

TRABAJO FIN DE MÁSTER

UNIVERSIDAD DE ALMERÍA
FACULTAD DE CIENCIAS EXPERIMENTALES

MÁSTER EN BIOTECNOLOGÍA INDUSTRIAL Y AGROALIMENTARIA



Producción de bacterias promotoras del crecimiento de plantas (PGPBs) a partir de residuos de la industria agroalimentaria

La Alumna:

Elena Porcel Rodríguez

Almería, septiembre 2017

Directoras:

Dra. María José López López (Universidad de Almería)

Dra. Rebeca Pilar Ramos Bueno (Centro Tecnológico TECNOVA)

ÍNDICE

RESUMEN	2
ABSTRACT	3
1. INTRODUCCIÓN	4
1.1. Formulaciones bacterianas en agricultura: PGPBs	4
1.2. Residuos en la industria agroalimentaria	7
1.3. Interés y objetivos	8
2. MATERIAL Y MÉTODOS	12
2.1. Residuos de industrias agroalimentarias (R.I.A.)	12
2.2. Microorganismos, mantenimiento e inóculo	12
2.3. Esterilización del medio de cultivo	13
2.4. Cultivo en medios con R.I.A	14
2.5. Medidas analíticas: medida del crecimiento	15
2.6. Análisis estadístico	16
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	17
3.1. Caracterización de los R.I.A.	17
3.2. Determinación del método de preparación de medios de cultivo.	19
3.3. Crecimiento de <i>Pseudomonas</i>	22
3.4. Crecimiento de <i>Bacillus</i>	25
3.5. Crecimiento de <i>Azospirillum</i>	29
4. CONCLUSIONES	32
5. AGRADECIMIENTOS	33
6. BIBLIOGRAFÍA	34

RESUMEN

Título: Producción de bacterias promotoras del crecimiento de plantas (PGPBs) a partir de residuos de la industria agroalimentaria.

Alumna: Elena Porcel Rodríguez.

Titulación: Máster en Biotecnología Industrial y Agroalimentaria.

Modalidad: Empresa.

Directoras: Dra. María José López López (Universidad de Almería) y Dra. Rebeca Pilar Ramos Bueno (Centro Tecnológico TECNOVA).

Interés y objetivos: En el presente trabajo fin de máster se ha evaluado la aplicabilidad de diferentes residuos orgánicos procedentes de procesos de transformación agroalimentarios para la producción de bacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPBs). Este estudio contribuye a mejorar la sostenibilidad de la industria agroalimentaria a través de la incorporación de procesos y tecnologías que permiten el aprovechamiento de los residuos orgánicos generados, ofreciendo adicionalmente productos de alto valor añadido. Los objetivos principales del trabajo han sido establecer el protocolo para la incorporación de dichos residuos al medio de cultivo y seleccionar los residuos más adecuados para el crecimiento de los PGPBs, *Pseudomonas*, *Bacillus* y *Azospirillum*.

Métodos: Se emplearon 8 residuos procedentes del procesado de la leche, frutas y cereales (4 tipos de frutas, fruta y cereales, 2 lácteos y un lácteo con fruta) y, tras obtener sus extractos acuosos, se analizó el efecto de diferentes técnicas de esterilización (sin esterilizar, filtrado y autoclavado) en el crecimiento de las bacterias mediante siembra en placa y recuento de UFC. Tras determinar la técnica idónea, se comparó el crecimiento de los tres PGPBs en los extractos acuosos de cada uno de los residuos.

Resultados: *Pseudomonas* sp. y *Bacillus* sp. crecieron óptima en el medio de cultivo preparado con extracto de fruta 3, frutas con cereales y lácteo con fruta. Estos residuos presentan un elevado contenido en potasio, magnesio, calcio y sodio y bajo contenido en nitrógeno, proteínas y fósforo. *Azospirillum* sp. creció únicamente en el medio de cultivo de extracto de fruta 4, residuo que presenta un elevado contenido en proteínas, nitrógeno, fósforo y materia orgánica, y bajo contenido en azúcares, hidratos de carbono, sodio y potasio.

Conclusiones: Los residuos de la industria agroalimentaria constituyen una materia prima con potencial uso en la preparación de medios de cultivo económicos para el crecimiento de bacterias PGPBs para la elaboración de biofertilizantes.

Palabras clave: PGPBs, medios de cultivo, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Azospirillum*.

ABSTRACT

Title: Production of plant growth promoting bacteria (PGPBs) from agri-food industry wastes.

Purpose: The present work evaluates the applicability of different organic residues from agri - food industry as grow media for plant growth promoting bacteria (PGPBs). This study contributes to sustainability of the agri-food industry through the incorporation of processes and technologies for organic waste recycling, delivering additionally products of high-added value. The main objectives of this study were to establish the protocol for the incorporation of these residues into the culture medium and to select the most suitable residues for the growth of PGPBs, *Pseudomonas*, *Bacillus* and *Azospirillum*.

Materials and methods: Eight residues from the industrial processing of milk, fruits and cereals (4 types of fruits, fruit and cereals, 2 dairy products and one dairy with fruit) were used and, after obtaining their aqueous extracts, the effect of different sterilization techniques (without sterilization, filtration and autoclaving) were used to check their comparative potential for bacterial growth by serial dilutions and plating to determine viable bacterial cell counts (CFU). After establishing the technique, the growth of the three PGPBs in the aqueous extracts of each of the residues was compared.

Results: *Pseudomonas* sp. and *Bacillus* sp. grew optimally in the culture medium prepared with fruit extract 3, fruits with cereals and dairy with fruit. These residues have high potassium, magnesium, calcium and sodium contents and low nitrogen, protein and phosphorus contents. *Azospirillum* sp. grew only in the medium made of by fruit extract 4, a residue with high content of proteins, nitrogen, phosphorus and organic matter, and low content in sugars, carbohydrates, sodium and potassium.

Conclusions: The agro-food industry residues are a feedstock with potential use in the preparation of economic culture media for growing PGPBs biomass for the production of biofertilizers.

Keywords: PGPBs, culture media, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Azospirillum*.

1. INTRODUCCIÓN.

1.1. Formulaciones bacterianas en agricultura: PGPBs.

La intensificación de la agricultura y el abuso de fertilizantes inorgánicos y de fitosanitarios químicos en los ecosistemas agrícolas, han dado lugar a la contaminación de suelos y a la aparición de resistencia en patógenos. Esta situación ha llevado a la búsqueda de alternativas más respetuosas con el medio ambiente para alcanzar un modelo de agricultura más sostenible.

Las bacterias que promueven el crecimiento de las plantas (PGPB) incluyen un grupo heterogéneo de microorganismos tales como las cianobacterias, bacterias que establecen relaciones simbióticas con las plantas, y otras que colonizan los tejidos de las plantas (rizosféricas/endofíticas). Las PGPBs han demostrado ser una herramienta útil en agricultura, ya sea porque directamente incrementan el crecimiento y la productividad vegetal, al facilitar la disponibilidad de recursos nutritivos para la planta (fijación de nitrógeno atmosférico, solubilización de fósforo, etc.), o por modular los niveles de hormonas vegetales o producirlas; o de forma indirecta por disminuir o inhibir completamente los efectos nocivos de diversos patógenos vegetales (Figura 1).

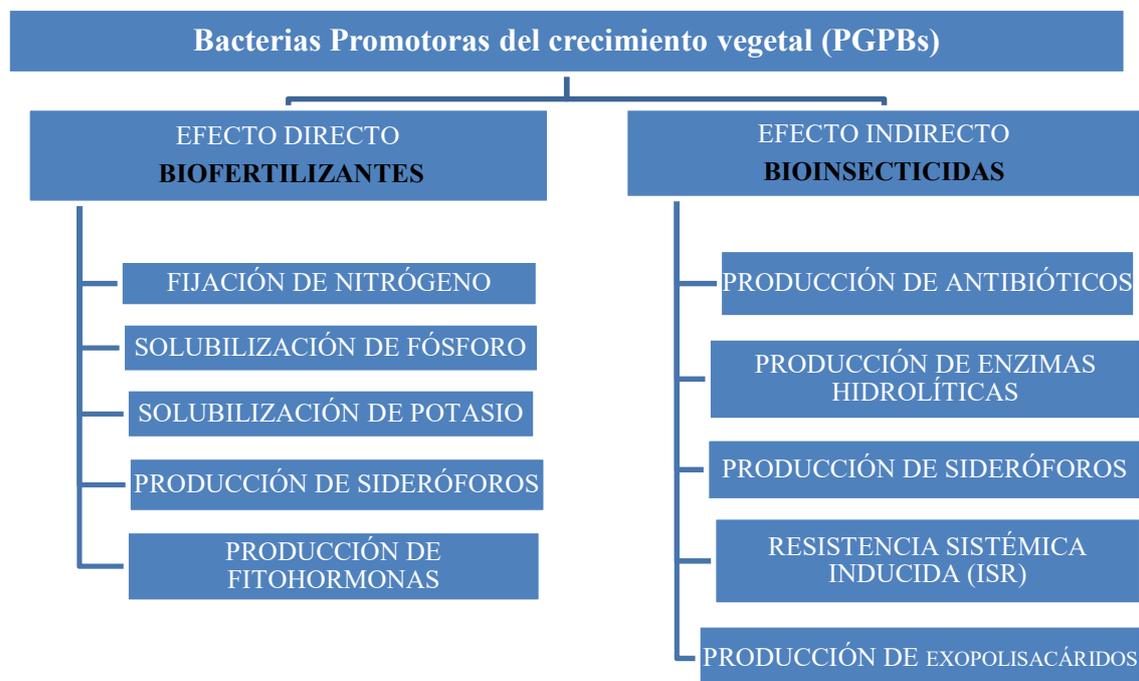


Figura 1: Diagrama esquemático que muestra el efecto directo e indirecto de las bacterias que promueven el crecimiento de las plantas (modificado de Gupta *et al.*, 2015).

Las PGPBs son fundamentales para el funcionamiento y el equilibrio ecológico natural. Entre sus muchas funciones en este sentido destacan su capacidad para aumentar la resistencia de las plantas frente al estrés biótico y abiótico, la biotransformación de nutrientes contenidos en la materia orgánica animal o vegetal y el consiguiente aumento en biodisponibilidad para las plantas, y la biorremediación de contaminantes del suelo. Estas actividades en su conjunto favorecen al crecimiento y desarrollo de las plantas y mejoran el desarrollo radicular; por lo tanto, proporcionan una alternativa ecológica amigable para la agricultura sostenible (Di Benedetto, 2017; De-Bashan *et al.*, 2007; Bashan y De-Bashan, 2010; Glick, 2012; Patak *et al.*, 2016; Szilagyi-Zecchin *et al.*, 2016).

Las PGPBs pueden incorporarse en el ecosistema suelo-planta. La elección del tipo de bacterias a inocular y del lugar de colonización en la planta depende del efecto que la bacteria promueva en la planta y del objetivo perseguido. Así por ejemplo, cuando la principal actividad de los microorganismos incorporados es el control biológico se denominan biopesticidas, mientras que si promueven el crecimiento vegetal se consideran fitoestimulantes. En general, los preparados que contienen PGPBs se nombran como biofertilizantes (Glick, 2012; Szilagyi-Zecchin *et al.*, 2016).

La diversidad de PGPBs en la rizosfera varía en gran medida según el tipo de planta, suelo y de los nutrientes disponibles. Entre las PGPBs más conocidas se encuentran las especies pertenecientes a los géneros *Pseudomonas*, *Bacillus* y *Azospirillum* (Podile y Kishore, 2006, en Shing *et al.*, 2016; Desai *et al.*, 2016; Pathak *et al.*, 2016; Di Benedetto *et al.*, 2017).

Azospirillum spp. es una bacteria Gram – no esporulada, diazotrófica endofítica facultativa, capaz de colonizar la superficie y/o el interior de las raíces de muchas especies de plantas herbáceas y de cereales. Esta bacteria muestra diversas actividades que promueven el crecimiento de las plantas tales como la fijación no simbiótica de nitrógeno atmosférico principalmente en cultivos de cereales, la producción de sustancias promotoras del crecimiento de plantas, etc. (De-Bashan *et al.*, 2007; Desai *et al.*, 2016; Hassen *et al.*, 2016).

Varias especies del género *Pseudomonas* (bacteria Gram - no esporulada) solubilizan fosfato insoluble del suelo, haciéndolo disponible para las plantas. El fósforo es un macronutriente vegetal que tiene un papel vital en el metabolismo de las plantas, pero sólo una pequeña parte es utilizable, el resto se convierte en formas fijas insolubles que son movilizadas gracias a la actividad de microorganismos como *Pseudomonas* (Hassen *et al.*, 2016; Pathak *et al.*, 2016). Adicionalmente, diversas cepas de *Pseudomonas* spp. además de ser fijadoras de nitrógeno, muestran una alta versatilidad metabólica y aumentan la disponibilidad de nutrientes para la planta, liberan sustancias antibióticas y producen sideróforos que quelan el hierro e inhiben el crecimiento de microorganismos patógenos (Charest *et al.*, 2005; en Desai *et al.*, 2016). Según Di Benedetto *et al.* (2017) *Pseudomonas* spp. crece rápido *in vitro* y produce metabolitos bioactivos (antibióticos, sideróforos, sustancias volátiles y sustancias que promueven el crecimiento) y metabolitos tóxicos (fenazina, pirrolnitrina, 2,4-diacetilfloroglucinol (DAPG), piroluteorina y lipopéptidos cíclicos). De esa forma puede actuar como agente fitoestimulante y biopesticida.

Bacillus spp. es una bacteria Gram + formadora de endosporas y es el género bacteriano más abundante en la rizosfera. Los principales mecanismos de promoción del crecimiento de plantas por diversas especies pertenecientes a este género incluyen la producción de hormonas estimuladoras del crecimiento vegetal (fitohormonas), la solubilización y movilización del fósforo, la producción de sideróforos, la antibiosis, la inhibición de la síntesis de etileno en plantas, la fijación de nitrógeno y la inducción de la resistencia sistémica de las plantas frente a patógenos (Richardson *et al.*, 2009, en Desai *et al.*, 2016).

Las PGPBs son potencialmente útiles para acelerar el crecimiento de las plantas y aumentar el rendimiento de los cultivos. Diferentes investigadores han demostrado el papel beneficioso de los PGPBs, al poseer un papel directo en el aporte de nutrientes o en el mecanismo de biocontrol (Rai *et al.* 2016; Di Benedetto *et al.*, 2017). Los microorganismos son un componente importante de la agricultura, la alimentación y otras tecnologías, incluyendo la ingeniería y las ciencias médicas. Es por ello que en el futuro el uso de PGPBs como biofertilizantes probablemente se convierta en parte de la práctica agrícola cotidiana, ya que existen herramientas biotecnológicas para comprender mejor los mecanismos utilizados por estos microorganismos y poder

mejorar su eficacia en la agricultura (Singh *et al.*, 2011; Desai *et al.*, 2016).

El objetivo final y la justificación económica de cualquier investigación a largo plazo con PGPBs es su aplicación práctica en campo por parte de los agricultores. Con este fin, se obtienen cultivos viables de la bacteria, suspendido o mezclado en un medio de cultivo determinado, ya sea líquido o sólido. Un requisito fundamental de tal tecnología en un entorno industrial, es la producción de un alto número de células de la bacteria, usualmente en biorreactores empleando un medio de cultivo que sea económico, pero a su vez eficiente para el crecimiento, mediante procedimientos sencillos en cuanto a las condiciones de cultivo y formulación final que se utilizará en campo (Bashan y De-Bashan, 2015).

El uso de los biofertilizantes por parte de los agricultores se ve desalentado por el alto coste de las formulaciones bacterianas, ya que el uso de células bacterianas vivas añade costes adicionales desde la producción de la bacteria hasta la formulación del producto final, pruebas de seguridad, envasado del producto y almacenamiento, hasta su aplicación en campo, lo que aumenta el coste neto productivo de las bioformulaciones. Además, se necesitan grandes cantidades de la bacteria para obtener resultados efectivos en comparación con los productos químicos. Una opción para la reducción significativa del coste de producción de biofertilizantes sería el uso de materiales fácilmente disponibles y de bajo coste o de material de desecho como medio de cultivo para el crecimiento de las bacterias (Singh y Arora, 2016). Diversos investigadores, así como en este Trabajo Fin de Máster (TFM), han estudiado el uso de determinados residuos industriales agroalimentarios como materiales portadores en formulaciones bacterianas con resultados bastante prometedores que se mencionarán en el apartado de resultados y discusión.

1.2. Residuos en la industria agroalimentaria.

Andalucía es la principal región productora de frutas y hortalizas de España gracias al desarrollo de la agricultura intensiva. La gestión y valorización de los restos vegetales en la agricultura de Andalucía es imprescindible para lograr un modelo de producción sostenible y respetuosa con el medio ambiente.

En España, el sector industrial con mayor importancia es la industria de alimentación y bebidas con un valor del 14,4% del número de empresas total español según el informe anual de la industria agroalimentaria 2014-2016 (MAPAMA, 2016a). El Ministerio de Agricultura y Pesca, Alimentación y Medio Ambiente de España (MAPAMA) creó el “Programa para la sostenibilidad integral de la industria agroalimentaria”, según el cual todas industrias agroalimentarias se comprometen a mejorar la sostenibilidad de su actividad productiva mediante mejoras de una serie de aspectos económicos, ambientales y sociales de su actividad empresarial. Se intenta fomentar de esta manera la eficiencia y la creación de un mayor valor añadido a medio y largo plazo de la industria agroalimentaria mediante el compromiso a la reducción de la cantidad de residuos generados, incluyendo el desperdicio alimentario en la elaboración del producto, y la aplicación de medidas para aumentar el valor de los mismos. Así mismo, las industrias agroalimentarias se comprometen a invertir en investigación, innovación y desarrollo para tratar de implementar nuevas tecnologías y productos innovadores que sean más compatibles con la sostenibilidad de la empresa (MAPAMA, 2016b).

Bajo el lema “Más alimento, menos desperdicio”, el MAPAMA puso en marcha en el año 2014 un estudio con el fin de evaluar la generación de desperdicios, mermas y pérdidas, en la gestión y el procesado del producto en la industria transformadora de alimentos, y la posible valorización de estos residuos. Las opciones de destino que habitualmente se utilizan para la mayoría de los residuos agroalimentarios del estudio realizado por el MAPAMA, son el uso directo en alimentación animal, el aprovechamiento energético en estaciones de biometanización, el compostaje o la gestión de residuos en vertederos de material orgánico. En la Tabla 1 se muestran los datos obtenidos del informe realizado por el MAPAMA (2014) sobre el porcentaje de pérdida de producto y de desperdicio durante el procesado en diferentes industrias agroalimentarias, expresado como el porcentaje de pérdida de masa en relación a la tonelada de producto transformado y el porcentaje de pérdida de desperdicio en relación a la tonelada transformada; y el porcentaje de material destinado a valorización respecto del que se elimina sin valorizar. Dicha tabla ha sido calculada en función del número total de empresas del subsector y de la información recopilada sobre el total de productos elaborados del subsector.

Tabla 1. Desperdicios generados en la industria agroalimentaria y tasa de valorización (MAPAMA, 2014).

Tipo de industria alimentaria	kg pérdida / T transformada (%)	kg desperdicio / T transformada (%)	kg valorizados/ kg de pérdida y desperdicio (%)
Procesado y conservación de carne y elaboración de productos cárnicos	11,9	6,3	0,6
Procesado y conservación de pescados, crustáceos y moluscos	45,8	0,5	0,8
Procesado y conservación de frutas y hortalizas	24,7	14,7	1
Fabricación de aceites y grasas vegetales y animales	80	0	0,03
Fabricación de productos lácteos	3,6	0,2	0,05
Fabricación de productos de molinería, almidones y productos amiláceos	23	1,8	0
Fabricación de productos de panadería y pastas alimenticias	36,1	22,4	0
Fabricación de otros alimentos	15,9	2,5	-
Fabricación de bebidas	26,2	4,7	-

En dicho informe del MAPAMA (2014) se define como *pérdidas de alimentos* a la disminución de la cantidad de la masa alimentaria comestible tanto durante las etapas de producción, como en la fase de poscosecha, elaboración o distribución. Estas pérdidas pueden deberse a fallos en el funcionamiento de la cadena de suministro, por deficiencias en tecnología, infraestructuras y logística, o debido a las malas prácticas de manipulación del producto durante el procesado del mismo. El *desperdicio alimentario* se define como el descarte de alimentos aptos para el consumo, pero que no cumplen los estándares de calidad establecidos por la empresa.

En el año 2006, el MAPAMA en colaboración con la Federación de Industrias de Alimentación y Bebidas (FIAB) y las asociaciones de productores, elaboraron una serie de “Guías de mejores técnicas disponibles en España” para diferentes sectores de las industrias agroalimentarias, con el fin de ofrecer una mayor información en cuanto a la prevención y control ambiental. Estas guías sectoriales ofrecen la descripción de la situación, procesos y condicionamientos del sector industrial concreto.

El sector de transformación de frutas y hortalizas es un subsector muy complejo en el que se transforman multitud de materias primas de origen vegetal. En la Tabla 2 se

muestran los datos de los porcentajes de restos generados en el sector de transformados vegetales en función de la materia prima procesada. En esta actividad los principales residuos son restos orgánicos. El destino principal de estos residuos es la utilización de descartes y destríos como subproducto para alimentación animal o como biorresiduo para su transformación, y en menor medida se dirige al depósito en vertedero.

Tabla 2. Restos orgánicos con respecto a la materia prima elaborada, generados en la industria de transformados vegetales (MAPAMA, 2006).

MATERIA PRIMA	TIPO DE RESTOS	% RESTOS TOTAL
Acelga	pencas, hojas	48
Albaricoque	pieles, huesos	10-25
Alcachofa	brácteas, tallos	60-65
Borraja	hojas	28
Brotos de ajo	partes blancas	17
Cardo	penca, hojas, corazón	65
Champiñón	corte raíz, destrío	21
Ciruela	pieles, huesos	10-25
Espárrago	pieles, trozos	51
Espinacas	hojas secas	13
Judía verde	puntas	28
Manzana	piel, peciolos, corazón	10-15
Melocotón	pieles, huesos	22-28
Naranja zumo	piel, corteza, semillas	60-65
Naranja, mandarina	piel, corteza, semillas	40-45
Pera	piel, peciolos, corazón	42-45
Pimiento morrón	corazones, piel	50-60
Pimiento del piquillo	corazones, piel	53
Puerro	hojas, raíces	47
Tomate	piel, pepitas, podridos	15

Los residuos orgánicos derivados del proceso productivo en la industria láctea corresponden a restos de materia prima y producto que, por sus características, no pueden ser reintroducidos en el proceso. Este sector utiliza como materia prima leche cruda o materias primas ya transformadas para elaborar productos como yogures o postres lácteos. Los residuos que generan son leche o productos que no cumplen con las características de calidad, leche con inhibidores, producto final no conforme, lactosuero, mazada (suero de mantequería), restos de producción y aguas de lavado con residuos lácteos (MAPAMA, 2016a). Según el informe del MAPAMA (2005), en la industria del sector lácteo se genera una cantidad de residuo de producto no conforme en torno a 0,15

y 20 kg/t leche recibida (dato de empresas de productos lácteos, excepto helados). Estos residuos se destinan principalmente para la alimentación animal y el aprovechamiento de subproductos.

Los residuos orgánicos generados por la industria agroalimentaria pueden ser de interés en la industria farmacéutica, alimentaria, química o cosmética. Podrían ser destinados a la obtención de ingredientes y productos de alimentación, síntesis de aromas y fragancias, o el diseño de biofertilizantes y bioestimulantes agrícolas, con el fin de otorgarle un valor añadido y por ende una ventaja económica, que se integra en el concepto de economía circular y bioeconomía. Adicionalmente, con la minimización de la producción de residuos se contribuirá a la sostenibilidad ambiental de la industria agroalimentaria.

1.3. Interés y objetivos.

En el presente TFM se han estudiado medios de cultivo constituidos por diversos residuos orgánicos de procesos de transformación agroalimentario para el crecimiento de bacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPBs), concretamente *Pseudomonas*, *Bacillus* y *Azospirillum*. El interés de este estudio radica en mejorar la sostenibilidad de la industria agroalimentaria a través de la incorporación de procesos y tecnologías que permitan el aprovechamiento de los residuos orgánicos generados y la obtención de productos de alto valor añadido. Dicho aprovechamiento permitirá a las empresas disponer de materias primas alternativas de bajo coste para la obtención de productos de interés y competitivos para la industria agroalimentaria, de alto impacto en la economía nacional.

Para la consecución del objetivo principal se plantearon los siguientes objetivos específicos:

1. Establecer el protocolo para la extracción de nutrientes a partir de residuos agroalimentarios y su método de incorporación en el medio de cultivo.
2. Determinar el residuo más adecuado para el crecimiento de PGPBs entre una variedad de residuos procedentes de procesado de la leche, frutas y cereales.

2. MATERIAL Y MÉTODOS.

2.1. Residuos de industrias agroalimentarias (R.I.A.).

En el estudio se utilizaron ocho tipos de residuos procedentes de industrias agroalimentarias productoras de zumos de frutas, alimentos preparados y lácteos. En la Tabla 3 se citan los códigos utilizados para cada uno de los residuos ensayados.

Tabla 3. Residuos de industrias agroalimentaria empleados en este trabajo fin de máster.

Abreviatura	Tipo de R. I. A.	Estado físico
C	Fruta 1	Polvo desecado
M	Fruta 2	Polvo desecado
P	Fruta 3	Pasta esterilizada
F	Fruta 4	Polvo desecado
F+C	Frutas + cereales	Pasta esterilizada
LR Y	Lácteo 1	Polvo desecado
LR+Y	Lácteo 2	Polvo desecado
YF	Lácteo + fruta	Pasta esterilizada

Estos residuos utilizados fueron proporcionados por la empresa cliente del proyecto realizado por el laboratorio de Tecnova y fueron analizados por un laboratorio externo donde se determinó el contenido de materia orgánica, proteína bruta, contenido graso, hidratos de carbono y la caracterización mineral. En el apartado 3 de resultados se muestran los datos de dicho análisis.

2.2. Microorganismos, mantenimiento e inóculo.

Los PGPBs empleados en la realización del presente TFM fueron *Pseudomonas* sp., *Bacillus* sp. y *Azospirillum* sp. Estos aislados también fueron proporcionados por la empresa cliente del proyecto realizado por el laboratorio de Tecnova.

Los aislados se mantuvieron en placas de Petri con medio de cultivo agarizado PCA (Plate Count Agar) a temperatura ambiente (21-25°C) y se realizaron resiembras periódicas mensuales en dicho medio.

Para la realización de los experimentos se empleó un inóculo de cada una de las cepas que se preparó sembrando con asa de siembra estéril en tubos de ensayo con 10ml de agua de peptona, que fueron incubados durante 18-24h en agitador de vaivén a 30°C.

2.3. Esterilización del medio de cultivo.

Para determinar el método más efectivo de incorporación de los R.I.A. en los medios de cultivo, se prepararon extractos acuosos de los mismos y se evaluaron distintos métodos de esterilización, incluyendo filtración y esterilización en autoclave, tal y como se describe a continuación.

Para esta prueba se utilizó una mezcla de residuo de fruta¹ con lácteo². Para la obtención del extracto acuoso se incorporó 1g de cada residuo en mortero cerámico y se fue añadiendo agua destilada hasta 100 mL, para obtener una pasta homogénea. Posteriormente, la mezcla se calentó a 40°C en agitación magnética a 1000 rpm durante 30 min. Finalmente se enrasó a 500mL con agua destilada, con lo que la concentración final fue 0,4% (p/v). Este extracto R.I.A. se empleó para la preparación de los medios de cultivo como única fuente de nutrientes.

Se realizaron pruebas de crecimiento de las bacterias en medio de cultivo sin esterilizar, esterilizado en autoclave y esterilizado mediante filtración. La esterilización en autoclave del medio de cultivo se realizó a 121°C durante 15 minutos. La esterilización mediante un sistema de filtración a vacío se realizó con filtro de 0,22µm (Millipore) aplicando el vacío durante un tiempo aproximado de 4 horas.

El extracto R.I.A. obtenido se incorporó en tubos de ensayo estériles a razón de 10mL de medio líquido. La preparación de estos medios de cultivo se realizó en condiciones asépticas. Se emplearon tubos con 10mL de agua de peptona como control positivo de crecimiento.

Los tubos de ensayo fueron inoculados con 0,5mL de inóculo de bacteria crecida en agua de peptona. Tras 4 días de incubación a 30°C se analizó el crecimiento mediante recuento de células viables (Unidades Formadoras de Colonias, UFC) tal y como se describe en el apartado 2.5., sensiblemente modificado. Para ello se realizó una siembra en superficie con 0,1mL de diluciones adecuadas obtenidas a partir de los cultivos en placas de Petri con PCA (Panreac). Se realizaron tres repeticiones por tratamiento. Tras incubar 24h a 30°C, se realizó el recuento de colonias y el cálculo de las UFC/ml (apartado 2.5.).

2.4. Cultivo en medios con R.I.A.

Una vez establecido el impacto de la esterilización de los extractos R.I.A. sobre su calidad nutricional para el crecimiento de las PGPBs, se abordó la fase de comparación del crecimiento de los mismos en los distintos R.I.A.s objeto de estudio. Para ello, y de acuerdo con los resultados obtenidos en los experimentos previos, el protocolo de preparación de los medios de cultivo constituidos por los R.I.A.s se realizó como sigue.

Se prepararon suspensiones al 2% (p/v) de cada uno de los R.I.A. por separado. Primero se maceró el residuo con ayuda de un mortero cerámico al que se fue añadiendo progresivamente agua destilada (Figura 2). Una vez homogeneizado, la pasta se transfirió a una botella ISO, se enrasó con agua destilada a un 100mL y se mantuvo durante 30 min. en agitación magnética a 1000 rpm y 40°C. Posteriormente, el extracto R.I.A. se centrifugó a 4000 rpm a 15°C durante 15 min., para eliminar los sólidos precipitados. Finalmente se esterilizó mediante autoclave a 121°C durante 15 min.



Figura 2. Preparación del extracto RIA, macerado del residuo en mortero cerámico.

Los extractos R.I.A. estériles se incorporaron en tubos de microcentrífuga (Eppendorf) con 1mL y fueron inoculados con 0,01mL de inóculo de la bacteria (Apartado 2.2.). Se realizaron tres repeticiones por cada tipo de bacteria y extracto R.I.A. Como control positivo se utilizó agua de peptona y como control negativo, el medio de cultivo sin inocular. Los tubos se incubaron durante 18-24h a 30°C.

2.5. Medidas analíticas: Medida del Crecimiento.

Para cuantificar el crecimiento de las bacterias en los medios de cultivo se realizaron recuentos de células viables (UFC) empleando el método de Miles y Misra (Miles *et al.*, 1938). Tras el periodo de incubación se prepararon diluciones decimales seriadas de cada cultivo y se sembraron 0,02mL de cada dilución en placas de Petri con medio sólido PCA divididas en sectores separados (Figura 3). Cada sector se empleó para sembrar una dilución. Las placas se incubaron 18-24 h (30°C) y finalizado el tiempo de cultivo se realizó el recuento de colonias. Los resultados se expresaron en unidades formadoras de colonias por mililitro de cultivo (UFC/mL) de acuerdo con la fórmula siguiente. Todos los recuentos se realizaron por triplicado.

$$UFC/mL = \frac{n^{\circ} \text{ de colonias} \times \text{inverso de la dilución sembrada}}{\text{volumen sembrado}}$$

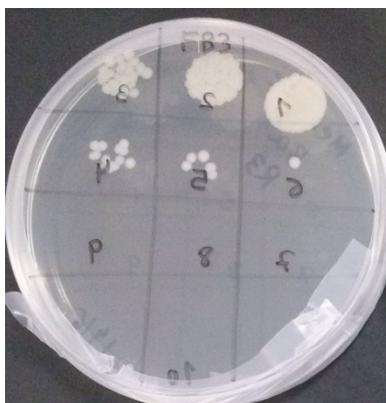


Figura 3. Placa sembrada según el método de Miles y Misra.

2.6. Análisis estadístico

Todos los experimentos se realizaron por triplicado. Los resultados fueron inicialmente procesados mediante el programa Microsoft Office Excel 2010 para Windows, en el que se realizaron las gráficas correspondientes que se muestran en el apartado de resultados. Cada muestra se analizó por triplicado y los datos de UFC/mL se normalizaron mediante su transformación en $\text{Log}(x+1)$. Se analizó el efecto del factor en estudio (medio de cultivo) en la variabilidad de los recuentos de cada microorganismo mediante un Análisis Factorial de Varianza unifactorial (ANOVA), mientras que para la evaluación de la existencia de diferencias significativas para cada nivel del factor indicado se utilizó el Test de HSD (Honestly-significant-difference) de Tukey, empleando un intervalo de confianza del 95% ($p < 0,05$). Para estos análisis se empleó el programa Statgraphics Centurion XVI versión 16.1.17 (StatPoint, Inc., Virginia).

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

3.1. Caracterización de los R.I.A.

La composición nutricional de los residuos empleados en el presente trabajo se detalla en las Tablas 4 y 5. Estos datos fueron facilitados por la empresa cliente del proyecto e incluyen, contenido de materia orgánica, proteína bruta, grasas, hidratos de carbono y la caracterización mineral de cada uno de los residuos de industria agroalimentaria estudiados.

Los residuos de fruta 1, fruta 2 y fruta 4 fueron los de mayor contenido en materia orgánica (>95%), destacando además su elevada proporción de proteínas (>8,8%), mientras que los residuos de fruta 3, frutas y cereales y el lácteo con fruta contuvieron menos de un 0,5% de materia orgánica y entre 2-4% de proteínas, al igual que los lácteos 1 y 2. El contenido graso de los residuos lácteos estuvo en el rango de 1,75 a 3,8% mientras que los residuos de frutas tuvieron unos valores inferiores al 1%, con la excepción de los residuos de fruta 2 y 4 que contuvieron más del 2% de grasas. Los residuos con mayor contenido en hidratos de carbono fueron fruta 2, fruta 3, frutas y cereales y el lácteo con fruta, destacando fruta3 con un valor de 15,8%. En cuanto al contenido de azúcares, se muestran los porcentajes de fructosa, glucosa, sacarosa, maltosa y lactosa. El residuo de fruta 1 es el que contuvo un mayor contenido en fructosa (12,5%) y glucosa (8,16%), y de sacarosa (8,19%), para este último azúcar, el residuo de fruta 2 contuvo valores similares (8,53%). El contenido en maltosa fue prácticamente nulo en todos los residuos analizados, sólo se detectó en los residuos lácteo 1 y lácteo 2 en niveles superiores al 4%.

Tabla 4. Nutrientes orgánicos de los residuos de industria agroalimentaria utilizados en este TFM*.

Medio de cultivo	Abreviatura	Materia Orgánica (%)	Grasa (%)	Proteína (%)	Hidratos de carbono (%)	Azúcares (%)				
						Fructosa	Glucosa	Sacarosa	Maltosa	Lactosa
Fruta 1	C	96,13±1,15	0,85±0,09	8,86±0,25	9,2	12,5±0,09	8,16±1,49	8,19±0,10	<0,1	<0,1
Fruta 2	M	97,53±1,33	2,12±0,29	8,85±0,01	10,3	3,27±0,98	1,71±0,09	8,53±0,12	<0,1	<0,1
Fruta 3	P	0,39±0,02	0,06±0,02	2,82±0,31	15,8	6,25±0,03	5,12±0,14	2,5±0,03	<0,1	<0,1
Fruta + cereal	FC	0,44±0,06	0,11±0,03	2,16±0,03	10,25	5,32±0,09	2,98±0,04	0,97±0,03	<0,1	<0,1
Fruta 4	F	96,19±0,11	3,14±0,32	12,44±0,25	5,51	3,27±0,98	2,32±0,69	0,15±0,02	<0,1	<0,1
Lácteo 1	LRY	14,05±1,23	2,6±0,12	3,96±0,09	4,95	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	4,95±0,05
Lácteo + fruta	YF	0,38±0,03	1,75±0,35	2,15±0,04	10,5	2,89±0,12	1,48±0,07	2,97±0,15	<0,1	<0,1
Lácteo 2	LR+Y	13,45±0,14	3,8±0,09	3,06±0,05	4,7	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	4,7±0,03

*Valores expresados en % (p/p). Se muestra la media de tres repeticiones y la desviación estándar. Los valores <0,1 se encuentran por debajo del límite de detección de la técnica empleada

Tabla 5. Elementos inorgánicos de los residuos de industria agroalimentaria utilizados en este TFM*.

Medio de cultivo	Abreviatura	Concentración (%)					
		N	P	Na	K	Ca	Mg
Fruta 1	C	1,15±0,04	0,03±0,009	0,02±0,004	0,63±0,17	0,41±0,112	0,07±0,018
Fruta 2	M	1,42±0,002	0,02±0,007	0,01±0,003	0,61±0,166	0,18±0,048	0,06±0,015
Fruta 3	P	0,45±0,01	0,02±0,003	0,8±0,32	27,61±3,510	0,65±0,21	2,53±0,37
Fruta + cereal	FC	0,35±0,005	0,02±0,001	0,79±0,14	12,85±0,17	0,76±0,04	1,14±0,02
Fruta 4	F	1,99±0,04	0,08±0,021	0,02±0,005	0,48±0,129	0,42±0,114	0,11±0,029
Lácteo 1	LRY	0,64±0,011	<0,001	0,08±0,009	0,28±0,012	0,14±0,021	0,014±0,014
Lácteo + fruta	YF	0,34±0,004	0,02±0,000	1,35±0,33	8,14±0,46	2±0,2	0,77±0,07
Lácteo 2	LR+Y	0,49±0,009	0,02±0,002	0,05±0,007	0,16±0,015	0,12±0,002	0,01±0,005

*Valores expresados en % (p/p). Se muestra la media de tres repeticiones y la desviación estándar. Los valores <0,1 se encuentran por debajo del límite de detección de la técnica empleada.

Los residuos vegetales contienen principalmente lignocelulosa, además de azúcares solubles, proteínas, almidón, fibras, fenoles y otros materiales hidrolizables que pueden ser metabolizados por una amplia gama de microorganismos, transformando de este modo los residuos en productos con valor añadido. Los residuos empleados en este trabajo, al ser ricos en azúcares y otros nutrientes, proporcionan un medio adecuado para el crecimiento de bacterias PGPBs y la consiguiente formulación de biofertilizantes agrícolas (Panda y Ray, 2015). Otros residuos como por ejemplo el orujo de manzana es una materia prima adecuada para los procesos biotecnológicos por su alto contenido de polisacáridos (principalmente celulosa, almidón y hemicelulosas) y por la presencia de mono-, di- y oligosacáridos, ácido cítrico y ácido málico, además de la riqueza en vitaminas y otros iones minerales que pueden ser metabolizados por microorganismos (Lai *et al.*, 2017).

3.2. Determinación del método de preparación de medios de cultivo.

En la Figura 4 se muestran los resultados de crecimiento de las tres PGPBs ensayadas en los experimentos de establecimiento de protocolo de preparación de los medios de cultivo. Tal y como se indicó en el apartado de metodología, estos ensayos se realizaron empleando un medio constituido por un extracto de fruta 1 mezclado a partes iguales con lácteo 2 y sometido a esterilización por filtración y en autoclave. El objetivo de este estudio preliminar era establecer el método más económico y fiable de preparación del medio. El medio de cultivo sin esterilizar se descartó puesto que estaba contaminado por otros microorganismos, por lo que dificultó el crecimiento y seguimiento de las PGPBs objeto de estudio. Los resultados de crecimiento en los dos medios indicados se compararon con los obtenidos en un medio óptimo para el crecimiento de dichos microorganismos (agua de peptona) que se empleó como control de crecimiento.

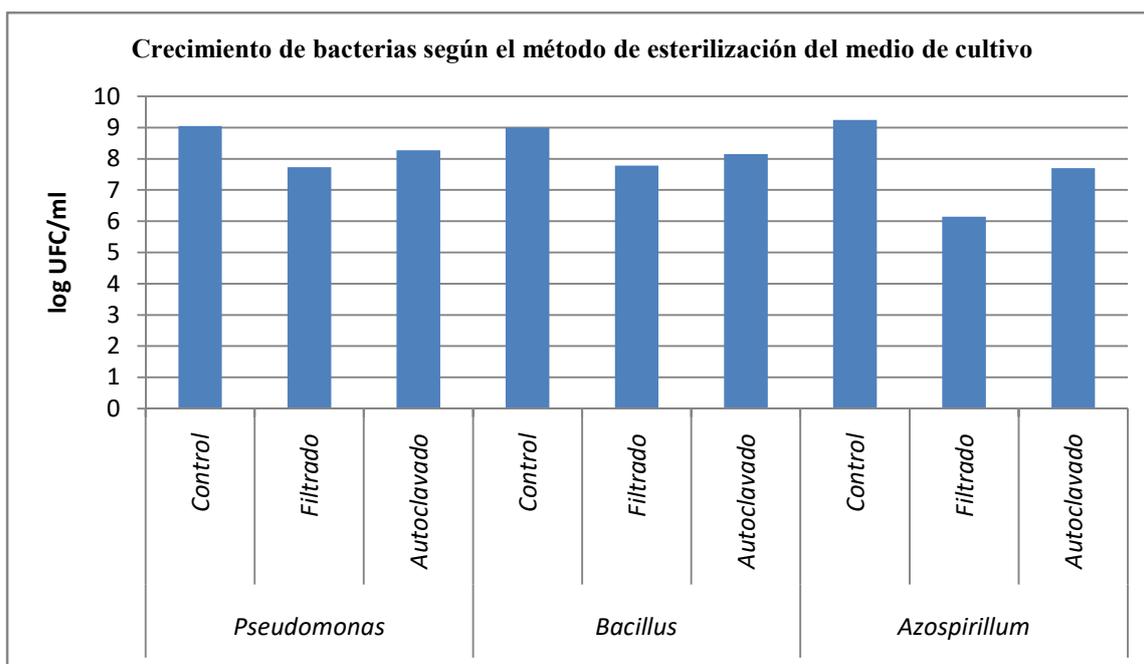


Figura 4. Efecto del método de esterilización del medio de cultivo sobre el crecimiento (Log UFC/mL) de *Pseudomonas*, *Bacillus* y *Azospirillum*. El control corresponde a agua de peptona. Se muestra la media de tres repeticiones.

Todas las bacterias crecieron mejor en el medio control (agua de peptona) que en los medios constituidos por extractos acuosos de residuos. En el primer caso se alcanzaron recuentos en torno a 9 unidades logarítmicas; mientras que en el segundo no superaron 8 unidades. El crecimiento de los medios con extracto R.I.A. fue, en todas las bacterias, mayores en el medio autoclavado que en el medio filtrado. Esta diferencia podría deberse a la reducida eficacia esterilizante del protocolo de filtración, ya que durante el recuento se constató la presencia de contaminación por microorganismos diferentes a los inoculados, que podrían haber dificultado su crecimiento. Aunque es conocida la eficacia esterilizante de los filtros con tamaño de poro inferior a $0,2\mu\text{m}$, la elevada densidad del extracto empleado (0,4% p/v) ocasionó la colmatación de los filtros empleados, que tenían que sustituirse o prolongar excesivamente la filtración. Estas operaciones aumentan el riesgo de contaminación y, por otra parte restan operatividad al protocolo y al propio proceso de aprovechamiento, ya que obligan a emplear suspensiones muy diluidas de R.I.A. Por todo ello se seleccionó el método de esterilización mediante autoclave para la preparación de los medios de cultivo a emplear en los ensayos siguientes. Este método además, permite incrementar la cantidad de residuo empleado.

Los investigadores Gray *et al.* (2008) compararon el crecimiento de bacterias en medio de cultivo esterilizado mediante autoclave y filtración. La hipótesis que manejaban era que el método de esterilización por autoclave provocaría la oxidación de azúcares en tampones de fosfato por reacciones de Maillard, que producirían especies reactivas de oxígeno dentro del medio, además de la posible pérdida de componente del medio lábiles al calor, tales como aminoácidos o vitaminas, lo cual daría lugar a un menor crecimiento de los microorganismos. Además, las enzimas presentes en el medio esterilizado en autoclave serían desnaturalizadas por calor durante el proceso de autoclavado, y por lo tanto permanecerían proteínas de peso molecular más alto y más difíciles de metabolizar por las bacterias. Sin embargo, Gray *et al.* (2008) observaron que el crecimiento de las bacterias estudiadas no fueron afectados, lo que indicó que el valor nutricional del medio no fue alterado de forma mensurable durante los diferentes procedimientos de esterilización.

Una estrategia empleada por otros investigadores para mantener el valor nutricional del medio de cultivo tras el autoclavado, consiste en incorporar nutrientes. Así, Di Donato *et al.*, (2011) suplementaron medios de cultivo a base de residuos vegetales (tomate, limones, zanahorias, hinojo) con vitaminas y oligoelementos y evaluaron el crecimiento de bacterias, porque afirmaban que las vitaminas ya presentes en los residuos se degradarían mediante el tratamiento térmico necesario para la esterilización; y por otra parte, los minerales, sales y otros oligoelementos de los desechos no eran suficientes para promover y mantener un crecimiento apreciable en intervalos de tiempo razonables (Di Donato *et al.*, 2011).

Por su parte, Bashan *et al.* (2014) indicaron que para la producción de un inoculante microbiano para la formulación de un biofertilizante, el medio de cultivo puede ser estéril o no estéril. A pesar de que el proceso de esterilización por autoclave reduce la rentabilidad del proceso de producción del biofertilizante, ya que es laborioso, consume mucha energía y tiempo, y lo más importante, puede modificar las propiedades químicas del medio generando incluso sustancias inhibitorias del crecimiento bacteriano; Bashan *et al.* (2014) y Petre *et al.* (2014) recomiendan dicho procedimiento para la producción de biofertilizantes. Para ello alegan que esterilizar el medio de cultivo líquido tiene ventajas significativas al asegurar el crecimiento exclusivo del microorganismo correcto y a la concentración precisa, evitando la potencial

contaminación con otros microorganismos indígenas que pueden inhibir el número de células de la bacteria cultivada.

De acuerdo con lo expuesto, en el presente trabajo se optó por utilizar el método de esterilización por autoclave al ser más ventajoso en tiempo y manejo, al permitir obtener el medio de cultivo estéril reduciendo el número de ejecuciones en un mismo ciclo de trabajo, por asegurar una esterilización eficiente y por el ahorro en material.

Para el diseño final del protocolo de preparación de los medios de cultivo líquidos constituidos por de residuos sólidos procedentes de industria agroalimentaria, se recopiló información de la metodología de varias publicaciones relacionadas con el crecimiento de bacterias con potencial biofertilizante. En la bibliografía consultada, se emplearon diversos residuos vegetales deshidratados (cebolla, ajo, maíz, repollo, lechuga, cebollín, sandía, mango, manzana, plátano), para el crecimiento de bacterias PGPBs, con la mezcla de material vegetal deshidratado en polvo en una proporción del 2% p/v, macerado durante 30 minutos en agua destilada, posteriormente centrifugado para recoger el sobrenadante y esterilizado a 1 atm de presión, 121 °C, durante 15-20 min. (Lara-Mantilla *et al.*, 2010; Batoool *et al.*, 2015; Berde y Berde, 2015).

Los medios de cultivo preparados siguiendo el protocolo indicado se emplearon para el crecimiento de cada una de las tres PGPBs y cuyos resultados se detallan en los apartados siguientes.

3.3. Crecimiento de *Pseudomonas* en medios R.I.A.

El residuo empleado en la elaboración de los medios de cultivo influyó significativamente en los niveles de crecimiento de *Pseudomonas* (Tabla 6). En el gráfico ANOVA (Figura 5) se puede observar que los medios de cultivo de fruta 3 (P), frutas y cereales (F+C), y lácteo con fruta (YF) junto al control de agua de peptona (AP) son los que más contribuyeron al efecto.

Tabla 6. Análisis de varianza ANOVA para el efecto del tipo de medio de cultivo sobre el crecimiento de la bacteria *Pseudomonas*.

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	393,55	8	49,19	1093,81	0,0000
Intra grupos	0,81	18	0,05		
Total (Corr.)	394,35	26			

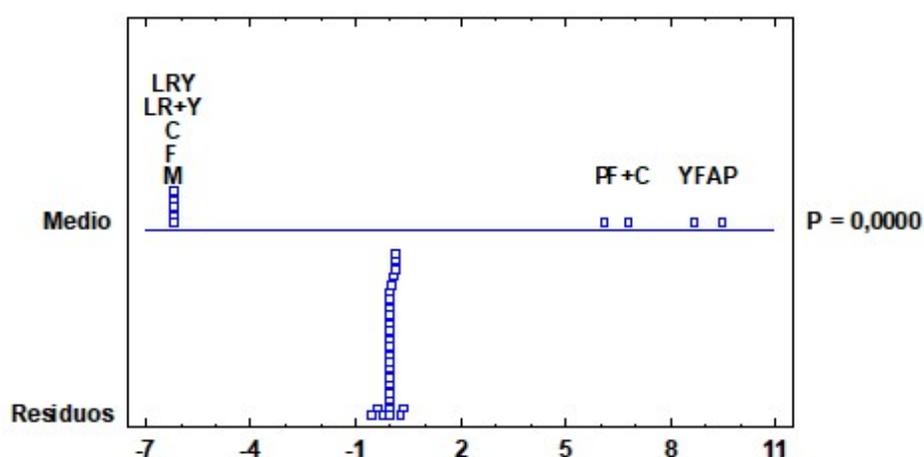
ANOVA Gráfico para *Pseudomonas*

Figura 5. Gráfico ANOVA para el efecto del tipo de medio de cultivo sobre el crecimiento de la bacteria *Pseudomonas* medido en Log UFC/ml. En la parte derecha se indica el valor P del factor evaluado. Control agua de peptona (AP); Medios de cultivo de residuos: fruta 1 (C); fruta 2 (M); fruta 3 (P); frutas y cereales (F+C); Fruta 4 (F); lácteo 1 (LRY); lácteo y fruta (YF); lácteo 2 (LR+Y).

El análisis post-hoc de los datos según el test HSD Tukey ($p < 0,05$) puso de manifiesto la existencia de 3 grupos de homogeneidad según el medio empleado. Los mayores valores de crecimiento (> 8 unidades logarítmicas) se obtuvieron en el control de agua de peptona y en el medio de lácteo con fruta (YF). El crecimiento fue significativamente inferior (alrededor de 7 unidades) en los medios de fruta 3 (P) y frutas y cereales (F+C). En el resto de medios de cultivo no se observó crecimiento de la bacteria *Pseudomonas*.

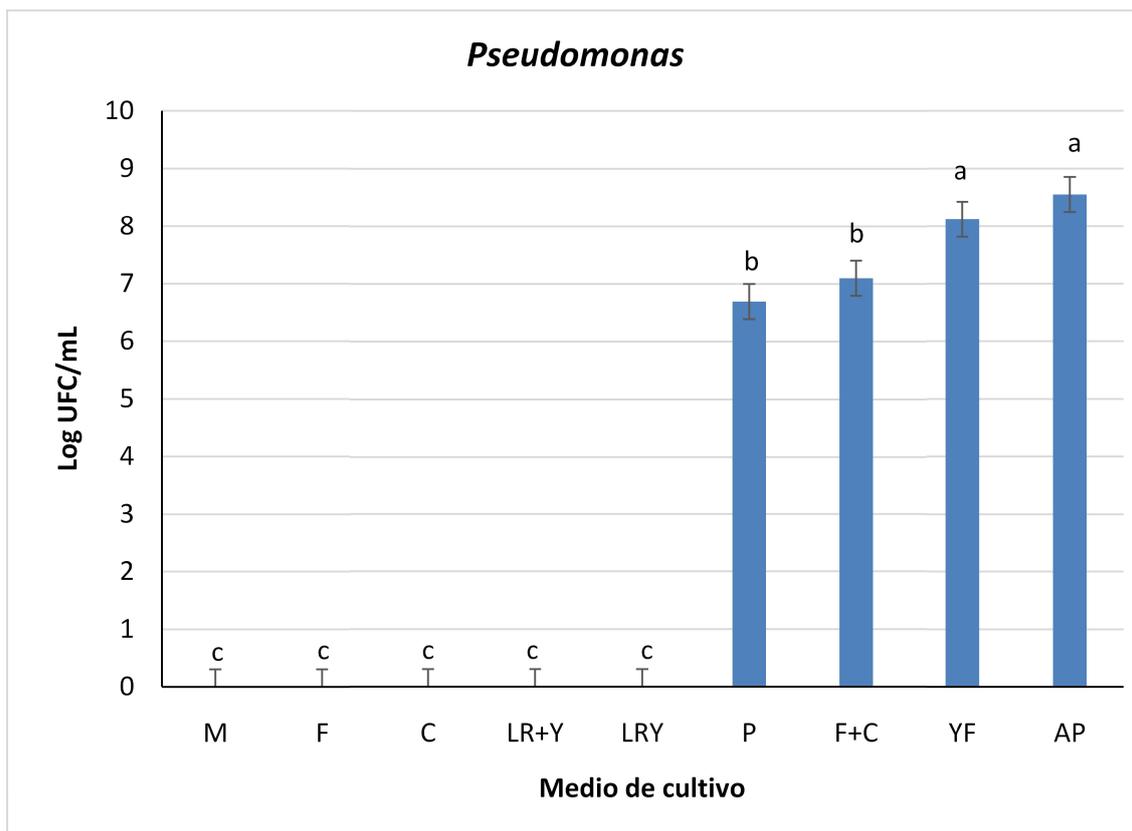


Figura 6. Crecimiento de *Pseudomonas* (Log UFC/ml) en los distintos medios evaluados. Control agua de peptona (AP); Medios de cultivo de residuos: fruta 1 (C); fruta 2 (M); fruta 3 (P); frutas y cereales (F+C); Fruta 4 (F); lácteo 1 (LRY); lácteo y fruta (YF); lácteo 2 (LR+Y). Se representa la media de tres repeticiones (n=3), las barras con diferente letra denotan diferencias significativas según el test HSD Tukey ($p < 0,05$).

Los residuos en los que *Pseudomonas* sp. creció, fruta 3, frutas con cereales y lácteo con fruta, poseen alto contenido en potasio, magnesio, calcio y sodio y bajos en nitrógeno, proteínas y fósforo, tal y como se indicó en las tablas 4 y 5.

Los investigadores Berde y Berde (2015) obtuvieron buenos resultados para el crecimiento de *Pseudomonas* spp utilizando medio de cultivo líquido a base de restos orgánicos deshidratados, en una proporción del 2% p/v, con un contenido de azúcares similar al de proteínas. Estos resultados difieren con los resultados obtenidos en este trabajo fin de máster, porque los R.I.A. que dieron mejores resultados en el crecimiento en *Pseudomonas* contienen un nivel más alto de azúcares (15,8% en fruta4, 10,5% en lácteo con fruta, 10,25% en fruta con cereal) que de proteínas (2,82% en fruta4, 2,15% en lácteo con fruta, 2,16% en fruta con cereal) y no se observó crecimiento en otros residuos con mayor contenido en proteínas y azúcares como fruta 1 o fruta 2.

3.4. Crecimiento de *Bacillus* en medios RIA.

Al igual que en el caso de *Pseudomonas*, el tipo de residuo empleado en la elaboración de los medios influyó significativamente en el crecimiento de *Bacillus* (Tabla 7). Prácticamente todos los medios de cultivo contribuyeron a dicho efecto (Figura 7).

Tabla 7. Análisis de varianza ANOVA para el efecto del tipo de medio de cultivo sobre el crecimiento de la bacteria *Bacillus*.

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	210,46	8	26,30	51,79	0,0000
Intra grupos	9,14	18	0,51		
Total (Corr.)	219,56	26			

ANOVA Gráfico para *Bacillus*

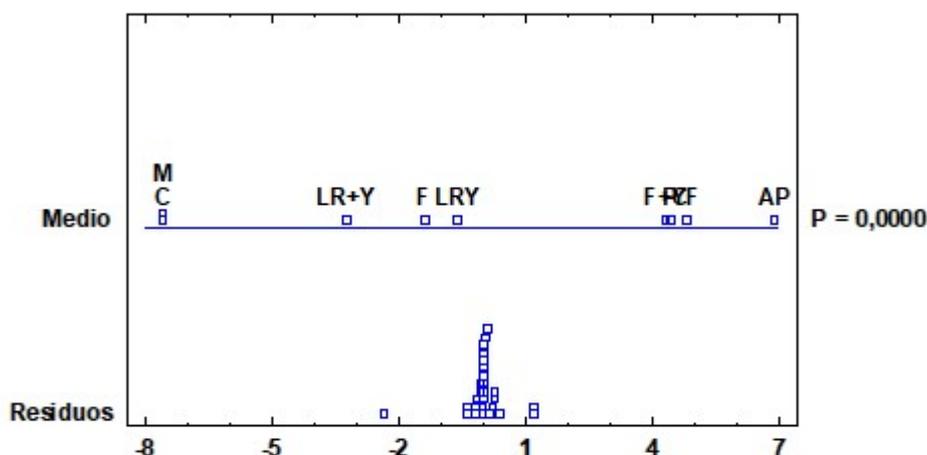


Figura 7. Gráfico ANOVA para el efecto del tipo de medio de cultivo sobre el crecimiento de la bacteria *Bacillus* medido en Log UFC/ml. En la parte derecha se indica el valor P del factor evaluado. Control agua de peptona (AP); Medios de cultivo de residuos: fruta 1 (C); fruta 2 (M); fruta 3 (P); frutas y cereales (F+C); Fruta 4 (F); lácteo 1 (LRY); lácteo y fruta (YF); lácteo 2 (LR+Y).

Según el test HSD Tukey ($p < 0,05$) se identificaron 3 grupos de homogeneidad. En el grupo A, que integra los valores de crecimiento de la bacteria en el control de agua de peptona (AP) y en los medios de cultivo de residuo de lácteo con fruta (YF), fruta 3 (P) y de frutas con cereales (F+C), se obtuvieron los mayores valores de crecimiento (en torno a 7 unidades logarítmicas). En el grupo B, el crecimiento fue

significativamente inferior (alrededor de 3 unidades logarítmicas) y se obtuvo en medios de cultivo de fruta 4 (F), lácteo 1 (LRY) y lácteo 2 (LR+Y). En los dos medios restantes, fruta 1 (C) y fruta 2 (M) no se observó crecimiento de la bacteria *Bacillus*.

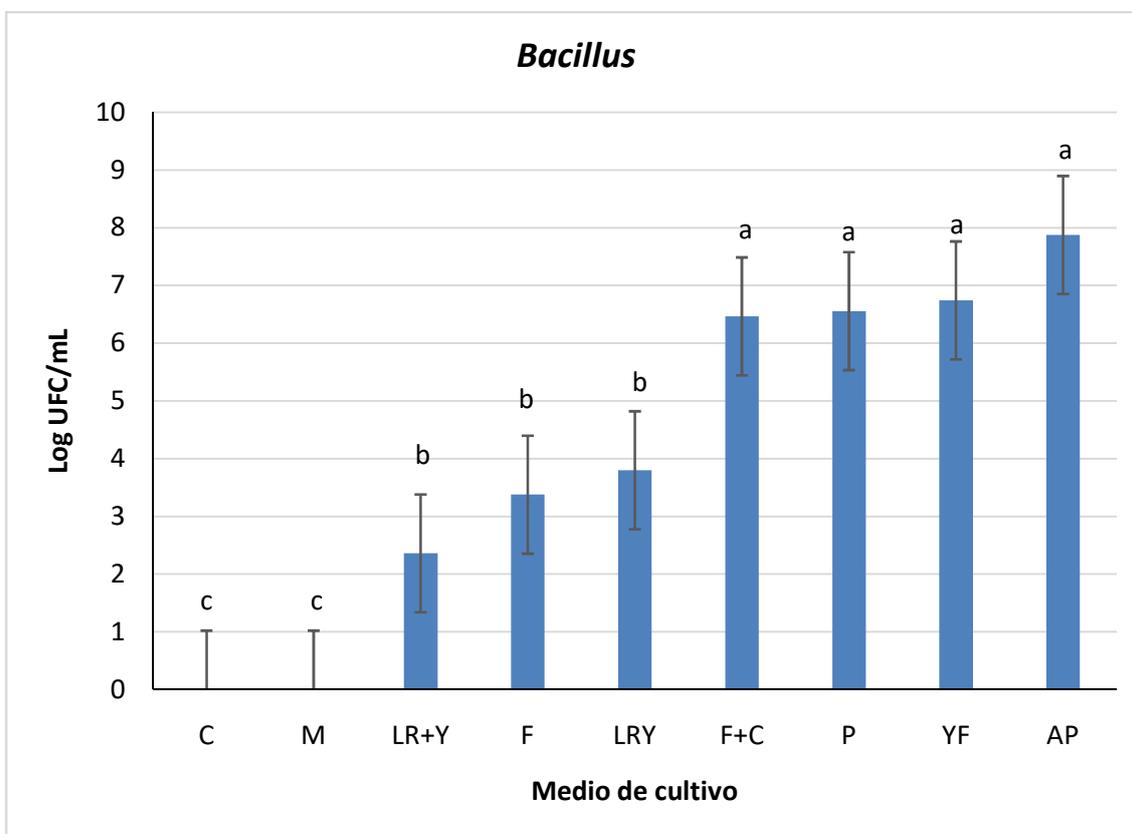


Figura 8. Crecimiento de *Bacillus* (Log UFC/ml) en los distintos medios evaluados. Control agua de peptona (AP); Medios de cultivo de residuos: fruta 1 (C); fruta 2 (M); fruta 3 (P); frutas y cereales (F+C); Fruta 4 (F); lácteo 1 (LRY); lácteo y fruta (YF); lácteo 2 (LR+Y). Se representa la media de tres repeticiones (n=3), las barras con diferente letra denotan diferencias significativas según el test HSD Tukey ($p < 0,05$).

La bacteria *Bacillus* sp. creció mejor en los medios de cultivo preparados con extractos R.I.A. con elevado contenido en potasio, magnesio, calcio y sodio y bajos niveles en proteínas, nitrógeno y fósforo (Tablas 4 y 5).

Diferentes investigaciones han probado residuos y subproductos agroindustriales para el desarrollo de medios de cultivo para la producción a gran escala de *Bacillus* spp. Así se han utilizado ingredientes de bajo coste, tales como almidón de maíz, pulpa de raíz de remolacha, plátano y extracto de flor de mahua (*Madhuca indica* L.) como fuente de carbono; y harina de soja, harina de semilla de leguminosa, extracto de levadura, extracto de malta, extracto de carne de vaca, polvo de albúmina de huevo, polvo de caseína como fuentes de nitrógeno (Devidas *et al.*, 2014). En la investigación

realizada por Batool *et al.* (2015), diferentes especies del género *Bacillus* fueron cultivadas en medios preparados con residuos deshidratados de sandía, mango, manzana, bagazo de caña de azúcar, patata y cáscara de plátano para comprobar su potencial de crecimiento comparativo. Todos mostraron crecimiento en extractos acuosos al 2% de los diferentes residuos tras 24 horas de incubación, aunque destacó la cáscara de sandía.

Por su parte, Alves *et al.* (1997) usaron suero de queso, leche de soja, extracto de salvado de trigo, melaza de caña de azúcar, proteína de semillas de leguminosas, glicerol, sacarosa, residuo industrial de la producción de glutamato monosódico y sales. Estos investigadores obtuvieron los mejores resultados de crecimiento de *Bacillus* spp. con medio de cultivo a base de lácteos y vegetales con un porcentaje de proteína del 35% y un ratio C/N de 1:1,5, respecto a otras formulaciones con proporciones mayores.

A su vez, Fernández *et al.* (2003) ensayaron medios de cultivo con diferentes concentraciones de harina de soja y de levadura, como fuentes de nitrógeno, y de almidón como fuente de carbono, para el crecimiento de *Bacillus* spp. En estos experimentos el almidón fue el sustrato limitante para el crecimiento de la bacteria y concluyeron que para el crecimiento óptimo la relación C/N debe ser baja para canalizar el metabolismo hacia el crecimiento celular. En contraste, en los experimentos realizados en el presente trabajo, el porcentaje de proteínas en los residuos I.A. donde se observó mayor crecimiento de *Bacillus* fue bajo, entre 2,1-2,8%, con alto contenido en hidratos de carbono, entre 10,2-15,8% y bajo contenido en nitrógeno entre 0,34-0,45%, lo que se traduce en una probable elevada relación C/N en el medio final. No obstante, dado que los resultados de los análisis se refieren a los materiales sólidos antes de obtener los extractos, es difícil establecer una comparación de resultados. Así debiera analizarse la composición de los medios empleados, tras la extracción y esterilización, para poder extraer una conclusión relativa al efecto de la composición elemental en el crecimiento del microorganismo.

Para el crecimiento de *Bacillus* spp. y la obtención de alta concentración de biomasa bacteriana, Fernández-Larrea (2002) indicó que la composición del medio de cultivo, además de mantener un buen balance de nutrientes, principalmente carbono y nitrógeno, debe poseer una buena proporción de otros elementos tales como las sales de

magnesio, manganeso, carbonatos y fosfatos. Cabe destacar que en los residuos utilizados en los experimentos del presente T.F.M. en los que se observó mayor crecimiento de *Bacillus*, contenían un mayor porcentaje de magnesio (0,77% en lácteo con fruta, 1,14% en fruta con cereal y 2,53% en fruta 3) y calcio (0,65% en fruta 3, 0,76% en fruta con cereal, y 2% en lácteo con fruta), y unos valores intermedios de fósforo (0,02%) respecto al resto de residuos ensayados.

Por su parte, Omer (2010) indicó que los elementos que más influyen en el crecimiento de *Bacillus* spp. son el potasio, magnesio, manganeso, y cinc, que intervienen en la activación de diversos sistemas enzimáticos necesarios para la esporulación de la bacteria. Respecto a los niveles de potasio, los residuos en los que se observó mayor crecimiento de *Bacillus* en los experimentos realizados en el presente trabajo fin de máster fueron los de mayores porcentajes de potasio (8,1% en lácteo con fruta, 12,85% en lácteo con cereal, y 27,6% en fruta 3).

Por otra parte, en los experimentos de Posada-Urbe *et al.* (2015) fueron la glucosa y el magnesio los componentes que afectaron principalmente a la producción de esporas de *Bacillus subtilis*, lo cual coincide en parte con los experimentos realizados en el presente T.F.M., puesto que los residuos con mayor crecimiento de la bacteria contenían los niveles más altos de magnesio, aunque los niveles de glucosa fueron intermedios (1,48% en lácteo y fruta, 2,98% en fruta y cereal, y 5,12% en fruta 3).

Anandham *et al.* (2015) obtuvieron buenos resultados de crecimiento de *Bacillus* spp. en medio de cultivo elaborado con yogur, melaza, residuos de frijol, salvado de arroz y residuos de palma, con un contenido de nutrientes de 45% de nitrógeno, 1,5% de fósforo y 1% de potasio. Estos resultados difieren a los obtenidos en los experimentos realizados en el presente T.F.M., donde los residuos lácteo con fruta, lácteo con cereal y fruta 3 con mayores valores de crecimiento de *Bacillus* contenían bajos niveles de nitrógeno, en torno a 0,34-0,45%, bajo contenido en fósforo (en torno al 0,02%) y altos niveles de potasio (8,1% en lácteo con fruta, 12,85% en lácteo con cereal, y 27,6% en fruta 3).

Finalmente, hay que tener en cuenta que los requerimientos nutricionales difieren sensiblemente entre especies del mismo género. Así, Posada-Urbe *et al.* (2015)

destacan que diferentes especies del género *Bacillus* presentan condiciones óptimas de cultivo y medios de crecimiento particulares, incluso cada cepa tiene sus propios requisitos y condiciones óptimas. Por ejemplo, la presencia de glutamato en el medio beneficia el crecimiento de *Bacillus cereus*, mientras que para otras especies de *Bacillus* este compuesto inhibe el crecimiento, e igual ocurre con la adición de sales a los medios o de elementos como calcio, manganeso, magnesio, hierro y cinc.

3.5. Crecimiento de *Azospirillum* en medios R.I.A.

Los niveles de crecimiento de *Azospirillum* estuvieron fuertemente influidos por la composición del medio de cultivo (Tabla 8). Los medios constituidos por fruta 4 (F) y el control de agua de peptona (AP) fueron los que más contribuyeron a dicho efecto (Figura 9).

Tabla 8. Análisis de varianza ANOVA para el efecto del tipo de medio de cultivo sobre el crecimiento de la bacteria *Azospirillum*.

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	296,61	8	37,08	4327,96	0,0000
Intra grupos	0,15	18	0,01		
Total (Corr.)	394,35	26			

ANOVA Gráfico para *Azospirillum*

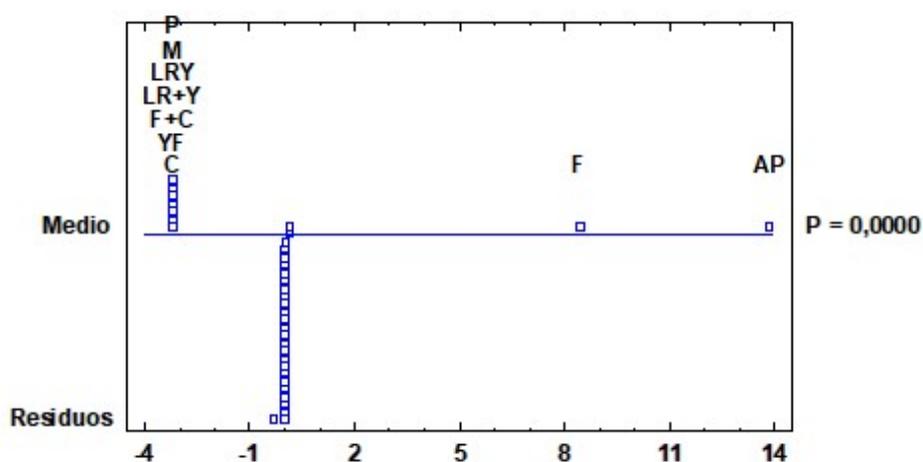


Figura 9. Gráfico ANOVA para el efecto del tipo de medio de cultivo sobre el crecimiento de la bacteria *Azospirillum* medido en Log UFC/ml. En la parte derecha se indica el valor P del factor evaluado. Control agua de peptona (AP); Medios de cultivo de residuos: fruta 1 (C); fruta 2 (M); fruta 3 (P); frutas y cereales (F+C); Fruta 4 (F); lácteo 1 (LRY); lácteo y fruta (YF); lácteo 2 (LR+Y).

Azospirillum sólo creció en el control de agua de peptona y en el medio de fruta 4 (F) (Figura 10). Los niveles de crecimiento fueron significativamente superiores en el medio control (alrededor de 9 unidades logarítmicas) que en el medio de fruta 4 (en torno a 6 unidades logarítmicas). En el resto de medios de cultivo no se observó el crecimiento de la bacteria.

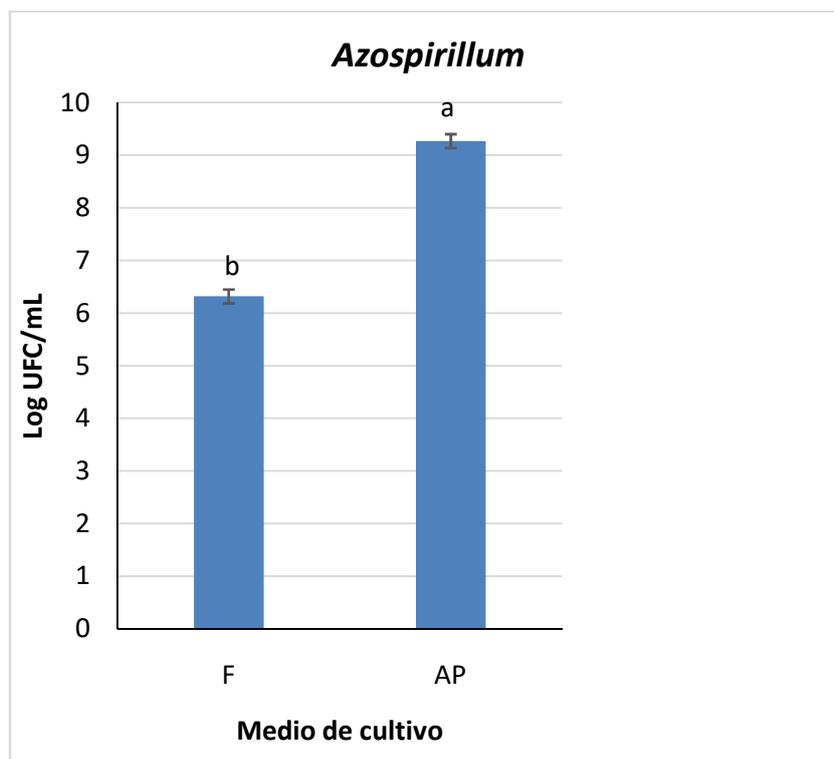


Figura 10. Crecimiento de *Azospirillum* (Log UFC/ml) en los distintos medios evaluados. Control agua de peptona (AP); Medio de cultivo de residuos de fruta 4 (F). Se representa la media de tres repeticiones (n=3), las barras con diferente letra denotan diferencias significativas según el test HSD Tukey ($p < 0,05$).

El único medio con residuo en el que creció *Azospirillum* sp. fue el constituido por extracto de fruta 4. Cabe destacar que este residuo presentó un alto contenido en materia orgánica y proteínas, nitrógeno y fósforo, y bajo contenido en azúcares, hidratos de carbono, sodio y potasio (Tablas 4 y 5).

Este bajo contenido en azúcares coincide con lo descrito por Bashan *et al.* (2011) quienes indican que la glucosa no es utilizada por algunas especies de *Azospirillum*, como ocurre en la especie más común *Azospirillum brasilense*, que prefiere otros ácidos orgánicos, principalmente malato y succinato como fuentes de carbono que son más comunes en los exudados radiculares de muchas plantas. Tal y

como comentan Pathak *et al.* (2016), el medio utilizados para la producción comercial de bioinoculantes de *Azospirillum* spp. es el medio Okon que contiene malato como fuente carbono y extracto de levadura como fuente de vitaminas.

Por su parte, Bashan *et al.* (2011) utilizaron un medio con triptona como fuente de nitrógeno y extracto de levadura que aporta vitaminas, pero sustituyeron la glucosa por gluconato de sodio y glicerol. De esta forma consiguieron aumentar las tasas de crecimiento y reducir el tiempo de generación de cada cepa. Sin embargo el coste de producción empleando los medios propuestos por estos investigadores puede ser relativamente costoso y no es viable para la producción a gran escala de inoculantes baratos (Bashan *et al.*, 2011).

Por otra parte, Rivera *et al.* (2012) ensayaron seis sustratos a base de ingredientes de bajo coste para el crecimiento de *Azospirillum* spp. Se evaluaron 9 factores nutricionales: cuatro fuentes de carbono (sacarosa, melaza, glutamato y glicerol), dos fuentes de nitrógeno (hidrolizado de soja e hidrolizado de extracto de levadura), dos sales (K_2HPO_4 y $MgSO_4$) y solución de microelementos. El extracto de levadura, con una relación C/N de 11,28 (84,8% carbono y 7,52% nitrógeno) produjo una mayor estimulación del crecimiento de la bacteria respecto al de soja. En los resultados del presente trabajo fin de máster, se observó crecimiento de la bacteria *Azospirillum* en el medio de cultivo de fruta 4 que contiene una relación C/N de 2,76 (5,51% fuentes de carbono y 1,99% nitrógeno total) mucho menor que los resultados obtenidos por los investigadores Rivera *et al.* (2012).

4. CONCLUSIONES

De acuerdo con los resultados obtenidos se pueden extraer las siguientes conclusiones:

1. El método más eficaz para la preparación de los medios de cultivo con extractos de residuos R.I.A. es mediante esterilización con autoclave frente a la filtración.
2. El uso de residuos procedentes del procesado de la leche, frutas y cereales de la industria agroalimentaria puede considerarse una materia prima con potencial uso en la preparación de medios de cultivo económicos para el crecimiento de bacterias PGPBs.
3. Los medios de cultivo preparados con residuos de fruta 3, frutas con cereales y lácteo con fruta son adecuados para el crecimiento de *Pseudomonas* sp. y *Bacillus* sp. y el residuo de fruta 4 para *Azospirillum* sp., frente a los otros residuos agroalimentarios evaluados.

5. AGRADECIMIENTOS

Me gustaría agradecer, en primer lugar a mi tutora la Dra. María José López, por su dedicación y supervisión del TFM. Gracias por brindarme su apoyo, ánimo y colaboración en todo momento. Sin duda, no lo hubiera conseguido sin su ayuda.

La realización de este trabajo fin de máster ha sido posible gracias a las prácticas realizadas en el Laboratorio Analítico del Centro Tecnológico Tecnova.

Gracias a todos aquellos que han contribuido en este trabajo, y en especial a mi compañera y amiga Katalina, por compartir conmigo muchos momentos tanto alegres como tristes durante la realización de las prácticas.

A todos, mi más sincero agradecimiento.

6. BIBLIOGRAFÍA.

Alves, L. F. A.; Alves, S. B.; Pereira, R. M.; Capalbo, D. M. F. 1997. Production of *Bacillus thuringiensis* Berliner var. *kurstaki* grown in alternative media. *Biocontrol Science and Technology*. 7, 377-383.

Anandham, R.; Premalatha, N.; Jee, H. J.; Weon, H. Y.; Kwon, S. W.; Krishnamoorthy, R.; Gandhi, P. I.; Kim, Y. K.; Gopal, N. O. 2015. Cultivable bacterial diversity and early plant growth promotion by the traditional organic formulations prepared using organic waste materials. *The International Journal of Recycling of Organic Waste in Agriculture*. 4, 279-289.

Bashan, Y.; De-Bashan, L. E. 2015. Inoculant preparation and formulations for *Azospirillum* spp. Cap. 26, 469-485. En: *Handbook for Azospirillum*. (Eds.) Cassán F. D.; Okon, Y.; Creus, C. M. Springer International Publishing. Suiza.

Bashan, Y.; De-Bashan, L. E. 2010. Chapter Two - How the Plant Growth-Promoting Bacterium *Azospirillum* promotes plant growth - A critical assessment. *Advances in Agronomy*. 108, 77-136.

Bashan, Y.; De-Bashan, L. E.; Prabhu, S. R.; Hernández, J. P. 2014. Advances in Plant Growth-Promoting Bacterial inoculant technology: formulations and practical perspectives (1998–2013). *Plant Soil*. 378 (1-2), 1-33.

Bashan, Y.; Trejo, A.; De-Bashan, L. E. 2011. Development of two culture media for mass cultivation of *Azospirillum* spp. and for production of inoculants to enhance plant growth. *Biology and Fertility of Soils*. 47, 963-969.

Batool, N.; Shakir, H. A.; Qazi, J. I. 2015. Comparative growth potential of different *Bacillus* species on fruit peels. *Punjab University Journal of Zoology*. 30(1), 25-29.

Berde, C. V.; Berde, V. B. 2015. Vegetable waste as alternative microbiological media for laboratory and industry. *World Journal Of Pharmacy And Pharmaceutical Sciences*. 4 (5), 1488-1494.

De-Bashan, L. E.; Holguin, G.; Glick, B. R.; Bashan, Y. 2007. Bacterias promotoras de crecimiento en plantas para propósitos agrícolas y ambientales. Cap. 8, 170-224. En: Microbiología agrícola: hongos, bacterias, micro y macrofauna, control biológico, planta-microorganismo. (Eds.) Ferrera-Cerrato, R.; Alarcón, A. Ed. Trillas, México.

Desai, S.; Kumar, G. P.; Amalraj, L. D.; Bagyaraj, D. J.; Ashwin, R. 2016. Exploiting PGPR and AMF Biodiversity for plant health management. Cap. 8, 145-160. En: Microbial inoculants in sustainable agricultural productivity, Vol. 1: Research Perspectives. (Eds.) Singh, D.; Singh, H.; Prabha, R. Ed. Springer. India.

Di Benedetto, N. A.; Corbo, M. R.; Campaniello, D.; Cataldi, M. P.; Bevilacqua, A.; Sinigaglia, M.; Flagella, Z. 2017. The role of Plant Growth Promoting Bacteria in improving nitrogen use efficiency for sustainable crop production: a focus on wheat. *AIMS Microbiology*. 3(3), 413-434.

Di Donato, P.; Fiorentino, G.; Anzelmo, G.; Tommonaro, G.; Nicolaus, B.; Poli, A. 2011. Re-use of vegetable wastes as cheap substrates for extremophile biomass production. *Waste and Biomass Valorization*. 2, 103-111.

Fernández, E.; Fernández-Larrea, O.; Núñez, R. 2003. Influencia de los nutrientes sobre la velocidad de crecimiento de *Bacillus thuringiensis* LBT-25. *Fitosanidad*. 7 (2), 43-47.

Fernández-Larrea, O. 2002. Tecnologías de producción de *Bacillus thuringiensis*. *Manejo Integrado de Plagas y Agroecología*. 64, 110-115.

Glick, B. R. 2012. Plant Growth-Promoting Bacteria: mechanisms and applications. *científica*. Vol. 2012, 1-15. doi: 10.6064/2012/963401

Gray, V. L.; Müller, C. T.; Watkins, I. D.; Lloyd, D. 2008. Peptones from diverse sources: pivotal determinants of bacterial growth dynamics. *Journal of Applied Microbiology*. 104, 554-565.

Gupta, G.; Parihar, S. 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 and Biochemical Technology*. 7, 96-102.

Hassen, A. I.; Bopape, F. L.; Sanger, L. K. 2016. Microbial inoculants as agents of growth promotion and abiotic stress tolerance in plants. Cap. 2, 23-36. En: *Microbial inoculants in sustainable agricultural productivity*, Vol. 1: Research Perspectives. (Eds.) Singh, D.; Singh, H.; Prabha, R. Ed. Springer. India.

Lai, W. T.; Khong, N. M. H.; Lim, S. S.; Hee, Y. Y.; Sim, B. I.; Lau, K. Y.; Lai, O. M. 2017. A review: Modified agricultural by-products for the development and fortification of food products and nutraceuticals. *Trends in Food Science and Technology*. 59, 148-160.

Lara-Mantilla, C. L.; García-Támara, L. P.; Oviedo-Zumaqué, L. E. 2010. Medio de cultivo utilizando residuos-sólidos para el crecimiento de una bacteria nativa con potencial biofertilizante. *Revista Colombiana de Biotecnología*. 12 (1), 103-112.

Miles, A. A.; Misra, S. S.; Irwin, J.O. 1938. The estimation of the bactericidal power of the blood. *Journal of Hygiene*, 38, 732-749.

Ministerio de Agricultura y Pesca, Alimentación y Medio Ambiente de España (MAPAMA). 2005. Guía de mejores técnicas disponibles en España del sector lácteo.

Disponible en Internet:

http://www.mapama.gob.es/es/alimentacion/temas/industria-agroalimentaria/Gu%C3%ADa_MTD_en_Espa%C3%B1a_Sector_L%C3%A1cteo_tcm7-8218.pdf

MAPAMA. 2006. Guía de mejores técnicas disponibles en España del sector de los transformados vegetales. Disponible en Internet:

http://www.mapama.gob.es/es/alimentacion/temas/industria-agroalimentaria/Gu%C3%ADa_MTD_en_Espa%C3%B1a_Transformados_Vegetales_tcm7-8221.pdf

MAPAMA. 2014. Las pérdidas y el desperdicio alimentario en la industria agroalimentaria española: situación actual y retos de futuro. Disponible en Internet: http://www.mapama.gob.es/es/alimentacion/temas/estrategia-mas-alimento-menos-desperdicio/Resumen_ejecutivo_Industria_FINAL_tcm7-339835.pdf

MAPAMA. 2016 a. Informe anual de la industria alimentaria española periodo 2014 (Encuesta industrial) - 2016_ (DIRCE y Comercio Exterior). Disponible en Internet: http://www.mapama.gob.es/es/alimentacion/temas/industria-agroalimentaria/_informeanualindustriaalimentaria2014-2016_tcm7-203254.pdf

MAPAMA. 2016 b. Decálogo de sostenibilidad integral de la industria agroalimentaria. Disponible en Internet: http://www.mapama.gob.es/es/alimentacion/temas/industria-agroalimentaria/decalogodesostenibilidadintegralhgc2872016_tcm7-428754.pdf

Omer, A. M. 2010. Bioformulations of *Bacillus* spores for using as biofertilizer. Life Science Journal. 7 (4), 124-131.

Panda, S. K.; Ray, R. C. 2015. Microbial processing for valorization of horticultural wastes. Cap. 11, 203-221. En: Environmental Microbial Biotechnology. (Eds.) Sukla, L. B.; Pradhan, N.; Panda, S.; Mishra, B. K. Ed. Springer International Publishing. Suiza.

Pathak, D. V.; Kumar M. 2016. Microbial inoculants as biofertilizers and biopesticides. Cap. 11, 197-210. En: Microbial inoculants in sustainable agricultural productivity. (Eds.) Singh, D.; Singh, H.; Prabha, R. Ed. Springer. India.

Patil, C. D.; Pandit, B. H.; Vitthalrao, P. S. 2014. Evaluation of different culture media for improvement in bioinsecticides production by indigenous *Bacillus thuringiensis* and their application against larvae of *Aedes aegypti*. The Scientific World Journal. Vol. 2014. doi:10.1155/2014/273030.

Petre, M.; Petre, V.; Rusea, I. 2014. Microbial composting of fruit tree wastes through controlled submerged fermentation. Italian Journal Of Agronomy, 9 (4), 152-156.

Posada-Uribe, L. F.; Romero-Tabarez, M.; Villegas-Escobar, V. 2015. Effect of medium components and culture conditions in *Bacillus subtilis* EA-CB0575 spore production. *Bioprocess and Biosystems Engineering*. 38, 1879-1888.

Rai, A. K.; Singh, D. P.; Prabha, R.; Kumar, M.; Sharma, L. 2016. Microbial inoculants: identification, characterization, and applications in the field. Cap. 6, 103-115. En: *Microbial inoculants in sustainable agricultural productivity*, Vol. 1: Research Perspectives. (Eds.) Singh, D.; Singh, H.; Prabha, R. Ed. Springer. India.

Rivera, D.; Obando, M.; Bonilla, R. 2012. Estandarización de un medio de cultivo a partir de fuentes agroindustriales para la multiplicación de *Azospirillum brasilense*. *Respuestas*. 17(2), 31-38.

Singh, J. S.; Pandey, V. C.; Singh D. P. 2011. Efficient soil microorganisms: A new dimension for sustainable agriculture and environmental development. *Agriculture, Ecosystems and Environment*. 140, 339-353.

Singh, R.; Arora, N. K. 2016. Bacterial formulations and delivery systems against pests in sustainable agro-food production. Module in *Food Science*, Elsevier, 1-11. doi: 10.1016/B978-0-08-100596-5.03068-7

Szilagyi-Zecchin, V. J.; Mógor, Á. F.; Figueiredo, G. G. O. 2016. Strategies for characterization of agriculturally important bacteria. Cap. 1, 1-21. En: *Microbial inoculants in sustainable agricultural productivity*, Vol. 1: Research perspectives. (Eds.) Singh, D.; Singh, H.; Prabha, R. Ed. Springer. India.