

Trabajo Fin de Máster
Bioeconomía Circular y Sostenibilidad
Universidad de Córdoba



PRODUCCIÓN DE BIOESTIMULANTES A PARTIR DE UN RESIDUO ALIMENTARIO Y UN ALGA PARDA

Autora: **Remedios Montenegro Elvira**

Tipología: Propuesta científico-técnica

Tutor en empresa: Alejandro Posadillo Marín

Tutora académica: Alina M. Balu Balu

25/08/2022

AGRADECIMIENTOS

Dedico este pequeño hueco de mi trabajo a agradecerle a mis padres que me permitan seguir formándome en el ámbito de la biotecnología y la bioeconomía circular, a mis hermanos y familia, que me apoyen y confíen en mis posibilidades; a mis amigos, que sepan hacerme reír cada vez que los estudios y trabajos me abruman; y a Álvaro, que esté conmigo en cada paso que realizo de este camino.

También quisiera agradecerle a mis tutores el tiempo dedicado y todo lo que me han enseñado. A Alejandro, agradecerle la adquisición de nuevas habilidades de cara a la industria, y a Alina, la ayuda y formación que me ha ofrecido.

Por último, agradecerle al Campus de Excelencia Internacional Agroalimentario (ceiA3) la ayuda otorgada para poder realizar mi TFM en una empresa, abriéndome la puerta a nuevas experiencias y saliendo de mi zona de confort en el ámbito académico.

ÍNDICE

RESUMEN.....	5
ABSTRACT	5
1. ANTECEDENTES	6
1.1 DEFINICIÓN DE BIOESTIMULANTES Y BIOFERTILIZANTES	6
1.2 MERCADO Y NORMATIVA	7
1.3 BIOESTIMULANTES Y MECANISMOS DE ACCIÓN	8
1.4 NUEVAS OPORTUNIDADES: BIOECONOMÍA CIRCULAR Y BIOECONOMÍA AZUL.....	9
1.5 RESIDUO ALIMENTARIO: ALIMENTOS DESTINADOS A FINES MÉDICOS ESPECIALES.....	9
1.6 RECURSO MARINO: ALGA PARDA <i>Ascophyllum nodosum</i>	11
1.7 FERMENTACIÓN.....	13
1.7.1 <i>Definición</i>	13
1.7.2 <i>Microorganismos empleados en la fermentación</i>	13
1.8 EXTRACCIÓN DE COMPUESTOS DE LA MACROALGA ASISTIDA POR MICROONDAS.....	15
2. HIPÓTESIS	17
3. OBJETIVOS.....	18
4. PLAN DE TRABAJO	19
5. METODOLOGÍA	21
5.1 BIOESTIMULANTE A PARTIR DE RESIDUO ALIMENTARIO.....	21
5.1.1 <i>Reactivos</i>	21
5.1.2 <i>Equipamiento e instrumentación</i>	21
5.1.3 <i>Preparación del inóculo</i>	22
5.1.4 <i>Fermentación</i>	22
5.1.5 <i>Ensayos en plantas</i>	24
5.2 BIOESTIMULANTE A PARTIR DEL ALGA <i>Ascophyllum nodosum</i>.....	24
5.2.1 <i>Reactivos</i>	24
5.2.2 <i>Equipamiento e instrumentación</i>	25
5.2.3 <i>Extracción asistida por microondas</i>	25
5.2.4 <i>Análisis de compuestos fenólicos</i>	26
5.2.5 <i>Ensayos en plantas</i>	26
6. RESULTADOS Y BENEFICIOS ESPERABLES	28
6.1 RESULTADOS ESPERABLES.....	28

6.1.1	<i>Bioestimulante a partir de residuo alimentario</i>	28
6.1.2	<i>Bioestimulante a partir del alga <i>Ascophyllum nodosum</i></i>	29
6.2	BENEFICIOS ESPERABLES	30
6.2.1	<i>Perspectivas de futuro</i>	30
7	BIBLIOGRAFÍA	32

PRODUCCIÓN DE BIOESTIMULANTES A PARTIR DE UN RESIDUO ALIMENTARIO Y UN ALGA PARDA

Remedios Montenegro Elvira. Máster de Bioeconomía Circular y Sostenibilidad.

Universidad de Córdoba.

RESUMEN

El empleo de microorganismos y de extractos de macroalgas como agentes estimulantes del crecimiento vegetal está despertando cada vez mayor interés. La posibilidad de obtener estos agentes a partir de recursos orgánicos poco aprovechados como residuos alimentarios y algas supone una revalorización de estos, la disminución del impacto ambiental y un ahorro en su producción. Este Trabajo Fin de Máster propone la producción de bioestimulantes a partir de un subproducto alimentario mediante fermentaciones, por un lado, y a partir una especie de macroalga parda mediante la extracción de sus compuestos orgánicos, por otro. Con los productos obtenidos de la fermentación y la extracción se propone la realización de ensayos en plantas para evaluar su capacidad promotora.

PALABRAS CLAVES: *Bioestimulantes; Biofertilizantes; Residuos alimentarios; Residuos orgánicos; Fermentación; Macroalgas*

ABSTRACT

The use of microorganisms and seaweed extracts as promotor plant growth agents has increased in the last years. The possibility of producing these agents using organic resources such as food wastes and seaweed as feedstock involves the revalorization of those wastes and matter, a reduction on their environmental impact and lower economic prices in production. This Final Master Project proposes the production of bioestimulants through a fermentation process of food waste, on one hand, and by the extraction of organic compounds from a brown seaweed specie, on the other hand. Both products obtained by fermentation and extraction are proposed to be used on plants assays to evaluate their promoting growth ability.

KEYWORDS: *Biostimulants; Biofertilizers; Food waste; Organic waste; Fermentation; Seaweed*

1. ANTECEDENTES

Para el año 2050 se estima que la población mundial alcanzará los 9,7 mil millones de personas (FAO, 2021b). Este crecimiento, junto con los cambios que se están produciendo en el nivel de adquisición y en el nivel de vida de la población, ha provocado un importante aumento de la demanda de alimentos (Fukase & Martin, 2020). Actualmente, 7.750 millones de hectáreas se encuentran dedicadas a cultivos y ganado para satisfacerla, aunque se espera que la demanda se duplique para 2050 (FAO, 2021b) (Tilman et al., 2011), lo que provocará una expansión de la agricultura y una mayor intensificación del uso del suelo (Kehoe et al., 2017).

Los pesticidas y fertilizantes convencionales son agentes importantes en esta intensificación de la agricultura (FAO, 2021a). Sin embargo, también son el origen de graves problemas: la agricultura, y en especial el uso de fertilizantes, se ha convertido en la principal causa de pérdida de biodiversidad, tanto de flora y fauna como de microorganismos (Kehoe et al., 2017) (Barros-Rodríguez et al., 2020), y es responsable también de la degradación del suelo, la pérdida de su actividad microbiana, sus nutrientes y la contaminación de las aguas subterráneas (FAO, 2021b) (Ceccon, 2008).

Para reducir este impacto ambiental y ecológico sin comprometer el rendimiento de los cultivos es necesario buscar nuevas alternativas más sostenibles y respetuosas. El empleo de fertilizantes orgánicos, definidos como productos carbonados de origen animal o vegetal cuya función es aportar nutrientes a las plantas es la opción preferente actualmente (Real Decreto 506/2013, 2013). Sin embargo, estos también poseen sus propias limitaciones: pueden contribuir a la pérdida del medio mediante la contaminación del suelo o la eutrofización de lagos, acuíferos y zonas costeras, han de ser combinados con fertilizantes químicos para optimizar su rendimiento y, si no se procesan correctamente, pueden suponer riesgos para la salud por la acumulación de microorganismos patógenos o compuestos tóxicos (Cordero-Bueso et al., 2021) (Case et al., 2017). Una alternativa novedosa y más interesante al empleo de los fertilizantes químicos y orgánicos sería el empleo de microorganismos o moléculas que promuevan el crecimiento y rendimiento vegetal, los denominados bioestimulantes y biofertilizantes, objetos de este trabajo.

1.1 DEFINICIÓN DE BIOESTIMULANTES Y BIOFERTILIZANTES

Du Jardin (2015) define los bioestimulantes como “cualquier sustancia o microorganismo, o mezcla de estos, que mejore la eficiencia nutritiva, la tolerancia al estrés abiótico o algún rasgo en la calidad del cultivo una vez aplicado, sin importar su contenido nutritivo”.

En la misma línea se encuentra la definición de estos establecida por el 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,

que los califica como “sustancias, mezclas y microorganismos que no son aportes de nutrientes propiamente dichos, si bien estimulan los procesos naturales de nutrición. Sirven para mejorar la eficiencia en el uso de nutrientes de los vegetales, su tolerancia al estrés abiótico, sus propiedades de calidad, o para incrementar la disponibilidad de nutrientes inmovilizados en el suelo o la rizosfera”. Este nuevo reglamento los considera, por estas características, más similares a los productos fertilizantes que a otros productos fitosanitarios, por los que reciben el mismo trato. El término “biofertilizante” no aparece en dicho reglamento y estos productos quedan recogidos en la normativa europea como un tipo de fertilizantes orgánicos (Barros-Rodríguez et al., 2020).

Un biofertilizante, de acuerdo con Du Jardin (2015), es “cualquier microorganismo aplicado a plantas con el objetivo de aumentar la disponibilidad de los nutrientes y su empleo, sin importar su contenido nutritivo”. Brahmprakash & Sahu (2012) lo definen como “una preparación de microorganismos beneficiosos que mejoran el crecimiento vegetal”. Sin embargo, la mayoría de los autores en la literatura científica emplean el término *bioestimulante* y *biofertilizante* indistintamente para referirse a sustancia o microorganismo.

La diferencia entre estos productos y los fertilizantes convencionales radica en su comportamiento y composición. No son sustancias con un papel exclusivamente nutricional, aunque favorecen la adquisición de nutrientes, y pueden usarse en combinación con estos para optimizar el rendimiento y disminuir la dosis (Barros-Rodríguez et al., 2020) (du Jardin, 2015).

1.2 MERCADO Y NORMATIVA

En el año 2019 el tamaño del mercado global de microorganismos dedicados a la agricultura fue de 4,27 mil millones de dólares. Para el año 2027 se espera que esta cifra alcance los 11,82 mil millones (Fortune Business Insights, 2021). La representación de los extractos de alga en el mercado de los bioestimulantes es muy amplia, siendo una de las categorías dominantes con cifras estimadas de 894 millones de dólares en 2022 (El Boukhari et al., 2020). Este crecimiento se debe a la adopción de nuevas prácticas agrícolas y al interés por disminuir los efectos de los fertilizantes químicos, así como a las ayudas gubernamentales para los agricultores, y al reciente interés en los productos orgánicos y la mayor demanda de seguridad alimentaria (MarketAndMarkets, 2021).

Aunque existen numerosos microorganismos con capacidad promotora del crecimiento vegetal, que serán mencionados más adelante, cabe destacar que sólo tres géneros de bacterias pueden ser comercializados en la Unión Europea según lo establecido por el Reglamento (UE) 2019/1009. Estos géneros son *Azotobacter* spp., *Rhizobium* spp., y *Azospirillum* spp., seleccionados por no existir documentación sobre su patogenicidad, lo que en realidad no garantiza que no puedan existir cepas nocivas. Además de estas bacterias, la Unión Europea permite la comercialización de formulaciones realizadas con hongos micorrízicos.

1.3 BIOESTIMULANTES Y MECANISMOS DE ACCIÓN

Existen numerosos microorganismos presentes en el suelo con capacidad de promover el crecimiento vegetal. Se conocen como microorganismos promotores del crecimiento vegetal, abreviado como MPCV o PGPM en inglés, y se pueden encontrar bacterias (BPCV), hongos y levaduras (HPCV) (Naik et al., 2019) (Verma et al., 2019), entre los que destacan las bacterias libres fijadoras de nitrógeno de los géneros *Azotobacter*, *Beijerinckia*, *Clostridium*, *Nostoc*, *Klebsiella*, y *Anabaena*; las bacterias simbióticas como *Rhizobia*, *Frankia*, y *Azospirillum*; las bacterias solubilizadoras de fósforo como *Bacillus megaterium* var. *phosphaticum*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus circulans*, y *Pseudomonas striata*; y hongos como *Penicillium* spp., *Aspergillus awamori*, *Rhizoctonia*, y *Pezizella* (Hakeem et al., 2016).

Esta mejora del crecimiento vegetal puede ser directa o indirecta. En el primer caso, los microorganismos actúan sobre la fijación del nitrógeno, la producción de fitohormonas (auxinas, citoquinas, giberelinas, etileno y ácido abscísico), la solubilización mineral o la producción de enzimas y otros compuestos orgánicos (Ahemad & Kibret, 2014) (Naziya et al., 2020). En el segundo caso, la mejora se da por fenómenos de biocontrol mediante la producción de antibióticos, agentes quelantes y enzimas extracelulares que protegen a la planta de otros microorganismos patógenos (Gupta et al., 2015). Estos microorganismos también contribuyen a la mejora de la respuesta vegetal frente a condiciones de estrés abiótico (Yang et al., 2009). Todos estos efectos promotores se producen gracias al fenómeno *quorum sensing*, que promueve la actividad microbiana mediante la regulación de la expresión genética de manera coordinada como respuesta a señales químicas. De esta manera se producen, liberan y detectan moléculas extracelulares autoinductoras que promuevan esa expresión molecular (Jung et al., 2020).

Además de los microorganismos, muchas sustancias orgánicas de origen botánico o procedente de algas muestran también excelente capacidad estimulante del crecimiento vegetal. Los extractos de macroalgas como polisacáridos, laminarina, alginato o carrageno, polifenoles, moléculas derivadas de estos u otros constituyentes como sus macro y micronutrientes o esteroles promueven el crecimiento de las plantas. Muchos de estos extractos se obtienen de las algas pardas de género *Ascophyllum*, *Fucus* y *Laminaria*, aunque también pueden extraerse de algas rojas y verdes (Battacharyya et al., 2015) (Khan et al., 2009).

Entre las diferentes funciones de estos compuestos extraídos destaca la capacidad de los polisacáridos para contribuir a la formación de geles, retener el agua y mejorar la aireación del suelo o para facilitar la biorremediación mediante la fijación y el intercambio de iones (Blunden, 1991) (Ammar et al., 2022). Los microorganismos del suelo también se ven favorecidos por esta adición de los extractos de algas, mejorando así mismo sus capacidades promotoras, y los

nutrientes y las hormonas adicionadas promueven de manera directa el crecimiento vegetal y la germinación de semillas (Craigie, 2011) (du Jardin, 2015).

1.4 NUEVAS OPORTUNIDADES: BIOECONOMÍA CIRCULAR Y BIOECONOMÍA AZUL

La economía circular es un modelo de producción y consumo que persigue extender al máximo el ciclo de vida de un material o producto, defendiendo entre sus objetivos la reducción de los residuos al mínimo y la creación de valor adicional en contraposición al sistema tradicional centrado en la producción, consumo y vertido (Parlamento Europeo, 2015). La bioeconomía circular, una sección de la economía circular, contempla el empleo y la producción de los recursos biomásicos renovables y su transformación sostenible y eficiente en bioproductos, bioenergía y servicios para la sociedad (Junta de Andalucía, 2018).

En este Trabajo Fin de Máster los recursos de interés serán los residuos y las algas para la producción de bioestimulantes y biofertilizantes. Estos primeros se definen como objetos resultantes de un proceso cuya finalidad primaria no es su producción, y pierden tal condición para ser considerados subproductos y fuente de materia prima de nuevos procesos (Diario Oficial de la Unión Europea, 2008). Estos segundos, las algas, son recursos marinos renovables muy importantes en el campo de la bioeconomía azul, una sección de la bioeconomía centrada en el aprovechamiento sostenible y efectivo de los recursos marinos (European Commission, 2018).

La economía circular busca promover también el desarrollo sostenible. La producción de biofertilizantes y bioestimulantes a partir de residuos y algas contribuye a la sostenibilidad mediante el apoyo a tres Objetivos de Desarrollo Sostenible (ODS) propuestos en la Agenda 2030 de las Naciones Unidas:

- ODS 2. Poner fin al hambre, lograr la seguridad alimentaria y la mejora de la nutrición y promover la agricultura sostenible.
- ODS 12. Garantizar modalidades de consumo y producción sostenibles.
- ODS 15. Gestionar sosteniblemente los bosques, luchar contra la desertificación, detener e invertir la degradación de las tierras y detener la pérdida de biodiversidad.

1.5 RESIDUO ALIMENTARIO: ALIMENTOS DESTINADOS A FINES MÉDICOS ESPECIALES

Los alimentos destinados a fines médicos especiales, también conocidos como FSMPs por sus siglas en inglés *Foods for Special Medical Purposes*, son aquellos destinados a la alimentación

parcial o exclusiva de determinados pacientes con problemas y limitaciones en su capacidad de ingerir, digerir, absorber, metabolizar o excretar alimentos convencionales, nutrientes o metabolitos concretos, o con requerimientos médicos específicamente determinados por la necesidad de algún nutriente que no puede ser adquirido simplemente por modificación de su dieta, con otros alimentos nutricionales alternativos o con una mezcla de ambos (Comisión de Las Comunidades Europeas, 1999). Dependiendo de las características del paciente y su patología la naturaleza y composición del producto variará.

Aunque no existe ningún tipo de documentación sobre la gestión al final de su vida útil, los alimentos destinados a aplicaciones médicas especiales, al tratarse de productos alimentarios, poseen la misma gestión como residuos que la de otros alimentos una vez se alcanza la fecha de caducidad.

Estos residuos poseen un alto contenido en nutrientes, lo que los convierte en una materia prima muy interesante para un aprovechamiento biotecnológico. Su composición varía de un producto comercial a otro, aunque todos son ricos en vitaminas, minerales, hidratos de carbono, grasas y proteínas, tratándose de productos hipercalóricos e hiperproteicos (Tabla 1). Hasta el momento no se han realizado investigaciones con este tipo de residuo, siendo este Trabajo Fin de Máster la primera investigación con intención de evaluar su potencial para la producción de biofertilizantes y bioestimulantes.

Tabla 1. Composición media de varios FSMPs. (Elaboración propia)

Información nutricional (100 mL)	Composición media	Vitaminas	Composición media	Minerales	Composición media
Valor energético (KJ-Kcal)	690-322,33	Vitamina A (µg-RE)	151,333	Sodio (mg)	93,733
Grasas (g)	4,926	Vitamina D (µg)	2,806	Calcio (mg)	198
Grasas saturadas (g)	0,7	Tiamina (Vit. B1) (mg)	0,316	Hierro (mg)	2,933
Grasas poliinsaturadas (g)	1,056	Riboflavina (Vit. B2) (mg)	0,583	Potasio (mg)	223,333
Relación ω6/ω3	-	Niacina PP (mg-NE)	1,663	Cloruro (mg)	108,133

Grasas monoinsaturadas (g)	2,48	Ácido pantoténico (mg)	1,273	Fósforo (mg)	198,333
Hidratos de carbono (g)	18,666	Vitamina B6 (mg)	0,606	Magnesio (mg)	43,3
Azúcares (g)	8,476	Vitamina B12 (µg)	0,893	Zinc (mg)	4
Proteínas (g)	11,213	Vitamina C (mg)	96,666	Cobre (µg)	540
Sal (g)	0,153	Vitamina E (mg-αTE)	13,833	Yodo (µg)	25,633
Agua (g)	-	Biotina (µg)	8,366	Selenio (µg)	25,666
Fibra (g)	-	Ácido fólico (µg)	93,666	Molibdeno (µg)	19,866
		Vitamina K (µg)	9,916	Cromo (µg)	13,5
		β-caroteno	-	Manganeso (mg)	1,043
				Fluoruro (mg)	-

1.6 RECURSO MARINO: ALGA PARDA *Ascophyllum nodosum*

Las macroalgas son organismos macroscópicos y multicelulares presentes en ecosistemas marinos y costeros. La composición de estos organismos es rica en polisacáridos, ácidos grasos poliinsaturados, compuestos fenólicos, enzimas y péptidos bioactivos (Shukla et al., 2019) (Lin & Qin, 2014). Se distinguen tres grupos de macroalgas: las algas rojas, pardas y verdes, dependiendo del color predominante de sus pigmentos. Las algas pardas son, dentro de este grupo de organismos fotosintéticos marinos, organismos propios de zonas rocosas intermareales que crecen en latitudes frías o templadas (Charrier et al., 2012). Este tipo de algas, adaptadas a condiciones extremas de salinidad, variación de temperatura y luz, produce compuestos relacionados con el estrés para su supervivencia con gran potencial en aplicaciones agrícolas (Shukla et al., 2019).

En Europa las algas más explotadas son las algas pardas *Laminaria hyperborea*, *Laminaria digitata* y *Ascophyllum nodosum* (EUMOFA, 2018). De esta última se recolectan 0,1 toneladas al año en Europa y es una especie altamente estudiada como fuente de compuestos estimulantes del crecimiento vegetal: sus extractos llevan décadas siendo comercializados como bioestimulantes (Araújo et al., 2021) (Craigie, 2011). Sus efectos promotores se han demostrado sobre diferentes especies y diferentes mecanismos de acción han sido propuestos para entender cómo sus

compuestos estimulan la respuesta vegetal (Shukla et al., 2019). La composición del extracto de *Ascophyllum nodosum* depende de factores como la fase de crecimiento en la que se encuentra el alga, localización, factores ambientales, disponibilidad de los nutrientes o la técnica de extracción empleada (Dobrinčić et al., 2020) (Lakshmi & Meenakshi, 2022).

El empleo de estos extractos ha conseguido efectos como una mayor tolerancia al estrés abiótico, mejora del rendimiento y calidad, mejora en la síntesis de clorofila, mejora de la uniformidad de las frutas, retraso a la senescencia, aceleración de la floración o conservación de vainas de semillas (Sangha et al., 2014) (Łangowski et al., 2019) (Shukla et al., 2019).

La composición típica de los extractos comerciales suele ser rica en polisacáridos sulfatados como laminarina, alginato y fucoidano. El método de extracción más empleado por las empresas es el de extracción a baja temperatura, aunque a veces también emplean extracción suave a baja temperatura sin empleo de reactivos químicos. En ningún caso se ofrece información detallada sobre el método y los parámetros más influyentes. En el campo académico se han realizado numerosos trabajos sobre extracción de compuestos de *Ascophyllum nodosum*. Los métodos de extracción investigados han sido químicos: extracción acuosa, ácida y alcalina; físicos: extracción asistida por ultrasonidos y extracción asistida por microondas; y biológicos: mediante la aplicación de enzimas. En la Tabla 2 se indican los diferentes métodos empleados para la extracción de determinados componentes.

Tabla 2. Métodos de extracción empleados con *Ascophyllum nodosum*. (Elaboración propia)

Compuesto mayoritario	Tipo de extracción	Método de extracción	Referencia
Polifenoles	Física	Asistida por ultrasonidos	(Montes et al., 2021)
Alginato	Química	Ácida	
Alginato	Química	Ácida	(Cebrián-Lloret et al., 2022)
Manitol	Química	Alcalina	(Hiltz, 2020)
Alginato			
Fucoidina			
Laminarina			
Manitol	Física	Acuosa	
Alginato			
Fucoidina			
Laminarina			
Manitol	Química	Ácida	
Alginato			
Fucoidina			

Laminarina			
Manitol	Física	Acuosa	
Alginato			
Fucoidina			
Laminarina			
Fucoidano	Física	Microondas	(Yuan & Macquarrie, 2015)
Alginato	Química	Ácida	
Fucoidano	Química	Ácida	
Alginato	Química	Ácida	
Fenoles	Física	Microondas	(Yuan et al., 2018)
Fenoles	Física	Asistida por ultrasonido	(Kadam et al., 2015)
Fucosa			
Ácido urónico			
Carbohidratos	Biológica	Enzimática	(Carmody et al., 2020)

1.7 FERMENTACIÓN

1.7.1 Definición

Aunque el término “fermentación” se ha empleado tradicionalmente en el contexto bioquímico para definir los procesos de transformación biológica de un sustrato en ausencia de oxígeno (Doelle, 1975), el concepto ha evolucionado y en los campos más técnicos, como la biotecnología o la ingeniería química, el término incluye procesos aerobios y anaerobios en los que unos agentes, los microorganismos, obtienen diferentes productos a partir de la transformación de un sustrato (Chojnacka, 2010) (Tomasik & Horton, 2012).

En este Trabajo Fin de Máster un conjunto de cuatro especies de bacterias fermentará el residuo alimentario descrito anteriormente bajo diferentes parámetros operativos, siendo el producto de interés la propia biomasa que ha empleado los nutrientes del sustrato para su crecimiento y reproducción.

1.7.2 Microorganismos empleados en la fermentación

Parte del interés de este estudio reside en el empleo de cultivos mixtos, cultivos inoculados con dos o más especies de microorganismos que no requieren un control tan exhaustivo como los cultivos puros (Hesseltine, 1992) (Munir & Jamil, 2018). En este caso la formulación que se persigue como producto consta de cuatro especies de bacteria, todas ellas descritas como bacterias promotoras del crecimiento vegetal en la literatura: *Azospirillum brasilense*, *Azotobacter chroococcum*, *Bacillus megaterium* y *Mesorhizobium loti*.

Azospirillum brasilense

Numerosas investigaciones convierten a las bacterias del género *Azospirillum* en unas de las más estudiadas por sus grandes capacidades como promotoras del crecimiento vegetal, con mecanismos como la producción de hormonas, la solubilización del fosfato, fijación del nitrógeno, producción de enzimas, de lipopolisacáridos y mejora de la proliferación de las raíces (Fukami et al., 2018) (Cassán et al., 2020).

La especie *Azospirillum brasilense* es la más investigada dentro del género, presentando todos los mecanismos mencionados. Es un bioestimulante ampliamente comercializado por sus propiedades como promotora y fijadora de nitrógeno atmosférico (Santos et al., 2022). Además, presenta otras propiedades muy interesantes como la mitigación del estrés por sequía (Cassán et al., 2009), por metales pesados (Vazquez et al., 2021) o por salinidad (Romero et al., 2014), y juega también un papel muy interesante en la biorremediación, puesto que se ha documentado su capacidad para transformar hidrocarburos aromáticos policíclicos (Huang et al., 2004) y mitigar la toxicidad en zonas contaminadas con selenio (Vogel et al., 2018) (Tugarova et al., 2020).

Azotobacter chroococcum

La especie *Azotobacter chroococcum* pertenece al género *Azotobacter*, también muy conocido por sus capacidades promotoras del crecimiento vegetal y, como en el caso anterior, género de bacterias fijadoras de nitrógeno no simbióticas (Aasfar et al., 2021). Se ha observado un efecto muy importante en la fijación de nitrógeno por parte de la especie *Azotobacter chroococcum* en diferentes cultivos gracias a la posesión de un clúster de genes que codifican para la enzima nitrogenasa, también presente en *Azospirillum brasilense* (Kaushal, 2019). Romero-Perdomo et al. (2017) estudiaron su efecto sobre un cultivo de algodón controlado en invernadero, consiguiéndose reducir la dosis de nitrógeno en un 50 % (Felipe Romero-Perdomo et al., 2017). *Azotobacter chroococcum* es capaz de producir auxinas y presenta la propiedad de solubilizar fosfato y zinc (Kumar & Narula, 1999) (Aasfar et al., 2021). Su inoculación mejora el índice de germinación en cultivos como la soja, el arroz y el algodón (Ramzan et al., 2021). Otras propiedades como la mitigación del estrés salino (Abdel et al., 2020) y la producción de sideróforos –moléculas que permiten transportar y transformar el hierro en formas asimilables para las plantas y otros microorganismos del suelo– también han sido estudiadas (Zhang et al., 2019).

Destaca también su propiedad como agente de biocontrol: se ha documentado su capacidad de producir compuestos antifúngicos (Mali et al., 2011) y posee potencial como inhibidor de huevos de insectos, disminuyendo y alterando la capacidad de estos de poner huevos, el porcentaje de pupas que nacen y el desarrollo de estas hacia la madurez (Ramzan et al., 2021).

Bacillus megaterium

La especie *Bacillus megaterium*, del género *Bacillus*, es una bacteria Gram-positiva de gran tamaño (Eppinger et al., 2011). Una de sus principales propiedades, que comparte con otras bacterias de su género, es su capacidad de sobrevivir en medios extremos gracias a la formación de esporas (Emmert & Handelsman, 1999) (Trivedi & Pandey, 2008), lo que resulta interesante en su empleo como microorganismo bioestimulante en condiciones de estrés abiótico (Zhou et al., 2016).

La especie *Bacillus megaterium* posee capacidad para solubilizar fosfatos, mejorar la accesibilidad de minerales, producir auxinas, e inhibir el crecimiento de fitopatógenos (Trivedi & Pandey, 2008) (Zhao et al., 2021). Nascimento et al. (2020), además de corroborar estas características, determinaron también la capacidad de producción de citoquinas, etileno y enzimas, y estudiaron el potencial de su genoma, descubriendo la presencia de genes de gran interés en términos de resistencia y biorremediación. Se ha demostrado la propiedad de esta bacteria de degradar ciertos tintes, herbicidas e incluso dioxinas (Shah, 2014) (Carles et al., 2016) (Hanano et al., 2019).

Mesorhizobium loti

La especie *Mesorhizobium loti*, anteriormente conocida como *Rhizobium loti*, es una especie fijadora de nitrógeno asociada a las raíces de las plantas (Poitout et al., 2017). Este género de bacterias es conocido por ser, además de fijadores de nitrógeno, grandes solubilizadores de fosfato (Chandra et al., 2007) (Imen et al., 2015). Algunas cepas han demostrado poseer capacidad para producir sideróforos, ácido cianhídrico para disminuir la actividad patógena, y auxinas (Brígido et al., 2017) (Chandra et al., 2007). La bacteria *Mesorhizobium loti* no solo produce auxinas como fitohormona, como se ha mencionado, sino que también produce hasta cuatro tipos de citoquinas que mejoran el área superficial de la raíz promoviendo el crecimiento de las raíces laterales (Swarnalakshmi et al., 2020) (Poitout et al., 2017).

Su actividad promotora también ha sido evaluada en sistemas contaminados con metales pesados, observándose la síntesis de ácido indolacético (hormona de clase auxina) en presencia de cobre y otros metales (Vieira et al., 2017) (Brígido et al., 2017), por lo que su tolerancia resulta interesante para estrategias de biorremediación.

1.8 EXTRACCIÓN DE COMPUESTOS DE LA MACROALGA ASISTIDA POR MICROONDAS

Entre los diferentes métodos de extracción que se emplean con macroalgas se ha optado por la extracción asistida por microondas, conocida en la literatura como MAE por sus siglas en inglés

(*Microwave Assisted Extraction*), por el gran potencial que presenta en relación con el empleo de reactivos, el tiempo empleado y su rendimiento.

La extracción asistida por microondas es un método de gran interés por su bajo impacto medioambiental (Michalak et al., 2015). Una vez seca, el alga se mezcla con agua u otro solvente apto que es calentado por radiación microondas no ionizante. Esta radiación suministrada, con frecuencia de 300 MHz a 300 GHz, permite extraer los compuestos de interés mediante la transferencia de la energía a la solución (Kadam et al., 2013).

La energía transferida a la solución provoca el aumento de su temperatura a través de un mecanismo de conducción iónico y de rotación de dipolo, de manera que los puentes de hidrógeno se rompen y los iones disueltos migran, mejorando la penetración del solvente en la matriz y, por tanto, la extracción (Flórez-Fernández et al., 2018) (Kadam et al., 2013).

En comparación con otros métodos requiere menos tiempo y consigue una separación selectiva por la que se han conseguido extraer fucooidanos, alginato sódico, carotenoides, azúcares, compuestos fenólicos y minerales (Kadam et al., 2013) (Shukla et al., 2019). Su velocidad de extracción es mayor y emplea menor cantidad de solvente. Sin embargo, requiere de un proceso de separación posterior y no es válido para bioactivos termosensibles (Wang & Weller, 2006).

La extracción de *Ascophyllum nodosum* con microondas ha sido documentada dos veces en literatura, por Yuan y Macquarrie, en 2015, y por Yuan et al. en 2018. Sin embargo, en ambos estudios el objetivo es separar y fraccionar los compuestos hasta obtener un compuesto final de interés. Para la obtención de un extracto con potencial bioestimulante objetivo de este TFM se prefiere emplear el extracto resultante rico en varios compuestos orgánicos, por lo que no se realizará el método propuesto en estos estudios, sino el llevado a cabo por Michalak et al. (2015), que obtiene un extracto directamente a partir de la extracción asistida por microondas de algas rojas y verdes empleando únicamente agua como solvente.

2. HIPÓTESIS

La necesidad de sustituir el empleo de los fertilizantes convencionales y minimizar el impacto ambiental que llevan asociados, en combinación con la propuesta de un nuevo modelo económico centrado en el empleo de los recursos biomásicos de manera sostenible, favorecen a la búsqueda de nuevas alternativas sostenibles y de origen biológico que supongan una mejora en la agricultura y una contribución similar o mejorada en el rendimiento vegetal. El empleo de un residuo alimentario como los alimentos destinados a usos médicos especiales caducados para la producción de nuevos productos supone la revalorización de este y un cierre circular a su ciclo de vida. El empleo de recursos marinos como las macroalgas, por otro lado, potencia la explotación de una línea poco conocida hasta el momento y con gran potencial para comenzar a gestionar los recursos marinos en nombre de la bioeconomía azul.

La composición del residuo alimentario resulta muy interesante desde un punto de vista nutritivo, y es por ello que se espera que sea un buen medio nutritivo para la producción de microorganismos promotores del crecimiento vegetal.

Los diferentes componentes del alga parda *Ascophyllum nodosum* también poseen características bioestimulantes muy interesantes, por lo que se espera que una formulación obtenida por métodos de extracción eficientes como la propuesta, la extracción asistida por microondas, pueda funcionar también como un estimulante del crecimiento y desarrollo vegetal.

Cabe esperar que la aplicación de estos bioestimulantes, los microorganismos y el extracto del alga, sobre las plantas consiga una buena diferenciación en el crecimiento de estas frente a los casos en los que no se realiza tratamiento.

3. OBJETIVOS

El principal objetivo de este Trabajo Fin de Máster es la propuesta de dos métodos de producción de bioestimulantes a partir de dos materias primas diferentes, un residuo alimentario y un recurso marino, con el fin de aprovechar eficientemente esta biomasa de manera simple y con bajo impacto ambiental en la empresa Séneca Green Catalyst S.L.

Para ello, en el caso del residuo alimentario, se realizará una fermentación con un cultivo mixto de bacterias (*Azospirillum brasilense*, *Azotobacter chroococcum*, *Bacillus megaterium* y *Mesorhizobium loti*) donde el propio residuo haga la función de fuente de nutrientes investigando la influencia de los parámetros operativos en la producción óptima de biomasa. El empleo de reactivos químicos se minimiza, al tratarse de un método biológico, y no se produce ninguna corriente de residuos, puesto que todo el producto resultante se emplea como bioestimulante.

En el caso del recurso marino, el alga parda *Ascophyllum nodosum*, se realizará una extracción asistida por microondas, empleando como solvente agua y evitando por tanto procesos de separación de solventes posterior y la energía y el uso de otros reactivos que supone.

Para ambos casos, se propone también un método de aplicación en plantas para comprobar su validez como agentes promotores del crecimiento vegetal.

Con el fin de conseguir este objetivo principal, se establecen como objetivos específicos la búsqueda bibliográfica de métodos relacionados con la producción de bioestimulantes a partir de recursos similares a los propuestos y el análisis de los trabajos de investigación hallados.

4. PLAN DE TRABAJO

Las tareas que se llevarán a cabo en esta propuesta científico-técnica quedan definidas en el siguiente plan de trabajo:

Tarea 1. Obtención del residuo alimentario.

Tarea 2. Obtención y activación del inóculo.

Tarea 3. Preparación del medio mediante la dilución del residuo.

Tarea 4. Inoculación y posterior fermentación del medio bajo diferentes parámetros de aireación, ratio de inoculación y ratio de sólido-líquido.

Tarea 5. Repetición de la inoculación y la fermentación bajo los parámetros óptimos determinados.

Tarea 6. Medición de la concentración de bacterias y el rendimiento de la fermentación.

Tarea 7. Obtención y acondicionamiento del alga *Ascophyllum nodosum*.

Tarea 8. Extracción de los compuestos del alga mediante microondas a diferentes tiempos y temperaturas.

Tarea 9. Medición de la presencia de compuestos fenólicos.

Tarea 10. Realización de ensayos en plantas. El extracto del alga y la formulación rica en bacterias se aplican a *Arabidopsis thaliana* de manera separada y se evalúan las diferencias en su crecimiento frente al crecimiento de plantas con tratamiento control.

A continuación se muestran las actividades que componen el plan de trabajo para los proyectos propuestos en un periodo de 6 semanas mediante un diagrama de Gantt (Tabla 3).

Tabla 3. Plan de trabajo.

Tareas	Semana 1							Semana 2							Semana 3							Semana 4							Semana 5							Semana 6									
	1	2	3	4	5	6	7	1	2	3	4	5	6	7	1	2	3	4	5	6	7	1	2	3	4	5	6	7	1	2	3	4	5	6	7	1	2	3	4	5	6	7			
Tarea 1	■	■	■	■	■	■																																							
Tarea 2							■									■																													
Tarea 3								■									■																												

Tarea 4																																					
Tarea 5																																					
Tarea 6																																					
Tarea 7																																					
Tarea 8																																					
Tarea 9																																					
Tarea 10																																					

5. METODOLOGÍA

5.1 BIOESTIMULANTE A PARTIR DE RESIDUO ALIMENTARIO

5.1.1 *Reactivos*

Las muestras de alimentos caducados destinados a usos médicos especiales han sido cedidos a la empresa Séneca Green Catalyst S.L desde empresas productoras, cuyo nombre se mantiene oculto por cuestiones de confidencialidad, con el interés de poder encontrarle una salida al residuo alimentario que generan.

Las cepas de las cuatro especies de bacterias propuestas provienen de una formulación comercial cedida a la empresa Séneca Green Catalyst S.L con motivo de los experimentos. Por la misma cuestión comentada en el párrafo anterior, el nombre de la marca y el producto se mantiene oculto por confidencialidad.

El medio de cultivo propuesto para poder contar las unidades formadoras de colonias en placas es el TSA (Agar-Triptona-Soja), compuesto por digerido enzimático de caseína, digerido enzimático de soja, cloruro de sodio y agar. Todos estos compuestos se adquieren de la marca Sigma-Aldrich de Merck. Para la activación del inóculo se propone emplear ácido clorhídrico, también de la marca Sigma-Aldrich.

Para los ensayos propuestos en planta se emplean semillas de *Arabidopsis thaliana* (ecotipo Columbia-0) obtenidas del Nottingham Arabidopsis Stock Centre (NASC).

La preparación del medio y la medida de la concentración de unidades formadoras de colonias requieren del empleo agua destilada estéril.

5.1.2 *Equipamiento e instrumentación*

Los materiales necesarios para llevar a cabo los experimentos propuestos se encuentran presentes en numerosos laboratorios, no siendo exclusivos de un único campo de investigación. Entre ellos, se propone el empleo de matraces Erlenmeyer de diferentes volúmenes, placas de Petri, un mechero Bunsen para evitar o disminuir la contaminación, micropipetas, tubos Eppendorf® y tubos para centrífugas Falcon®.

Para la etapa de propagación y fermentación, donde el control de la temperatura y la agitación es importante, se emplea un baño de agua agitado. Los frascos en los que vaya a investigar el efecto de la aireación contendrán un pequeño tubo conectado a una bomba de aireación portátil.

Finalmente, para medir la concentración de biomasa al inicio y final de la fermentación se propone emplear una centrífuga.

5.1.3 Preparación del inóculo

Diseño experimental

Se realiza un único experimento para la activación de las bacterias de interés contenidas en la formulación comercial. Esta activación se lleva a cabo mediante un cambio en el pH.

La concentración de las bacterias se mide por duplicado para comprobar que es aceptable como inóculo.

Activación del inóculo

En dos matraces Erlenmeyer de 300 ml se añade un volumen de 205 ml de la formulación líquida de *Azospirillum brasilense*, *Azotobacter chroococcum*, *Bacillus megaterium* y *Rhizobium loti* y 10 ml de una disolución de HCl al 5 % (v/v) para conseguir su activación. Tras un día de incubación a 30 °C, temperatura adecuada para el crecimiento de todas estas bacterias de interés (Chen et al., 2015) (Romero-Perdomo et al., 2015) (Belal & Hassan, 2013) (Damir et al., 2011), se miden las concentraciones de las bacterias empleando una placa Petri con el medio no selectivo TSA con 1,5 % de agar esterilizado. Para ello se prepara primero una dilución 1:10 con 1 ml de la formulación líquida y 9 ml de agua estéril y, tras su homogenización, 1 ml es traspasado a la placa de Petri, donde se realiza la siembra. Tras 24 horas de incubación a 30 °C las colonias se cuentan y se calcula la concentración empleando el factor de dilución. En caso de que no se distingan las colonias se realizará una segunda dilución. En todo momento se trabaja con un mechero Bunsen o de alcohol para limitar la contaminación.

$$\frac{UFC}{ml} = \frac{Colonias\ enumeradas}{ml\ sembrados} \times Factor\ de\ dilución$$

5.1.4 Fermentación

Diseño experimental

El objetivo de estos experimentos es estudiar la influencia de los parámetros aireación, concentración de residuo alimentario y ratio de inoculación en la fermentación. Para ello se fija una temperatura (30 °C), una velocidad de agitación (150 r.p.m) y un tiempo de fermentación de 96 horas en el que se irá midiendo la concentración de microorganismos para poder evaluar el crecimiento de la bacteria por día.

En concreto, se emplearán ratios de aireación de 0, 1 y 1,5 vvm combinados con ratios de inoculación de 5 y 10 % (v/v). La fuente de nutrientes es el residuo alimentario en formato líquido que se empleará en tres concentraciones: 3, 5 y 10 % (v/v). Para ello se lleva a cabo el método propuesto por Zhu et al. (2020) con pequeñas modificaciones. El número de experimentos necesarios es 18. Para el alcance de este estudio, que busca evaluar los mejores parámetros de

crecimiento de las bacterias y que consta de un tiempo muy limitado, no se consideran necesarias las réplicas, aunque en un estudio más avanzado y detallado conviene realizarlas.

Fermentación

El subproducto alimentario líquido de interés se diluye en tres concentraciones diferentes, de 3, 5 y 10 % (v/v), con agua estéril. La disolución resultante es la fuente de todos los nutrientes necesarios para el crecimiento de las bacterias y se añade a los matraces. La fermentación se realiza en discontinuo con matraces Erlenmeyer de 500 ml, siendo el volumen útil de 300 ml. La temperatura se mantiene constante a 30 °C mediante la introducción de los matraces en un baño de agua con agitación de 150 r.p.m. Las bocas de los matraces se tapan con Parafilm, dejando tan solo un pequeño hueco para la entrada de los tubos difusores en los experimentos en los que se añade aireación.

Los matraces se inoculan en ratios de 5 y 10 % (v/v) y se aplica aireación con un flujo de 0, 1 y 1,5 vvm. La inoculación se realiza cerca de un mechero para minimizar el riesgo de contaminación.

Cada día hasta las 96 horas se extrae un mililitro de cada experimento con el que, tras una dilución 1:10 o 1:100, se realiza una siembra en medio TSA para medir las unidades formadoras de colonias por ml.

Adicionalmente, el primer y último día se extraen 10 ml de los matraces para centrifugarlos a 12000 g. El sobrenadante se descarta y el sólido se seca en una estufa para medir el peso seco de biomasa y obtener así la concentración de biomasa por ml.

Rendimiento específico de la biomasa =

$$\frac{(Concentración\ final \times Volumen\ final) - (Concentración\ inicial \times Volumen\ inicial)}{Concentración\ inicial \times Volumen\ inicial}$$

El experimento cuyas condiciones han sido las óptimas para el crecimiento de las bacterias se repite y el medio resultante, fuente de bacterias y otros compuestos resultantes de la transformación de la materia prima original, se emplea sobre plantas para analizar su efecto bioestimulante.

El esquema del proceso propuesto queda representado en el siguiente diagrama de bloques (Figura 1):



Figura 1. Diagrama de bloques de la producción del bioestimulante.

5.1.5 Ensayos en plantas

Diseño experimental

Para el ensayo con plantas se emplean nueve experimentos. Tres corresponden al medio de fermentación en la fase óptima de crecimiento de la bacteria, mientras que otros tres sirven como control negativo (sin fertilizante) y tres como control positivo (fertilizante comercial). Para ello, se emplean 18 semillas de *Arabidopsis thaliana*, de las que finalmente se seleccionan 9 plantas germinadas.

Ensayo sobre el crecimiento vegetal

Los ensayos se realizan según la técnica descrita por Rayorath et al. (2008) con la especie *Arabidopsis thaliana*, planta modelo. Se cultivan dos semillas de la planta por cada unidad de pellet de turba (el sustrato en estos experimentos). Las condiciones del cultivo son de una temperatura constante de 22 °C, con el doble de horas de luz que de oscuridad (16 frente a 8) y humedad del 65 %. Las semillas se riegan cada día y a la semana se deja solo una planta germinada por pellet, las más uniformes, para finalmente pasar los pellets a macetas.

Las plantas se riegan con 10 ml de la solución pasados 7 días de la germinación y se mantiene el tratamiento cada semana durante tres. Las plantas se riegan alternadamente con agua destilada para que mantengan una humedad óptima. Tras cuatro semanas la altura de las plantas y el número de hojas son medidos.

5.2 BIOESTIMULANTE A PARTIR DEL ALGA *Ascophyllum nodosum*

5.2.1 Reactivos

El alga *Ascophyllum nodosum* ha sido obtenida de una empresa de Irlanda cuyo nombre se mantiene oculto por cuestiones de confidencialidad con la empresa Séneca Green Catalyst S.L.

Aunque en la extracción asistida por microondas no se emplearán reactivos químicos más allá del agua desionizada, para el análisis de compuestos fenólicos propuesto se emplean los reactivos ácido gálico, metanol y el reactivo del fenol Folin-Ciocalteu. El ácido gálico y el reactivo de

Folin-Ciocalteu se consiguen de la marca comercial Sigma-Aldrich de Merck, mientras que el metanol se obtiene de la marca Labkem.

Al igual que en la línea del residuo alimentario, en esta línea se emplearán semillas de *Arabidopsis thaliana* (ecotipo Columbia-0) obtenidas del Nottingham Arabidopsis Stock Centre (NASC) para los ensayos propuestos en plantas.

5.2.2 Equipamiento e instrumentación

Para la realización de los experimentos propuestos se necesitan materiales típicos de un laboratorio de investigación, como papel de filtro, un embudo de filtración, vasos de precipitado y tubos de ensayo.

Para la extracción, es necesario un microondas focalizado. Será necesaria también una centrífuga con el fin de eliminar el sólido una vez acabada la extracción.

El análisis de compuestos fenólicos propuesto requiere de un baño de agua y un espectrofotómetro con un rango de onda de 190-1100 nm para poder realizar correctamente la medida y obtener las concentraciones.

5.2.3 Extracción asistida por microondas

Diseño experimental

Con el objetivo de determinar la influencia del tiempo y la temperatura en la extracción de sus compuestos mediante la aplicación de microondas se proponen diferentes experimentos en medio acuoso a dos tiempos (15 y 30 minutos) y tres temperaturas (25, 40 y 60 °C), en base a la investigación con algas rojas y verdes llevada a cabo por Michalak et al. (2015). Cada extracción se realiza por triplicado, realizando un total de 18 experimentos.

Extracción asistida por microondas

El alga *Ascophyllum nodosum*, molida y tamizada previamente hasta poseer un tamaño de partícula inferior a 3 mm, se mezcla con agua desionizada en una relación sólido-líquido de 1:3, empleándose 5 gramos del alga y 15 ml de agua. Preparada la mezcla, esta se coloca en el recipiente más adecuado para el empleo de microondas y se somete a una potencia de 1000 W bajo unos tiempos de 15 y 30 minutos y tres temperaturas de extracción distintas: 25, 40 y 60 °C.

Terminada la extracción, las mezclas se centrifugan durante 5 minutos a una velocidad de rotación de 4250 r.p.m para finalmente ser filtradas con papel de filtro y emplear el sobrenadante resultante como bioestimulante.

El proceso propuesto queda representado a continuación (Figura 2):

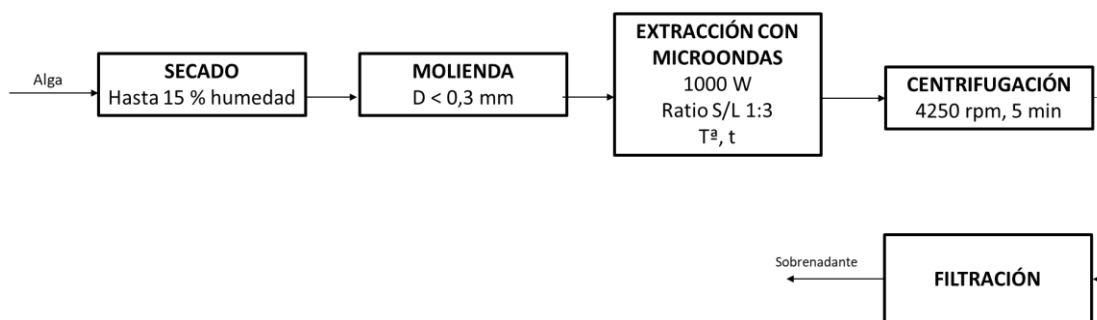


Figura 2. Diagrama de bloques de la producción del bioestimulante.

5.2.4 Análisis de compuestos fenólicos

Se sigue el método descrito por Sim et al. (2010) con las modificaciones realizadas por Michalak et al. (2015). Se realiza una recta de calibrado empleando ácido gálico como estándar con una concentración desde 25 a 1000 mg/L. Se preparan volúmenes de la solución stock de ácido gálico de 0,005 a 0,2 ml y se completa el volumen final hasta 1 ml con metanol. De cada muestra de la solución y el negativo se toma 0,1 ml y se mezcla con 7,9 ml de agua destilada y 0,5 ml del reactivo del fenol Folin-Ciocalteu. Pasados tres minutos se añade 1,5 ml de Na_2CO_3 saturado (30 %) a cada tubo y se incuban 30 minutos a 40 °C. La medida de la absorbancia se realiza en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 764 nm.

De las muestras a analizar, de concentraciones diluidas, y el control se emplea 0,1 ml que se mezcla con 7,9 ml de agua destilada y 0,5 ml del reactivo Folin-Ciocaltu. De nuevo, se esperan 3 minutos y se añaden 1,5 ml de carbonato de sodio. Antes de medir la absorbancia, se incuban a 40 °C durante 30 minutos. Las muestras se analizan por triplicado.

5.2.5 Ensayos en plantas

Diseño experimental

Por motivos de tiempo se emplearán las seis muestras de extractos sin sus réplicas. Sus concentraciones se diluirán hasta obtener una muestra del 5, 10 y 15 % de cada extracto. Por tanto, se trabajan 18 experimentos junto con otros tres de control negativo y tres de control positivo, necesitando en un principio 48 semillas de *Arabidopsis thaliana*, de las que, tras la germinación, se seleccionarán 24.

Ensayo sobre el crecimiento vegetal

Los ensayos se realizan según la técnica descrita por Rayorath et al. (2008) con la especie *Arabidopsis thaliana*. Se cultivan dos semillas de la planta por cada unidad de pellet de turba. Como en el caso anterior, las condiciones del cultivo son de una temperatura constante de 22 °C,

con el doble de horas de luz que de oscuridad y humedad del 65 %. Las plantas se riegan cada día y a la semana se deja solo una planta por pellet que acabará traspasándose a maceta.

Los extractos de alga obtenidos se diluyen, probando tres concentraciones (5, 10 y 15 %). Las plantas se riegan con 10 ml de la solución con el extracto 7 días tras la germinación y se mantiene el tratamiento durante tres semanas. Las plantas se riegan de manera alternada con agua destilada para que mantengan una humedad óptima. Tras cuatro semanas se mide y cuentan la altura de las plantas y el número de hojas.

6. RESULTADOS Y BENEFICIOS ESPERABLES

6.1 RESULTADOS ESPERABLES

6.1.1 Bioestimulante a partir de residuo alimentario

Aunque no existen investigaciones previas que empleen alimentos destinados a usos médicos especiales como medio de cultivo microbiológico, es de esperar que los microorganismos crezcan adecuadamente en él, dado que presenta los componentes más comunes de un medio estándar de cultivo (nitrógeno, factores de crecimiento, fuentes de energía, sales y metales) (Zimbro & Power, 2009). Ante la escasez de datos relacionados con el empleo de este tipo de residuo se han examinado resultados obtenidos de fermentaciones en estado líquido con otro tipo de residuos orgánicos, como mezclas de residuos alimentarios o la fracción orgánica de los residuos sólidos urbanos, que, aunque no presentan el mismo contenido nutricional, coinciden en gran parte de su composición y sirven como orientación para la predicción de un adecuado crecimiento por parte de las bacterias. Los resultados obtenidos con estas materias primas son positivos, consiguiéndose el crecimiento de distintos microorganismos (hongos, levaduras y bacterias) en presencia y ausencia de oxígeno y en rendimientos, en los casos en los que se especifica en bibliografía, del rango de 10^7 y 10^{10} unidades formadoras de colonia o conidios por mililitro (Yu et al., 2015) (Hapsöh et al., 2020) (Lakhal et al., 2017) (Siregar & Raharjo, 2017) (Zhu et al., 2020).

A pesar de su prometedora composición, el medio ha de diluirse para evitar una saturación que inhiba el crecimiento (Liu, 2017). Es difícil conocer cuál de las proporciones residuo-agua empleadas es la ideal para la propagación, y la falta de investigaciones previas dificulta la proposición de una hipótesis más favorable que otra. Lo ideal, desde un punto de vista económico, es que el conjunto de bacterias empleado presente su crecimiento óptimo en el medio más diluido, puesto que supondría una mayor producción de la formulación bioestimulante al poder emplear un mayor volumen de medio. Sin embargo, dado que la densidad del medio menos diluido no es extremadamente elevada, los microorganismos podrían crecer y alcanzar el máximo crecimiento en este medio al tener mayor accesibilidad a los nutrientes. En una fermentación así, tras muchos días, la velocidad de crecimiento de los microorganismos comenzaría a disminuir por el aumento de la densidad celular en el medio y las limitaciones que esto supone (aumento de presión osmótica, viscosidad y limitación de la transferencia de oxígeno) (Bunch, 1994) (Subramaniam et al., 2018), sin embargo, como se trata de un experimento de optimización del crecimiento, el resultado más interesante es el tiempo de fermentación en el que se consigue el máximo crecimiento, tiempo en el que se frenará la fermentación y se aplicará el producto a las plantas.

En cuanto al crecimiento bajo diferentes ratios de aireación, se espera obtener mejores resultados en los experimentos que emplean el flujo de 1 y 1,5 vvm que en los que no se aplica aireación. Aunque la especie *Azospirillum brasilense* puede crecer bajo condiciones aerobias y anaerobias, *Azotobacter chroococcum*, *Bacillus megaterium* y *Mesorhizobium loti* necesitan la presencia de

oxígeno para su crecimiento (Dasgupta et al., 2021) (Robson et al., 2015) (Goswami et al., 2018) (Kelly et al., 2014).

Dado que se trata de unos experimentos preliminares para encontrar los parámetros óptimos y no para la estandarización de un producto, la concentración de cada cepa en la formulación final no se considerará importante en esta primera etapa, aunque cabe esperar que los cuatro tipos de bacterias se encuentren presentes y hayan fermentado el medio con éxito.

En relación con los ensayos en *Arabidopsis thaliana*, tampoco se puede predecir con qué formulación de los microorganismos se favorecerá más el crecimiento vegetal. Desde un punto de vista técnico y económico, como se comentaba antes, conseguir el crecimiento óptimo con el producto elaborado a partir del medio más diluido sería la opción más interesante. De cualquier manera, si no se produce contaminación fitopatógena, es esperable que las plantas consigan aumentar su rendimiento frente a las plantas control por la aplicación de bacterias ampliamente reconocidas como promotoras del crecimiento vegetal.

6.1.2 Bioestimulante a partir del alga *Ascophyllum nodosum*

Los extractos de *Ascophyllum nodosum* han sido comercializados para aplicaciones agrícolas durante años, por lo que es de esperar que los extractos obtenidos a partir de la aplicación de microondas provoquen un efecto positivo, en mayor o menor medida, en las plantas.

El efecto provocado dependerá de los compuestos que se hayan conseguido obtener y del rendimiento de extracción de la técnica empleada, en este caso la Extracción Asistida por Microondas. No es sencillo predecir qué combinación de los parámetros analizados proporcionará un extracto más rico en compuestos bioestimulantes en base a la bibliografía existente. Yuan et al. (2018) y Yuan y Macquarrie (2015), en sus respectivos estudios, consiguen la mayor extracción de compuestos a partir de *Ascophyllum nodosum* a los 15 minutos y a una temperatura superior a las empleadas (110 y 120 °C). Sin embargo, las investigaciones no son comparables a la propuesta, puesto que el interés final no es el mismo, ni tampoco lo son los reactivos y disolventes empleados en la extracción.

El interés de la propuesta realizada, desde un punto de vista técnico, ambiental y económico, es el de poder extraer compuestos que promuevan el crecimiento vegetal en un proceso que no emplee reactivos químicos nocivos y que utilice unas condiciones suaves. Es por ello que las condiciones propuestas son las seleccionadas por Michalak et al. (2015) en su estudio, más suaves y con agua como solvente para realizar una extracción asistida por microondas con el objetivo de producir un extracto aplicable a cultivos. Aunque las materias primas empleadas en esta investigación y en la propuesta son diferentes, puesto que se emplean algas rojas y verdes frente

al alga parda de interés, se espera que los resultados con *Ascophyllum nodosum* no se distancien mucho de estos, donde la extracción de polifenoles mejora a temperaturas más bajas.

Con respecto a los ensayos en *Arabidopsis thaliana*, resulta complejo predecir qué dilución del extracto promoverá mejor o peor el crecimiento vegetal. Al igual que en el caso anterior, la posibilidad de poder obtener un producto eficaz muy diluido supone una ventaja económica para la empresa. Sin embargo, dado que en este tipo de bioestimulante no se emplean organismos vivos, sino compuestos, la adición de un producto muy diluido puede dar poco o ningún resultado deseable.

6.2 BENEFICIOS ESPERABLES

La búsqueda de prácticas más sostenibles en la agricultura abre las puertas a la producción de nuevos productos de alto valor añadido que aminoren el estrés al que está sometido el suelo. El uso de biofertilizantes y bioestimulantes no solo permite disminuir la cantidad de fertilizantes convencionales que se emplea actualmente y su impacto, sino que promete una mejora del rendimiento vegetal, participando directamente en la estrategia de *land sparing* y permitiendo así una posible disminución del uso del suelo en el futuro.

El empleo de residuos y recursos poco explotados hasta el momento permite, además de disminuir el impacto ambiental que su vertido supone, ser más eficientes en los procesos de producción actuales y colaborar en el concepto de circularidad que la economía, y en concreto la bioeconomía, persigue.

La producción de bioestimulantes a partir de residuos alimentarios y algas pardas propuesta en este documento busca resolver una parte de los retos a los que la agricultura se enfrenta y permitir que los cultivos andaluces muestren una mayor resiliencia ante los futuros cambios que se puedan presentar en materia de escasez nutrientes y estreses abióticos y bióticos.

6.2.1 Perspectivas de futuro

Aunque prometedores, aún existen limitaciones en el empleo de bioestimulantes que deben ser solucionadas. Una de las más importantes es la capacidad de adaptación de las bacterias al terreno donde se aplica. La investigación actual en este sentido se centra en la selección y empleo de microorganismos promotores del crecimiento vegetal propios de la zona donde se desean aplicar (Aloo et al., 2021).

La vida de almacenamiento es otro limitante en la comercialización de estos productos. Aunque estos problemas no existen, o no son tan comunes, en sustancias procedentes de algas o de origen

botánico, los microorganismos van muriendo en la solución con el paso del tiempo, reduciendo su rendimiento si es aplicado mucho más tarde de su adquisición (Brar et al., 2012). Como solución a este problema, actualmente las investigaciones se centran en su liofilización o en su microencapsulación en esferas de biopolímeros (John et al., 2011).

La posibilidad de emplear ingeniería genética con los microorganismos promotores del crecimiento vegetal no solo ayudaría a superar estas barreras, sino que permitiría conceder al microorganismo nuevas propiedades y mayor resistencia (Chaudhary et al., 2021). Sus consecuencias, sin embargo, son aún impredecibles, pudiendo causar más problemas que soluciones por transferencia de genes. La opinión pública tampoco se posiciona actualmente a favor de microorganismos modificados genéticamente.

7 BIBLIOGRAFÍA

- Aasfar, A., Bargaz, A., Yaakoubi, K., Hilali, A., Bennis, I., Zeroual, Y., & Meftah Kadmiri, I. (2021). Nitrogen Fixing Azotobacter Species as Potential Soil Biological Enhancers for Crop Nutrition and Yield Stability. *Frontiers in Microbiology*, 12(February), 1–19. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.628379>
- Abdel, A. A. H. L., Abu Alhmad, M. F., Kordrostami, M., Abo-Baker, A. B. A. E., & Zakir, A. (2020). Inoculation with Azospirillum lipoferum or Azotobacter chroococcum Reinforces Maize Growth by Improving Physiological Activities Under Saline Conditions. *Journal of Plant Growth Regulation*, 39(3), 1293–1306. <https://doi.org/10.1007/s00344-020-10065-9>
- Ahemad, M., & Kibret, M. (2014). Mechanisms and applications of plant growth promoting rhizobacteria: Current perspective. *Journal of King Saud University - Science*, 26(1), 1–20. <https://doi.org/10.1016/j.jksus.2013.05.001>
- Aloo, B. N., Makumba, B. A., & Mbega, E. R. (2021). Status of biofertilizer research, commercialization, and practical applications: A global perspective. In *Biofertilizers*. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-821667-5.00017-8>
- Ammar, E. E., Aioub, A. A. A., Elesawy, A. E., Karkour, A. M., Mouhamed, M. S., Amer, A. A., & EL-Shershaby, N. A. (2022). Algae as Bio-fertilizers: Between Current situation and Future prospective. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 29, 3083–3096. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2022.03.020>
- Araújo, R., Vázquez Calderón, F., Sánchez López, J., Azevedo, I. C., Bruhn, A., Fluch, S., Garcia Tasende, M., Ghaderiardakani, F., Ilmjärv, T., Laurans, M., Mac Monagail, M., Mangini, S., Peteiro, C., Rebours, C., Stefansson, T., & Ullmann, J. (2021). Current Status of the Algae Production Industry in Europe: An Emerging Sector of the Blue Bioeconomy. *Frontiers in Marine Science*, 7(January), 1–24. <https://doi.org/10.3389/fmars.2020.626389>
- Barros-Rodríguez, A., Rangseekaew, P., Lasudee, K., Pathom-aree, W., & Manzanera, M. (2020). Regulatory risks associated with bacteria as biostimulants and biofertilizers in the frame of the European Regulation (EU) 2019/1009. *Science of the Total Environment*, 740, 140239. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.140239>
- Battacharyya, D., Babgohari, M. Z., Rathor, P., & Prithiviraj, B. (2015). Seaweed extracts as biostimulants in horticulture. *Scientia Horticulturae*, 196, 39–48. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2015.09.012>
- Belal, E., & Hassan, N. (2013). Dissipation of pendimethalin by Bacillus megaterium. *Journal of Plant Protection and Pathology*, 4(5), 463–472.

<https://doi.org/10.21608/jppp.2013.87394>

- Blunden, G. (1991). Agricultural uses of seaweeds and seaweed products. In *Seaweed Resources in Europe: Uses and Potential* (pp. 65–81). John Wiley and Sons.
- Brahmaprakash, G. P., & Sahu, P. K. (2012). Biofertilizers for sustainability. *Journal of the Indian Institute of Science*, 92(1), 37–62.
- Brar, S. K., Jyoti, S., & Chaabouni, E. (2012). Shelf-life of Biofertilizers: An Accord between Formulations and Genetics. *Journal of Biofertilizers & Biopesticides*, 03(05).
<https://doi.org/10.4172/2155-6202.1000e109>
- Brígido, C., Glick, B. R., & Oliveira, S. (2017). Survey of Plant Growth-Promoting Mechanisms in Native Portuguese Chickpea Mesorhizobium Isolates. *Microbial Ecology*, 73(4), 900–915. <https://doi.org/10.1007/s00248-016-0891-9>
- Bunch, A. W. (1994). High cell density growth of microorganisms. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews*, 12(1), 535–561. <https://doi.org/10.1080/02648725.1994.10647921>
- Carles, L., Besse-Hoggan, P., Joly, M., Vigouroux, A., Moréra, S., & Batisson, I. (2016). Functional and structural characterization of two *Bacillus megaterium* nitroreductases biotransforming the herbicide mesotrione. *Biochemical Journal*, 473(10), 1443–1453.
<https://doi.org/10.1042/BJ20151366>
- Carmody, N., Goñi, O., Łangowski, Ł., & O’Connell, S. (2020). *Ascophyllum nodosum* Extract Biostimulant Processing and Its Impact on Enhancing Heat Stress Tolerance During Tomato Fruit Set. *Frontiers in Plant Science*, 11(June).
<https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00807>
- Case, S. D. C., Oelofse, M., Hou, Y., Oenema, O., & Jensen, L. S. (2017). Farmer perceptions and use of organic waste products as fertilisers – A survey study of potential benefits and barriers. *Agricultural Systems*, 151, 84–95. <https://doi.org/10.1016/j.agsy.2016.11.012>
- Cassán, F., Coniglio, A., López, G., Molina, R., Nievas, S., de Carlan, C. L. N., Donadio, F., Torres, D., Rosas, S., Pedrosa, F. O., de Souza, E., Zorita, M. D., de-Bashan, L., & Mora, V. (2020). Everything you must know about Azospirillum and its impact on agriculture and beyond. *Biology and Fertility of Soils*, 56(4), 461–479.
<https://doi.org/10.1007/s00374-020-01463-y>
- Cassán, F., Maiale, S., Masciarelli, O., Vidal, A., Luna, V., & Ruiz, O. (2009). Cadaverine production by *Azospirillum brasilense* and its possible role in plant growth promotion and osmotic stress mitigation. *European Journal of Soil Biology*, 45(1), 12–19.
<https://doi.org/10.1016/j.ejsobi.2008.08.003>

- Cebrián-Lloret, V., Metz, M., Martínez-Abad, A., Knutsen, S. H., Ballance, S., López-Rubio, A., & Martínez-Sanz, M. (2022). Valorization of alginate-extracted seaweed biomass for the development of cellulose-based packaging films. *Algal Research*, 61. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2021.102576>
- Ceccon, E. (2008). La revolución verde: tragedia en dos actos. *Ciencias*, 1(91), 21–29. <http://xa.yimg.com/kq/groups/13545343/270090419/name/64411463004.pdf%5Cnhttp://www.redalyc.org/pdf/644/64411463004.pdf>
- Chandra, S., Choure, K., Dubey, R. C., & Maheshwari, D. K. (2007). Rhizosphere competent *Mesorhizobium loti* MP6 induces root hair curling, inhibits *Sclerotinia sclerotiorum* and enhances growth of Indian mustard (*Brassica campestris*). *Brazilian Journal of Microbiology*, 38(1), 124–130. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822007000100026>
- Charrier, B., Le Bail, A., & De Reviers, B. (2012). Plant Proteus: Brown algal morphological plasticity and underlying developmental mechanisms. *Trends in Plant Science*, 17(8), 468–477. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2012.03.003>
- Chaudhary, T., Gera, R., & Shukla, P. (2021). Emerging Molecular Tools for Engineering Phytomicrobiome. *Indian Journal of Microbiology*, 61(2), 116–124. <https://doi.org/10.1007/s12088-020-00915-1>
- Chen, W. X., Wang, E. T., & David Kuykendall, L. (2015). *Mesorhizobium*. *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*, 1–11. <https://doi.org/10.1002/9781118960608.gbm00839>
- Chojnacka, K. (2010). Fermentations Products. In *Encyclopedia of Chemical Sciences, Engineering and Technology Resources*. EOLSS Publishers Co Ltd. <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B978012219352150013X>
- Directiva 1999/21/de la Comisión de las Comunidades Europeas de 25 de marzo de 1999 sobre alimentos dietéticos destinados a usos médicos especiales, 29 (1999). <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/ES/ALL/?uri=CELEX:31999L0021&qid=1584797292690>
- Cordero-Bueso, G., Hernández-Fernández, M., Ruiz-Muñoz, M., & Cantoral, J. M. (2021). *Culturable Yeasts as Biofertilizers and Biopesticides for a Sustainable Agriculture : A Comprehensive Review*.
- Craigie, J. S. (2011). Seaweed extract stimuli in plant science and agriculture. *Journal of Applied Phycology*, 23(3), 371–393. <https://doi.org/10.1007/s10811-010-9560-4>
- Damir, O., Mladen, P., Božidar, Š., & Srdan, N. (2011). Cultivation of the bacterium *Azotobacter chroococcum* for preparation of biofertilizers. *African Journal of*

Biotechnology, 10(16), 3104–3111. <https://doi.org/10.5897/ajb10.1086>

- Dasgupta, D., Kumar, K., Miglani, R., Mishra, R., Panda, A. K., & Bisht, S. S. (2021). Microbial biofertilizers: Recent trends and future outlook. In *Recent Advancement in Microbial Biotechnology: Agricultural and Industrial Approach*. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-822098-6.00001-X>
- Diario Oficial de la Unión Europea. (2008). Directiva 2008/98/CE del Parlamento Europeo y del Consejo. *Parlamento Europeo*, 22, 59 pags. (43 artículos). <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2008:312:0003:01:ES:HTML>
- Dobrinčić, A., Balbino, S., Zorić, Z., Pedisić, S., Kovačević, D. B., Garofulić, I. E., & Dragović-Uzelac, V. (2020). Advanced technologies for the extraction of marine brown algal polysaccharides. *Marine Drugs*, 18(3). <https://doi.org/10.3390/md18030168>
- Doelle, H. W. (1975). Fermentation. In *Bacterial Metabolism* (Vol. 7, Issue 2, pp. 559–692). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-219352-1.50013-X>
- du Jardin, P. (2015). Plant biostimulants: Definition, concept, main categories and regulation. *Scientia Horticulturae*, 196, 3–14. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2015.09.021>
- El Boukhari, M. E. M., Barakate, M., Bouhia, Y., & Lyamlouli, K. (2020). Trends in seaweed extract based biostimulants: Manufacturing process and beneficial effect on soil-plant systems. *Plants*, 9(3). <https://doi.org/10.3390/plants9030359>
- Emmert, E. A. B., & Handelsman, J. (1999). Biocontrol of plant disease: A (Gram-) positive perspective. *FEMS Microbiology Letters*, 171(1), 1–9. [https://doi.org/10.1016/S0378-1097\(98\)00570-9](https://doi.org/10.1016/S0378-1097(98)00570-9)
- Eppinger, M., Bunk, B., Johns, M. A., Edirisinghe, J. N., Kutumbaka, K. K., Koenig, S. S. K., Creasy, H. H., Rosovitz, M. J., Riley, D. R., Daugherty, S., Martin, M., Elbourne, L. D. H., Paulsen, I., Biedendieck, R., Braun, C., Grayburn, S., Dhingra, S., Lukyanchuk, V., Ball, B., ... Vary, P. S. (2011). Genome sequences of the biotechnologically important *Bacillus megaterium* Strains QM B1551 and DSM319. *Journal of Bacteriology*, 193(16), 4199–4213. <https://doi.org/10.1128/JB.00449-11>
- Real Decreto 506/2013, 164 Boletín Oficial del Estado 5119 (2013).
- EUMOFA. (2018). Blue bioeconomy. Situation report and perspectives. In *European Market Observatory for Fisheries and Aquaculture Products*. <https://doi.org/10.2771/053734>
- European Commission. (2018). *A sustainable Bioeconomy for Europe: strengthening the connection between economy, society and the environment*. <https://doi.org/10.2777/478385>

- FAO. (2021a). World Food and Agriculture – Statistical Yearbook 2021. In *World Food and Agriculture – Statistical Yearbook 2021*. <https://doi.org/10.4060/cb4477en>
- FAO. (2021b). *The State of the World's Land and Water Resources for Food and Agriculture – Systems at breaking point (SOLAW 2021)*. FAO. <https://doi.org/10.4060/cb7654en>
- Flórez-Fernández, N., Torres, M. D., González-Muñoz, M. J., & Domínguez, H. (2018). Potential of intensification techniques for the extraction and depolymerization of fucoidan. *Algal Research*, 30(January), 128–148. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2018.01.002>
- Fortune Business Insights. (2021). *Agricultural Microbials Market Size, Share & COVID-19 Impact Analysis, By Type (Bacteria, Fungi, Virus, and Others), Formulation (Dry and Liquid), Function (Soil Amendment and Crop Protection), Application Method (Foliar Spray, Soil Treatment, Seed Treatm.* <https://www.fortunebusinessinsights.com/industry-reports/agricultural-microbial-market-100412>
- Fukami, J., Cerezini, P., & Hungria, M. (2018). Azospirillum: benefits that go far beyond biological nitrogen fixation. *AMB Express*, 8(1), 1–12. <https://doi.org/10.1186/s13568-018-0608-1>
- Fukase, E., & Martin, W. (2020). Economic growth, convergence, and world food demand and supply. *World Development*, 132, 104954. <https://doi.org/10.1016/j.worlddev.2020.104954>
- Goswami, G., Panda, D., Samanta, R., Boro, R. C., Modi, M. K., Bujarbaruah, K. M., & Barooah, M. (2018). Bacillus megaterium adapts to acid stress condition through a network of genes: Insight from a genome-wide transcriptome analysis. *Scientific Reports*, 8(1), 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-34221-0>
- Gupta, G., Singh Parihar, S., Ahirwar, N. K., Snehi, S. K., & Singh, V. (2015). Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR): Current and Future Prospects for Development of Sustainable Agriculture. *Journal of Microbial & Biochemical Technology*, 07(02). <https://doi.org/10.4172/1948-5948.1000188>
- Hanano, A., Shaban, M., Almutk, D., & Almously, I. (2019). The cytochrome P450BM-1 of Bacillus megaterium A14K is induced by 2,3,7,8-Tetrachlorinated dibenzo-p-dioxin: Biophysical, molecular and biochemical determinants. *Chemosphere*, 216, 258–270. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.10.103>
- Hapsah, Dini, I. R., Salbiah, D., & Tryana, S. (2020). Application of biofertilizer consortium formulation of cellulolytic bacteria based on organic liquid waste on yield of upland rice (*Oryza sativa* L.). *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 454(1). <https://doi.org/10.1088/1755-1315/454/1/012142>

- Hesseltine, C. W. (1992). Mixed-Culture Fermentations. In National Academy of Sciences (Ed.), *Panel on the applications of biotechnology to traditional fermented foods*, National Research Council (pp. 52–58). National Academies Press. <https://doi.org/10.17226/1939>
- Hiltz, T. I. W. D. (2020). *El método de extracción de algas (Ascophyllum nodosum) conduce a formulaciones químicas diferentes con efectos variados en el enraizamiento del césped*. 4(49), 82–83.
- Huang, X. D., El-Alawi, Y., Penrose, D. M., Glick, B. R., & Greenberg, B. M. (2004). A multi-process phytoremediation system for removal of polycyclic aromatic hydrocarbons from contaminated soils. *Environmental Pollution*, 130(3), 465–476. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2003.09.031>
- Imen, H., Neila, A., Adnane, B., Manel, B., Mabrouk, Y., Saidi, M., & Bouaziz, S. (2015). Inoculation with Phosphate Solubilizing Mesorhizobium Strains Improves the Performance of Chickpea (*Cicer aritenium* L.) Under Phosphorus Deficiency. *Journal of Plant Nutrition*, 38(11), 1656–1671. <https://doi.org/10.1080/01904167.2015.1061543>
- John, R. P., Tyagi, R. D., Brar, S. K., Surampalli, R. Y., & Prévost, D. (2011). Bio-encapsulation of microbial cells for targeted agricultural delivery. *Critical Reviews in Biotechnology*, 31(3), 211–226. <https://doi.org/10.3109/07388551.2010.513327>
- Jung, B. K., Ibal, J. C., Pham, H. Q., Kim, M. C., Park, G. S., Hong, S. J., Jo, H. W., Park, C. E., Choi, S. D., Jung, Y., Tagele, S. B., & Shin, J. H. (2020). Quorum Sensing System Affects the Plant Growth Promotion Traits of *Serratia fonticola* GS2. *Frontiers in Microbiology*, 11(October), 1–12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.536865>
- Junta de Andalucía. (2018). Estrategia Andaluza de Bioeconomía Circular. *Junta de Andalucía*, 1–354.
- Kadam, S. U., Tiwari, B. K., & O'Donnell, C. P. (2013). Application of novel extraction technologies for bioactives from marine algae. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(20), 4667–4675. <https://doi.org/10.1021/jf400819p>
- Kadam, S. U., Tiwari, B. K., Smyth, T. J., & O'Donnell, C. P. (2015). Optimization of ultrasound assisted extraction of bioactive components from brown seaweed *Ascophyllum nodosum* using response surface methodology. *Ultrasonics Sonochemistry*, 23, 308–316. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2014.10.007>
- Kaushal, M. (2019). Climatic resilient agriculture for root, tuber, and banana crops using plant growth-promoting microbes. In *Climate Change and Agricultural Ecosystems: Current Challenges and Adaptation*. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816483->

9.00012-8

- Kehoe, L., Romero-Muñoz, A., Polaina, E., Estes, L., Kreft, H., & Kuemmerle, T. (2017). Biodiversity at risk under future cropland expansion and intensification. *Nature Ecology and Evolution*, *1*(8), 1129–1135. <https://doi.org/10.1038/s41559-017-0234-3>
- Kelly, S., Sullivan, J., Ronson, C., Tian, R., Bräu, L., Munk, C., Goodwin, L., Han, C., Woyke, T., Reddy, T., Huntemann, M., Pati, A., Mavromatis, K., Markowitz, V., Ivanova, N., Kyrpides, N., & Reeve, W. (2014). Genome sequence of the Lotus spp. microsymbiont *Mesorhizobium loti* strain R7A. *Standards in Genomic Sciences*, *9*(1), 1–7. <https://doi.org/10.1186/1944-3277-9-6>
- Khan, W., Rayirath, U. P., Subramanian, S., Jithesh, M. N., Rayorath, P., Hodges, D. M., Critchley, A. T., Craigie, J. S., Norrie, J., & Prithiviraj, B. (2009). Seaweed extracts as biostimulants of plant growth and development. *Journal of Plant Growth Regulation*, *28*(4), 386–399. <https://doi.org/10.1007/s00344-009-9103-x>
- Kumar, V., & Narula, N. (1999). Solubilization of inorganic phosphates and growth emergence of wheat as affected by *Azotobacter chroococcum* mutants. *Biology and Fertility of Soils*, *28*(3), 301–305. <https://doi.org/10.1007/s003740050497>
- Lakhal, D., Boutaleb, N., Bahlaouan, B., Taiek, T., Fathi, A., Mekouar, M., Abouakil, N., Lazar, S., & El Antri, S. (2017). Mixture Experimental Design in the Development of a Bio Fertilizer from Fish Waste, Molasses and Scum. *International Journal of Engineering Research & Technology*, *6*(6), 588–594.
- Lakshmi, P. K., & Meenakshi, S. (2022). Micro and macroalgae: A potential biostimulant for abiotic stress management and crop production. In *New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering* (pp. 63–82). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-85163-3.00001-6>
- Lin, H., & Qin, S. (2014). Tipping points in seaweed genetic engineering: Scaling up opportunities in the next decade. *Marine Drugs*, *12*(5), 3025–3045. <https://doi.org/10.3390/md12053025>
- Liu, S. (2017). How Cells Grow. In *Bioprocess Engineering*. <https://doi.org/10.1016/b978-0-444-63783-3.00011-3>
- Mali, G. V., Patil, R. C., & Bodhankar, M. G. (2011). *Antifungal and Phytohormone Production Potential of Azotobacter chroococcum Isolates from Groundnut (Arachis hypogea L.) rhizosphere*. *3*(1).
- MarketAndMarkets. (2021). *Biofertilizers Market*. MarketAndMarkets.Com.

<https://www.marketsandmarkets.com/Market-Reports/compound-biofertilizers-customized-fertilizers-market-856.html>

- Michalak, I., Tuhy, Ł., & Chojnacka, K. (2015). Seaweed extract by microwave assisted extraction as plant growth biostimulant. *Open Chemistry*, *13*(1), 1183–1195. <https://doi.org/10.1515/chem-2015-0132>
- Montes, L., Gisbert, M., Hinojosa, I., Sineiro, J., & Moreira, R. (2021). Impact of drying on the sodium alginate obtained after polyphenols ultrasound-assisted extraction from *Ascophyllum nodosum* seaweeds. *Carbohydrate Polymers*, *272*(July). <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2021.118455>
- Munir, S., & Jamil, N. (2018). Polyhydroxyalkanoates (PHA) production in bacterial co-culture using glucose and volatile fatty acids as carbon source. *Journal of Basic Microbiology*, *58*(3), 247–254. <https://doi.org/10.1002/jobm.201700276>
- Naik, K., Mishra, S., Srichandan, H., Singh, P. K., & Sarangi, P. K. (2019). Plant growth promoting microbes: Potential link to sustainable agriculture and environment. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, *21*(July), 101326. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2019.101326>
- Nascimento, F. X., Hernández, A. G., Glick, B. R., & Rossi, M. J. (2020). Plant growth-promoting activities and genomic analysis of the stress-resistant *Bacillus megaterium* STB1, a bacterium of agricultural and biotechnological interest. *Biotechnology Reports*, *25*, 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2019.e00406>
- Naziya, B., Murali, M., & Amruthesh, K. N. (2020). Plant growth-promoting fungi (Pgpf) instigate plant growth and induce disease resistance in *capsicum annum* l. upon infection with *colletotrichum capsici* (syd.) butler & bisby. *Biomolecules*, *10*(1), 4–6. <https://doi.org/10.3390/biom10010041>
- Parlamento Europeo. (2015). *Economía circular: definición, importancia y beneficios* / Noticias / Parlamento Europeo. Europarl. <https://www.europarl.europa.eu/news/es/headlines/economy/20151201STO05603/economia-circular-definicion-importancia-y-beneficios>
- Parlamento Europeo. (2019). *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 1069/2. 2019*, 1–114.
- Poitout, A., Martinière, A., Kucharczyk, B., Queruel, N., Silva-Andia, J., Mashkoor, S., Gamet,

- L., Varoquaux, F., Paris, N., Sentenac, H., Touraine, B., & Desbrosses, G. (2017). Local signalling pathways regulate the Arabidopsis root developmental response to Mesorhizobium loti inoculation. *Journal of Experimental Botany*, 68(5), 1199–1211. <https://doi.org/10.1093/jxb/erw502>
- Ramzan, S., Ashraf, I., Ali, T., Rasool, T., Ahmad, P., Wani, M. A., Kumar, R., & Rouf, A. (2021). Microbiota and Biofertilizers. In K. R. Hakeem, G. H. Dar, M. A. Mehmood, & R. A. Bhat (Eds.), *Microbiota and Biofertilizers*. Springer International Publishing. <https://doi.org/10.1007/978-3-030-48771-3>
- Rayorath, P., Jithesh, M. N., Farid, A., Khan, W., Palanisamy, R., Hankins, S. D., Critchley, A. T., & Prithiviraj, B. (2008). Rapid bioassays to evaluate the plant growth promoting activity of Ascophyllum nodosum (L.) Le Jol. using a model plant, Arabidopsis thaliana (L.) Heynh. *Journal of Applied Phycology*, 20(4), 423–429. <https://doi.org/10.1007/s10811-007-9280-6>
- Robson, R. L., Jones, R., Robson, R. M., Schwartz, A., & Richardson, T. H. (2015). Azotobacter genomes: The genome of Azotobacter chroococcum NCIMB 8003 (ATCC 4412). *PLoS ONE*, 10(6), 1–35. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0127997>
- Romero-Perdomo, F, Camelo-Rusinque, M., Criollo-Campos, P., & Bonilla-Buitrago, R. (2015). Effect of temperature and pH on the biomass production of Azospirillum brasilense C16 isolated from Guinea grass. *Pastos y Forrajes*, 38(3), 231–233.
- Romero-Perdomo, Felipe, Abril, J., Camelo, M., Moreno-Galván, A., Pastrana, I., Rojas-Tapias, D., & Bonilla, R. (2017). Azotobacter chroococcum as a potentially useful bacterial biofertilizer for cotton (Gossypium hirsutum): Effect in reducing N fertilization. *Revista Argentina de Microbiología*, 49(4), 377–383. <https://doi.org/10.1016/j.ram.2017.04.006>
- Romero, A. M., Vega, D., & Correa, O. S. (2014). Azospirillum brasilense mitigates water stress imposed by a vascular disease by increasing xylem vessel area and stem hydraulic conductivity in tomato. *Applied Soil Ecology*, 82, 38–43. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2014.05.010>
- Santos, M. P., Martínez, S. J., Yarte, M. E., Carletti, S. M., & Larraburu, E. E. (2022). Effect of Azospirillum brasilense on the in vitro germination of Eustoma grandiflorum (Raf.) Schinn.(Gentianaceae). *Scientia Horticulturae*, 299(March), 111041. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2022.111041>
- Shah, M. P. (2014). Bioremedial Application of Bacillus Megaterium PMS82 in Microbial Degradation of Acid Orange Dye. *International Journal of Environmental Bioremediation*

- & *Biodegradation*, 2(3), 93–99. <https://doi.org/10.12691/ijebb-2-3-1>
- Shukla, P. S., Mantin, E. G., Adil, M., Bajpai, S., Critchley, A. T., & Prithiviraj, B. (2019). Ascophyllum nodosum-based biostimulants: Sustainable applications in agriculture for the stimulation of plant growth, stress tolerance, and disease management. *Frontiers in Plant Science*, 10(May), 1–22. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00655>
- Sim, K. S., Sri Nurestri, A. M., & Norhanom, A. W. (2010). Phenolic content and antioxidant activity of *Pereskia grandifolia* Haw. (Cactaceae) extracts. *Pharmacognosy Magazine*, 6(23), 248–254. <https://doi.org/10.4103/0973-1296.66945>
- Siregar, A., & Raharjo, S. H. T. (2017). Production of liquid biofertilizers in vegetable wastes. *Fifth Asian PGPR Conference*.
- Subramaniam, R., Thirumal, V., Chistoserdov, A., Bajpai, R., Bader, J., & Popovic, M. (2018). High-density cultivation in the production of microbial products. *Chemical and Biochemical Engineering Quarterly*, 32(4), 451–464. <https://doi.org/10.15255/CABEQ.2018.1394>
- Swarnalakshmi, K., Yadav, V., Tyagi, D., Dhar, D. W., Kannepalli, A., & Kumar, S. (2020). Significance of plant growth promoting rhizobacteria in grain legumes: Growth promotion and crop production. *Plants*, 9(11), 1–25. <https://doi.org/10.3390/plants9111596>
- Tilman, D., Balzer, C., Hill, J., & Befort, B. L. (2011). Global food demand and the sustainable intensification of agriculture. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(50), 20260–20264. <https://doi.org/10.1073/pnas.1116437108>
- Tomasik, P., & Horton, D. (2012). Enzymatic conversions of starch. In *Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry* (1st ed., Vol. 68). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-396523-3.00001-4>
- Trivedi, P., & Pandey, A. (2008). Plant growth promotion abilities and formulation of *Bacillus megaterium* strain B 388 (MTCC6521) isolated from a temperate Himalayan location. *Indian Journal of Microbiology*, 48(3), 342–347. <https://doi.org/10.1007/s12088-008-0042-1>
- Tugarova, A. V., Mamchenkova, P. V., Khanadeev, V. A., & Kamnev, A. A. (2020). Selenite reduction by the rhizobacterium *Azospirillum brasilense*, synthesis of extracellular selenium nanoparticles and their characterisation. *New Biotechnology*, 58(September 2018), 17–24. <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2020.02.003>
- Vazquez, A., Zawoznik, M., Benavides, M. P., & Groppa, M. D. (2021). *Azospirillum*

- brasileense Az39 restricts cadmium entrance into wheat plants and mitigates cadmium stress. *Plant Science*, 312(May), 111056. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2021.111056>
- Verma, M., Mishra, J., & Arora, N. K. (2019). *Plant Growth-Promoting Rhizobacteria : Diversity and Applications*.
- Vieira, J. D., Da Silva, P. R. D., & Stefenon, V. M. (2017). In vitro growth and indoleacetic acid production by Mesorhizobium loti SEMIA806 and SEMIA816 under the influence of copper ions. *Microbiology Research*, 8(2), 55–58. <https://doi.org/10.4081/mr.2017.7302>
- Vogel, M., Fischer, S., Maffert, A., Hübner, R., Scheinost, A. C., Franzen, C., & Steudtner, R. (2018). Biotransformation and detoxification of selenite by microbial biogenesis of selenium-sulfur nanoparticles. *Journal of Hazardous Materials*, 344, 749–757. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2017.10.034>
- Wang, L., & Weller, C. L. (2006). Recent advances in extraction of nutraceuticals from plants. *Trends in Food Science and Technology*, 17(6), 300–312. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2005.12.004>
- Yang, J., Klopper, J. W., & Ryu, C.-M. (2009). Rhizosphere bacteria help plants tolerate abiotic stress. *Nature*, 458(7239), 702. <https://doi.org/10.1038/458702c>
- Yu, Z., Zhang, Y. C., Zhang, X., & Wang, Y. (2015). Conversion of food waste into biofertilizer for the biocontrol of root knot nematode by Paecilomyces lilacinus. *Environmental Technology (United Kingdom)*, 36(24), 3148–3158. <https://doi.org/10.1080/09593330.2015.1055817>
- Yuan, Y., & Macquarrie, D. (2015). Microwave assisted extraction of sulfated polysaccharides (fucoidan) from Ascophyllum nodosum and its antioxidant activity. *Carbohydrate Polymers*, 129, 101–107. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2015.04.057>
- Yuan, Y., Zhang, J., Fan, J., Clark, J., Shen, P., Li, Y., & Zhang, C. (2018). Microwave assisted extraction of phenolic compounds from four economic brown macroalgae species and evaluation of their antioxidant activities and inhibitory effects on α -amylase, α -glucosidase, pancreatic lipase and tyrosinase. *Food Research International*, 113(May), 288–297. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.07.021>
- Zhang, X., Baars, O., & Morel, F. M. M. (2019). Genetic, structural, and functional diversity of low and high-affinity siderophores in strains of nitrogen fixing: Azotobacter chroococcum. *Metallomics*, 11(1), 201–212. <https://doi.org/10.1039/c8mt00236c>
- Zhao, Y., Mao, X., Zhang, M., Yang, W., Di, H. J., Ma, L., Liu, W., & Li, B. (2021). The application of Bacillus Megaterium alters soil microbial community composition,

bioavailability of soil phosphorus and potassium, and cucumber growth in the plastic shed system of North China. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 307(November 2020). <https://doi.org/10.1016/j.agee.2020.107236>

Zhou, C., Ma, Z., Zhu, L., Xiao, X., Xie, Y., Zhu, J., & Wang, J. (2016). Rhizobacterial strain *Bacillus megaterium* BOFC15 induces cellular polyamine changes that improve plant growth and drought resistance. *International Journal of Molecular Sciences*, 17(6). <https://doi.org/10.3390/ijms17060976>

Zhu, W., He, Q., Gao, H., Nitayavardhana, S., Khanal, S. K., & Xie, L. (2020). Bioconversion of yellow wine wastes into microbial protein via mixed yeast-fungus cultures. *Bioresource Technology*, 299(December 2019), 122565. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.122565>

Zimbro, M. J., & Power, D. A. (2009). *Difco & BBL Manual: Manual of Microbiological Culture Media*. Becton Dickinson and Compan.