is formed, this is used in agriculture due to its content of nutrients (N, P and K) and phyto regulators (PR) such as gibberellic (GA<sub>3</sub>), indoleacetic (IAA) and abscisic acids (ABA). The PR production during AD has not been deeply studied; the producing microorganisms and the conditions that favor their production are unknown. The objective of this project was to evaluate the production of phyto regulators and its correlation with the microbial communities during AD of cow manure by modifying the initial pH. Two ADs were performed at 37 °C at initial pH 5.5 (AD1) and 8.5 (AD2), the content of IAA, GA<sub>3</sub>, ABA, pH and methane was determined every 4 d, until 20 d. Metagenomic analyzes were performed at 0, 4, 8 and 20 d and a correlation analysis between the relative abundance of the taxa and the concentration of PR. The initial pH modified the production of GA<sub>3</sub> and IAA, the ABA was not detected. In AD1 a maximum of GA<sub>3</sub> of 48.6 mg l<sup>-1</sup> (20 d) and IAA of 4.9 mg l<sup>-1</sup> (4 d) was obtained. In AD2 a maximum GA<sub>3</sub> of 48 mg l<sup>-1</sup> (8 d) was obtained and no IAA was produced. The high correlation of some taxa of the order *Clostridiales* suggests these microorganisms as possible GA<sub>3</sub> and IAA producers. Methane was not detected due to the pH of the medium in both digestions decreased to values that inhibit the methanogenic microorganisms; indicating that GA<sub>3</sub> and IAA were produced under acidogenic conditions.

**Index words:** Gibberellic acid, indoleacetic acid, metagenomics.

## INTRODUCCIÓN

Los FRs son moléculas orgánicas, producidas por las plantas y algunos microorganismos, que regulan el crecimiento y desarrollo vegetal (Rawlinson *et al.*, 2015). Entre estos compuestos están el ácido giberélico (GA3), ácido indolacético (IAA) y ácido abscísico (ABA). Por su efecto en las plantas, los FRs son utilizados en el cultivo de tejidos vegetales, así como en algunas prácticas agrícolas (Castro-Ramos *et al.*, 2019) a fin de promover los efectos fisiológicos que favorezcan el rendimiento o la calidad de los cultivos (Díaz, 2017).

La digestión anaeróbica (DA) es un proceso en el que diversos microorganismos degradan la materia orgánica en ausencia de oxígeno (Iacovidou *et al.*, 2012). Este proceso se divide en 4 etapas: hidrólisis, acidogénesis, acetogénesis y metanogénesis, en cada de las cuales participa un consorcio microbiano específico. La DA es ampliamente utilizado para el tratamiento de residuos orgánicos y para la producción de metano (Adekunle y Okolie, 2015). El digestato es un subproducto generado durante la degradación de la materia orgánica en la DA. Este subproducto ha sido utilizado en la agricultura por su contenido de nutrientes, además de que favorece el crecimiento vegetal atribuyéndose esta propiedad a su contenido de fitorreguladores (FRs) (Xin *et al.*, 2016).

Actualmente la producción de fitorreguladores se basa en sistemas de cultivo en condiciones aeróbicas y utilizando sustratos puros, lo que implica un costo final del producto elevado (Tian-Qiong *et al.*, 2017). Ante esta situación se han investigado diversos sistemas de cultivo microbiano y la utilización de sustratos residuales para la producción de fitorreguladores (Oliveira *et al.*, 2017). Entre estos se encuentra la DA, en este proceso se utilizan sustratos residuales, además el consumo energético del proceso es menor en comparación con los procesos aeróbicos debido a que no requiere agitación ni aireación (Kim *et al.*, 2006). Sin embargo, la DA para la producción de FRs ha sido poco estudiada existiendo poca información sobre las condiciones de proceso que favorecen su producción, así como los microorganismos de la DA que producen GA3 y ABA.

El pH es uno de los parámetros que condiciona el crecimiento de los microorganismos (Jin y Kirk, 2018). Dado que en la DA cada consorcio microbiano tiene un requerimiento específico de pH óptimo de crecimiento, cambiar este parámetro al inicio del proceso permite condicionar la proliferación de diferentes microorganismos, y por lo tanto la producción de sus metabolitos como los fitorreguladores. El objetivo de este proyecto fue evaluar la producción de fitorreguladores y su correlación con las comunidades microbianas durante la DA de estiércol de vaca modificando el pH inicial.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Digestiones anaeróbicas

El estiércol de vaca utilizado como sustrato e inóculo en las DA evaluadas fue obtenido del módulo de bovinos lecheros del Instituto Tecnológico del Altiplano de Tlaxcala. Para las DA el contenido de sólidos totales del estiércol se ajustó a 7% con agua destilada. Se evaluaron dos procesos de DA modificando el pH inicial a 5.5 (DA1) y 8.5 (DA2), con HCl (37%) y NaOH (10 N), respectivamente. La temperatura fue de 37 °C y el tiempo de proceso de 20 d. Se tomaron muestras cada 4 d, se midió el pH y se cuantificaron el IAA, GA3, ABA, ácidos grasos volátiles (ácido acético, ácido propiónico, ácido isobutírico, ácido butírico, ácido isovalérico y ácido valérico) y metano.

### Determinación de fitorreguladores

La extracción de FRs (IAA, GA3 y ABA) se realizó a partir de la fracción del sobrenadante del digestato. Se utilizó acetato de etilo como disolvente (Ludwig-Müller y Cohen, 2002). La cuantificación de FRs se realizó por HPLC (HP 1100 series) con detector de arreglo de diodos utilizando elución en gradiente con agua y metanol como fase móvil y una columna de fase reversa Eclipse XDB-C18 (4.6 mm ID x 250 mm 5µm). Para determinar la concentración de FRs se utilizaron curvas de calibración.

### **Determinación de ácidos grasos volátiles (AGVs)**

Los AGVs se extrajeron a partir del sobrenadante del digestato utilizando cloruro de metileno de acuerdo con Teniza-García *et al.* (2015). Para la cuantificación de AGVs se utilizó un cromatógrafo de gases acoplado a un detector de ionización de flama (FID) y una columna HP-5 (30 m 0.32 mm 0.25  $\mu$ m) y nitrógeno como gas de arrastre. La temperatura del inyector y detector fueron de 250 y 260 °C, respectivamente, acorde a lo recomendado por Teniza-García *et al.* (2015).

### **Determinación de metano**

El contenido de metano se determinó por cromatografía de gases acoplada a un detector de conductividad térmica (TCD), utilizando nitrógeno como gas de arrastre y una columna GS-carbonplot (30 m, 0.32 mm, 3  $\mu$ m). La temperatura del inyector y detector fue de 200 °C (Agilent Technologies, 2010).

### **Análisis metagenómicos**

Para los análisis metagenómicos inicialmente se realizó la extracción de ADN (Power Soil DNA Isolation Kit) de la biomasa celular de las muestras a los 0, 4, 8 y 20 d de DA1 y DA2. Se amplificó la región V4 del gen ribosomal RNA 16s con los primers 515/806 y el HotStarTaq Plus Master Mix Kit. La secuenciación se llevó a cabo en la plataforma Ion Torrent (PGM) y se obtuvieron lecturas de 300 pb en promedio.

El análisis bioinformático se realizó en el programa QIIME 2 (Bolyen *et al.*, 2019). Se eliminaron los primers, se evaluó la calidad de las lecturas (mínima de 20 en la escala de Phred), se agruparon las secuencias en con el 100% de similitud (ASVs) y se eliminaron las secuencias quiméricas. La asignación taxonómica de los ASVs se realizó utilizando la base de datos SILVA\_132\_99\_16S (Quast *et al.*, 2013).

### **Análisis de datos**

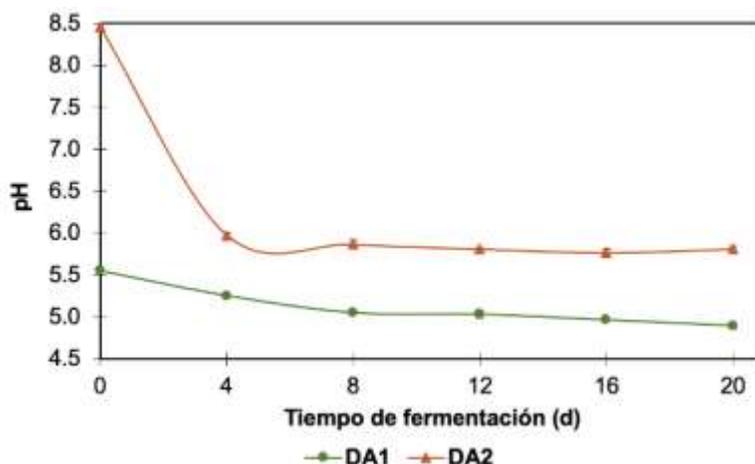
El análisis de varianza y las pruebas de comparación de medias de la concentración de FRs a los diferentes tiempos de las DAs fueron realizadas en el programa estadístico SAS. Se realizaron los análisis de correlación entre la abundancia de los taxones identificados y la concentración de FRs a los 0, 4, 8, y 20 d. Se utilizó el coeficiente de correlación de Spearman el cual se calculó en el programa RStudio y se visualizó en un mapa de calor.

## **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

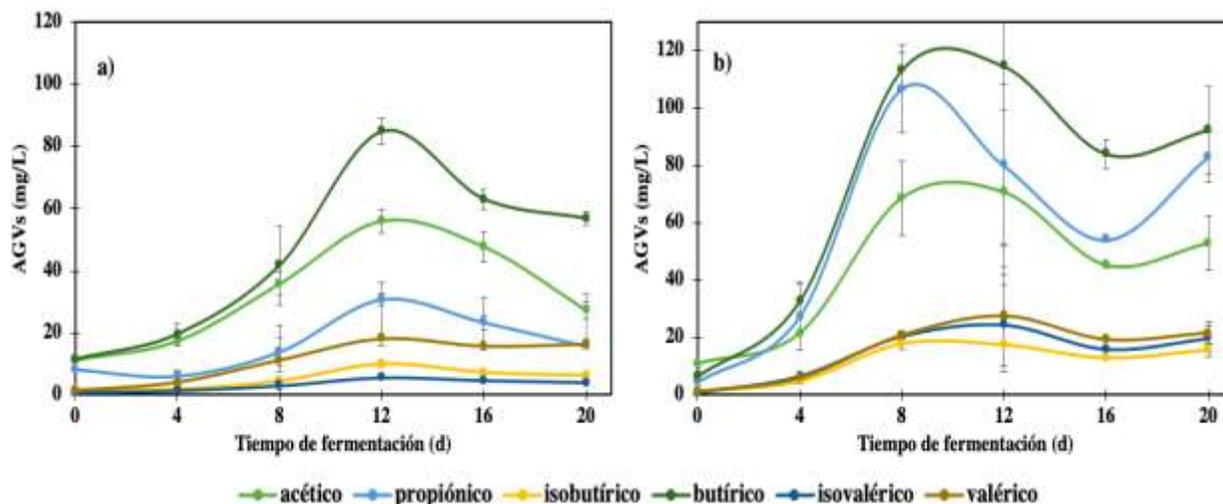
### **Digestiones anaeróbicas**

Se evaluó el comportamiento de las digestiones anaeróbicas a pH inicial de 5.5 (DA1) y 8.5 (DA2) por medio del seguimiento del pH del medio, producción de AGVs y contenido de metano. Tanto en DA1 como en DA2 se observó una disminución del pH del medio (Figura 1), así como la acumulación de AGVs conforme transcurrieron los procesos (Figura 2).

Además, no se detectó la presencia de metano en ninguna de las muestras de ambas digestiones. Este comportamiento del proceso de DA se ha reportado previamente (Gulhane *et al.*, 2017) y se asocia a la acumulación de ácidos orgánicos en el medio de digestión, ocasionando la inhibición de los microorganismos metanogénicos, los cuales requieren de un pH cercano al neutro para su crecimiento (Deublein y Steinhauser, 2008). Por su parte, la acumulación de AGVs indica que estos compuestos no fueron consumidos por los microorganismos acetogénicos durante los procesos de DA. Lo anterior indica que el GA3 y el IAA se produjeron en condiciones ácidas, durante las etapas de hidrólisis y acidogénesis de las DA de estiércol de vaca.



**Figura 1.** Seguimiento de pH de las digestiones anaeróbicas de estiércol de vaca a pH inicial 5.5 (DA1) y 8.5 (DA2) a 37 °C.



**Figura 2.** Ácidos grasos volátiles (AGVs) de las digestiones anaeróbicas de estiércol de vaca a pH inicial 5.5(a); y 8.5 (b) a 37 °C.

### Producción de fitorreguladores

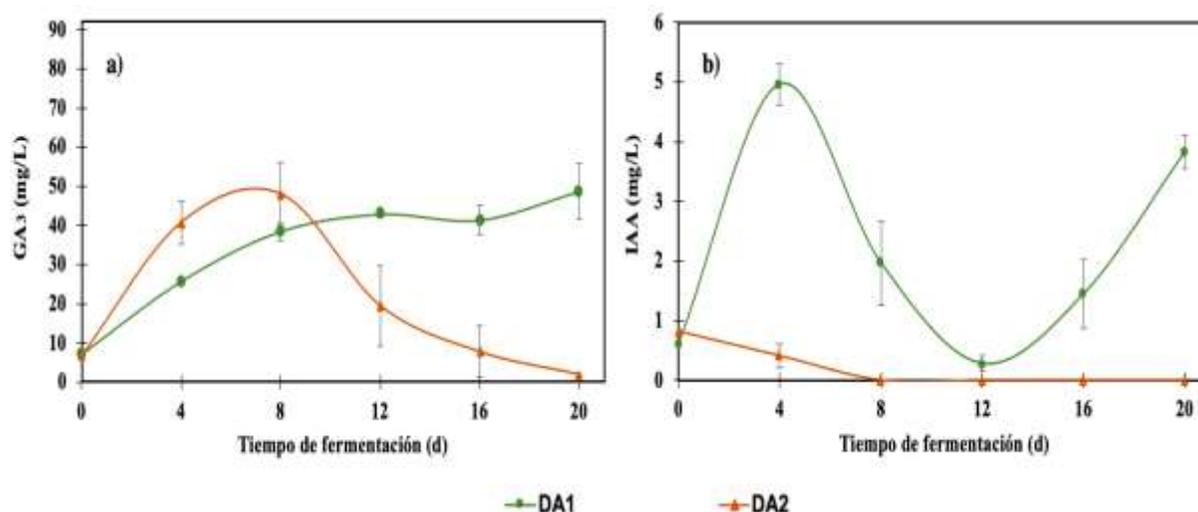
Los resultados obtenidos muestran que la producción de IAA y GA3 fue diferente en las DAs a pH inicial de 5.5 (DA1) y 8.5 (DA2). La producción de GA3 en DA1 fue mayor que en DA2, alcanzando una concentración máxima de 48.8 mg l<sup>-1</sup> a los 20 d de proceso (Figura 3a). No obstante, el análisis estadístico muestra que no hubo diferencia significativa entre las concentraciones de GA3 a partir de los 8 d, implicando que a los 8 d se podría obtener la máxima concentración, disminuyendo el tiempo de proceso (Cuadro 1). Por su parte, la máxima concentración de GA3 obtenida en DA2 fue de 48 mg l<sup>-1</sup> a los 8 d de proceso. No obstante, el análisis estadístico muestra que no hubo diferencia significativa entre esta concentración y la obtenida a los 4 d. Para las DAs evaluadas, utilizar un pH inicial de 8.5 y 4 d de proceso resultan condiciones interesantes, ya que se obtiene el 84% de la concentración máxima (DA2 en 20 d) disminuyendo considerablemente el tiempo de proceso.

**Cuadro 1.** Prueba de medias (LSD  $P < 0.05$ ) de la concentración de GA3 y IAA a los diferentes tiempos de las digestiones anaeróbicas a pH inicial 5.5 (DA1) y 8.5 (DA2) a 37 °C.

Tiempo (d)	GA <sub>3</sub>		IAA	
	DA1	DA2	DA1	DA2
0	7.2 C	6.9 B	0.6 C	0.8 A
4	25.7 B	40.8 A	4.9 A	0.4 B
8	38.4 A	48 A	1.9 B	0 C
12	42.8 A	19.5 B	0.2 C	0 C
16	41.4 A	7.7 B	1.4 BC	0 C
20	48.6 A	1.9 B	3.8 A	0 C

Las letras diferentes en columna indican diferencia estadísticamente significativa.

En comparación con los resultados obtenidos, Xin *et al.* (2016) obtuvieron una concentración máxima de GA3 de 16 mg l<sup>-1</sup> a los 14 d de la DA de estiércol de vaca (pH inicial 8.68); además de una concentración máxima de 47 mg l<sup>-1</sup> en la DA de estiércol de cerdo (pH inicial 8.41). Los resultados obtenidos de la producción de GA3 en DA1 y DA2 también muestran una diferencia en la acumulación de dicho fitorregulador. Mientras que en DA1 el GA3 se acumuló hasta el final del proceso, en DA2 la concentración de GA3 disminuyó a partir de los 8 d indicando que dejó de producirse y fue degradado. En este sentido, se ha reportado que el GA3 tiende a degradarse en medio acuoso (Pérez *et al.*, 1996). La producción de IAA únicamente se observó en la DA1, la máxima concentración se obtuvo a los 4 d con 4.9 mg l<sup>-1</sup> (Figura 3b).

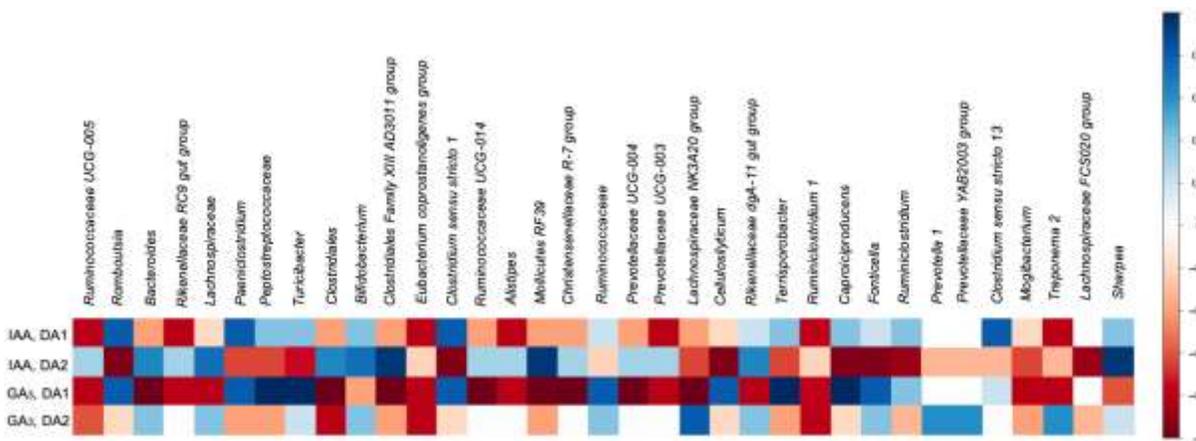


**Figura 3.** Producción de GA<sub>3</sub> (a); IAA (b); durante las digestiones anaeróbicas de estiércol de vaca a pH inicial de 5.5 (DA1) y 8.5 (DA2) a 37 °C.

A los 20 d se observó un nuevo pico de producción de IAA, sin embargo, la concentración fue menor a la obtenida a los 4 d de proceso. Este segundo pico de producción de IAA podría estar asociado a la lenta degradación de las proteínas del sustrato durante la DA, ya que se reporta que el precursor del IAA es el triptófano (Xin *et al.*, 2018). Comparando los resultados, Scaglia *et al.* (2015) reportaron la presencia de IAA en el digestato de la DA de estiércol de cerdo en una concentración de 9.94 mg l<sup>-1</sup>, el pH del digestato fue de 8.63 en contraste con las condiciones ácidas en las cuales se produjo el IAA en este trabajo.

## Análisis de correlación

Como se muestra en la Figura 4, en DA1 la concentración de IAA exhibe una correlación positiva de  $r = 0.8$  con la abundancia relativa de los géneros *Romboutsia*, *Paeniclostridium*, *Clostridium* sensu stricto 1 y *Clostridium* sensu stricto 13, todos estos géneros pertenecientes al orden Clostridiales. En este sentido se ha reportado la producción de IAA por algunas especies del género *Clostridium* como *Clostridium sticklandii*, *Clostridium drakei* y *Clostridium scatologenes* (Attwood *et al.*, 2006; Whitehead *et al.*, 2008). En DA2 los taxones que presentaron alta correlación ( $r = 1$ ) con la concentración de IAA fueron Clostridiales family XIII AD3011, Mollicutes RF39 y Sharpea, sin embargo, el IAA no se produjo durante este proceso.



**Figura 4.** Mapa de calor de correlaciones de Pearson de la abundancia relativa de los taxones a nivel género y la concentración de GA<sub>3</sub> a los 0, 4, 8 y 20 d, de las digestiones anaeróbicas a pH inicial 5.5 (DA1) y 8.5 (DA2).

Con respecto a las correlaciones de la concentración de GA<sub>3</sub> y la abundancia de taxones, en la Figura 4 se muestra que en DA1 *Romboutsia*, *Paeniclostridium*, *Ruminococcaceae*, *Fonticella* y *Cellulosilyticum* presentaron una correlación positiva de  $r = 0.8$ , así como *Peptostreptococcaceae*, *Terrisporobacter*, *Caproiciproducens* y *Clostridium* sensu stricto 1 y *Turicibacter* presentaron una correlación positiva de  $r = 1$ . Todos estos taxones pertenecen al orden Clostridiales excepto *Turicibacter*. En DA2, el único taxón que presentó alta correlación con la concentración de GA<sub>3</sub> fue *Lachnospiraceae* NK3A20 ( $r = 0.8$ ). Las altas correlaciones positivas encontradas sugieren que la producción de IAA y GA<sub>3</sub> podría estar asociada a los taxones mencionados durante la DA de estiércol de vaca.

## CONCLUSIONES

El pH inicial de la digestión anaeróbica de estiércol de vaca influye sobre la producción y acumulación de IAA y GA<sub>3</sub>. A pH inicial de 5.5 se obtuvo la mayor concentración de GA<sub>3</sub> (48.6 mg l<sup>-1</sup>) a los 20 d, mientras que el IAA únicamente se produjo a pH inicial de 5.5 con una máxima concentración de 4.9 mg l<sup>-1</sup>. El ABA no se produjo bajo las condiciones evaluadas. Por su parte, la alta correlación encontrada entre la concentración de fitoreguladores (IAA y GA<sub>3</sub>) y la abundancia relativa de algunos taxones del orden Clostridiales, sugieren que estos microorganismos podrían estar asociados con la producción de IAA y GA<sub>3</sub>. Finalmente, el IAA y GA<sub>3</sub> se produjeron en condiciones anaeróbicas ácidas, indicando que estas condiciones podrían favorecer la producción de dichos compuestos.

## LITERATURA CITADA

Adekunle, K.F. and J.A. Okolie. 2015. A Review of biochemical process of anaerobic digestion. *Advances in Bioscience and Biotechnology*, 6: 205-212.

- Agilent Technologies. 2010. Guía de selección de columnas Agilent J & W para-GC, EE.UU.
- Attwood, G., D. Li, D. Pacheco and M. Tavendale. 2006. Production of indolic compounds by rumen bacteria isolated from grazing ruminants. *J. Appl. Microbiol.*, 100: 1261-1271.
- Bolyen, E, J.R. Rideout, M.R. Dillon, N.A. Bokulich, C.C. Abnet, G.A. Al-Ghalith *et al.* 2019. Reproducible, interactive, scalable and extensible microbiome data science using QIIME 2. *Nat Biotechnol.*, 37:852-857.
- Castro-Ramos, J.J., M.M. Solís-Oba, R. Castro-Rivera y C.L. Calderón-Vázquez. 2019. Minireview: uso de fitorreguladores en el manejo de cultivos agrícolas. *Frontera Biotecnológica*, 13: 14-18.
- Deublein, D. and A. Steinhauser. 2008. Formation of biogas. In: Deublein, D. and Steinhauser, A. (eds) *Biogas from waste and renewable resources*. Wiley-VCH, Weinheim.
- Díaz, M.D. 2017. Biorreguladores de crecimiento en las plantas. Serie Nutrición Vegetal No. 89. *Notas Técnicas de INTAGRI*. México.
- Gulhane, M., P. Pandit, A. Khardnavis, D. Singh and H. Purohit. 2017. Study of microbial community plasticity for anaerobic digestion of vegetable waste in anaerobic baffled reactor. *Renew Energy*, 101:59-66. doi:10.1016/j.renene.2016.08.021.
- Iacovidou, E., E. Ohandja and N. Voulvoulis. 2012. Food waste co-digestion with sewage sludge realising its potential in the UK. *Journal of Environmental Management*, 112: 67-274.
- Jin, Q., and M.F. Kirk. 2018. pH as a primary control in environmental microbiology: 1. thermodynamic perspective. *Front. Environ. Sci.*, 6(21): 1-15.
- Kim, J.K., B.R. Oh, Y.N. Chun and S.W. Kim. 2006. Effects of temperature and hydraulic retention time on anaerobic digestion of food waste. *J. Biosci. Bioeng.* 102: 328-332.
- Ludwig-Müller, J. and J.D. Cohen. 2002. Identification and quantification of three active auxins in different tissues of *Tropaeolum majus*. *Physiologia Plantarum*, 115: 320-329.
- Oliveira, J, C. Rodrigues, L.P.S. Vandenbergh, M.C. Camara, N. Libardi and C.R. Soccol. 2017. Gibberellic acid production by different fermentation systems using citric pulp as substrate/support. *BioMed Res Int.* doi: 10.1155/2017/5191046.
- Perez, F.J., A. Vecchiola, M. Pinto and E. Agosin. 1996. Gibberellic acid decomposition and its loss of biological activity in aqueous solutions. *Phytochemistry*, 41:675-679. doi: 10.1016/0031-9422(95)00689-3.
- Quast, C, E. Pruesse, P. Yilmaz, J. Gerken, T. Schweer, P. Yarza, J. Peplies and F.O. Glöckner. 2013. The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. *Nucl. Acids Res.*, 41:590-596.
- Rawlinson, C., L.G. Kamphuis, J.P.A. Gummer, K.B. Singh and R.D. Trengove. 2015. A rapid method for profiling of volatile and semi-volatile phytohormones using methyl chloroformate derivatisation and GC-MS. *Metabolomics*, 11: 1922-1933.
- Scaglia, B., M. Pognani and F. Adani. 2015. Evaluation of hormone-like activity of the dissolved organic matter fraction (DOM) of compost and digestate. *Sci. Total Environ.*, 514: 314-321.
- Teniza-García O, M.M. Solís-Oba, M.E. Pérez-López, J.M. González-Prieto, R. Valencia-Vázquez. 2015. Producción de metano utilizando residuos cunícolas. *Rev. Mex. Ing. Quim.*, 14:321-334.
- Tian-Qiong S., P. Hui, Z. Si-Yu, J. Rong-Yu, S. Kun, H. He and J. Xiao-Jun. 2017. Microbial production of plant hormones: opportunities and challenges. *Bioengineered*, 8:124-128.
- Whitehead, T.R., N.P. Price, H.L. Drake, and M.A. Cotta. 2008. Catabolic pathway for the production of skatole and indoleacetic Acid by the Acetogen *Clostridium drakei*, *Clostridium scatologenes*, and Swine Manure. *Appl. Environ. Microbiol.*, 74: 1950-1953.
- Xin, L., G. Jianbin, P. Changle and D. Renjie. 2016. Anaerobic digestion and storage influence availability of plant hormones in livestock slurry. *ACS Sustainable Chemistry and Engineering*, 4: 719-727.
- Xin, L., G. Jianbin, D. Renjie and Z. Wanqin. 2018. Indolic derivatives metabolism in the anaerobic reactor treating animal manure: pathways and regulation. *ACS Sustainable Chem. Eng.*, 6: 11511-11518.