Uso de microalgas y bacterias en agricultura intensiva

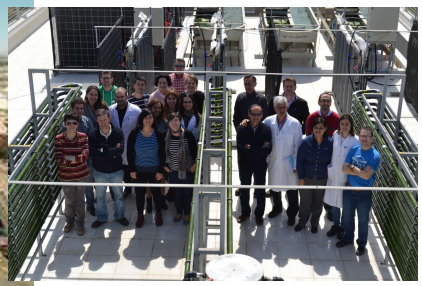
F. Gabriel Acién Fernández (facien@ual.es)
Dpto. Ingeniería Química, Universidad de Almería, España

Almería, Noviembre 2018

UNIV. ALMERIA-FUNDACIÓN CAJAMAR-IFAPA

www.ual.es

Dpto. Ingeniería Química de la Universidad de Almería lleva 25 años trabajando en el desarrollo de **procesos biotecnológicos**



FUNDACIÓN cajamar

www.fundacioncajamar.es

Estación Experimental Las Palmerillas de la Fundación Cajamar tiene 40 años de experiencia en **producción hortícola en invernaderos**

Instituto de Investigación y Formación Agraria y Pesquera
CONSEJERÍA DE AGRICULTURA Y PESCA

www.juntadeandalucia.es/agriculturaypesca/ifapa

Centro de Investigación La Cañada dedicado a la mejora de la sostenibilidad de **producción hortícola en invernaderos**

INDICE

APLICACIONES DE LAS MICROALGAS EN AGRICULTURA

- **Que son, para que sirven, como se producen…**
- **Producción de biofertilizantes con microalgas**
- **Proyecto SABANA**

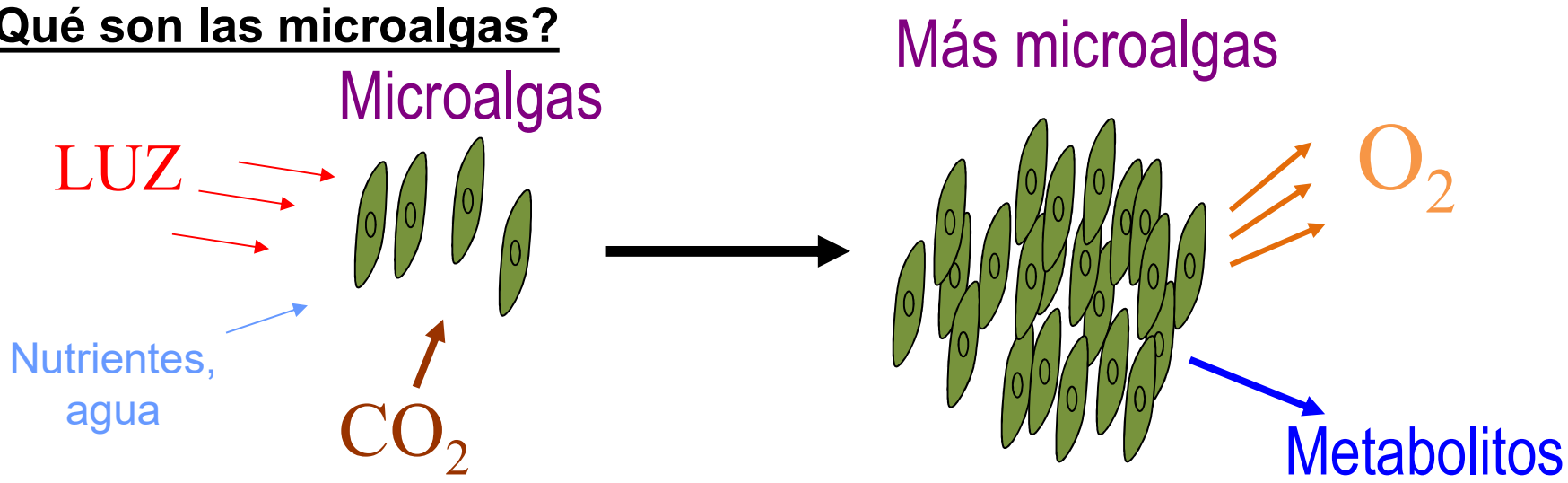
APLICACIONES DE LAS BACTERIAS EN AGRICULTURA

- **Que son, para que sirven, como se producen…**
- **Proyecto BACAGRO**

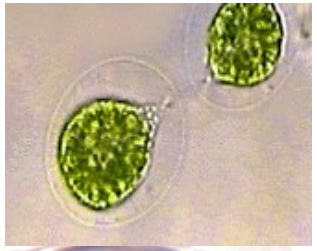
APLICACIONES DE LAS MICROALGAS EN AGRICULTURA

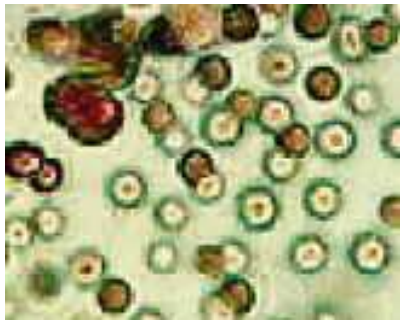
APLICACIONES DE LAS MICROALGAS EN AGRICULTURA

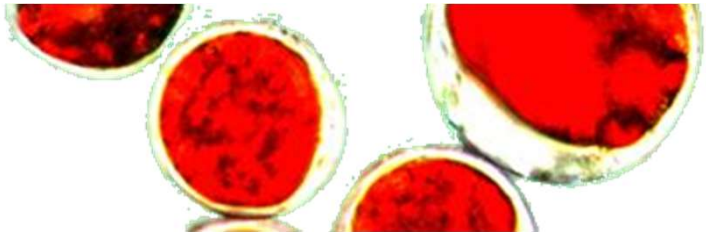
¿Qué son las microalgas?



- **Microorganismos (diferencia con las macroalgas)**
- **Gran velocidad de duplicación por ser microorganismos (1 día)**
- **Fotótrofos (aunque flexibles) : su fuente de energía es la luz**
- **Autótrofos: Su fuente de carbono es el CO_2**

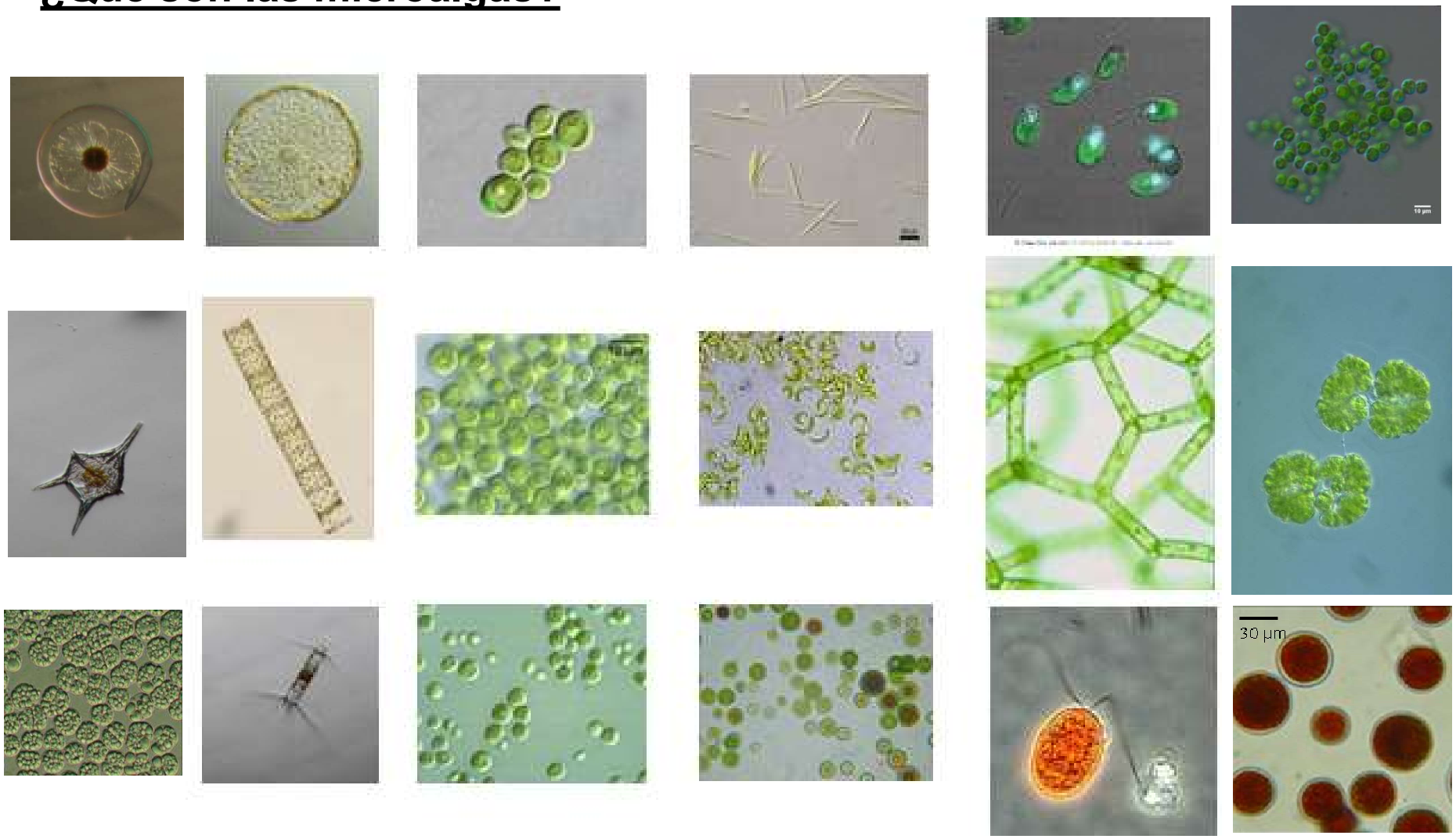






APLICACIONES DE LAS MICROALGAS EN AGRICULTURA

¿Qué son las microalgas?



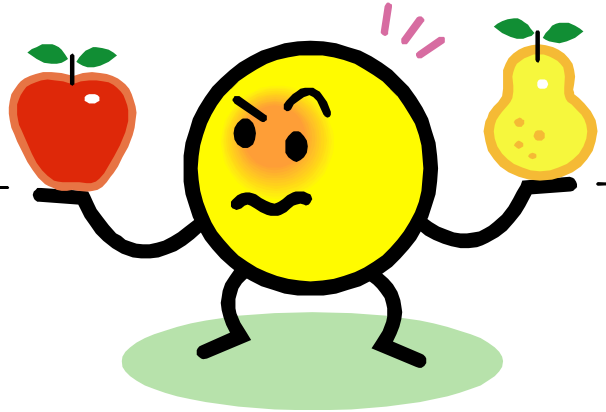
Existen mas de 30.000 especies catalogadas y cada año se descubren nuevas especies en todos los hábitats del planeta (mar, ríos, desiertos, glaciares, etc..)

APLICACIONES DE LAS MICROALGAS EN AGRICULTURA

¿Para qué siven las microalgas?

Pure chemicals:
- Carotenoids
- Fatty acids
- Phycobiliproteins
- Toxins

Biomass
- Functional foods
- Aquaculture
- Animal feeding



Biofuels/biofertilizers
- Biofertilizers
- Biodiesel
- Biogas
- Bioethanol

Bioremediation
- Flue gases
- Wastewater
- Soils

ONLY SOME OF THEM ARE PERFORMED AT REAL SCALE

STILL TECHNICAL AND ECONOMIC BOTTLENECKS EXIST

APLICACIONES DE LAS MICROALGAS EN AGRICULTURA

¿Cómo se producen?

Medio de cultivo

Fotobiorreactores

Centrifugación

Pasta de microalga

Unidad de control

Secado

Biomasa seca

APLICACIONES DE LAS MICROALGAS EN AGRICULTURA

Fotobioreactores?

Reactores abiertos

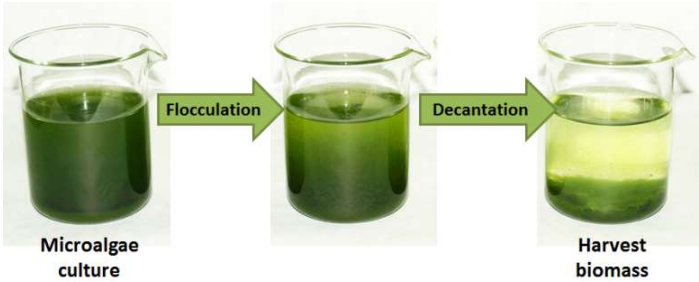
Reactores cerrados

APLICACIONES DE LAS MICROALGAS EN AGRICULTURA

Producción en reactores abiertos: biomasa de bajo coste

Reactores raceway

Concentración



Unidad de control

Pasta de microalga

PRODUCCIÓN DE BIOFERTILIZANTES

Producción de biofertilizantes

Proteínas

Carbohidratos
Lipidos
Cenizas

Aminoácidos
Péptidos
Otros (fitohormonas)

PRODUCCIÓN DE BIOFERTILIZANTES

Concentrados de aminoácidos en el mercado

Isabión está disponible en un amplio rango de envases: 1, 5, 10, 120 y 640 litros, adaptándose a las necesidades tanto de pequeños como de grandes agricultores.

Aminoácidos Mc Biofert (Env. 1 Litro)
9,24 €
Mc Biofertilizantes, S.L

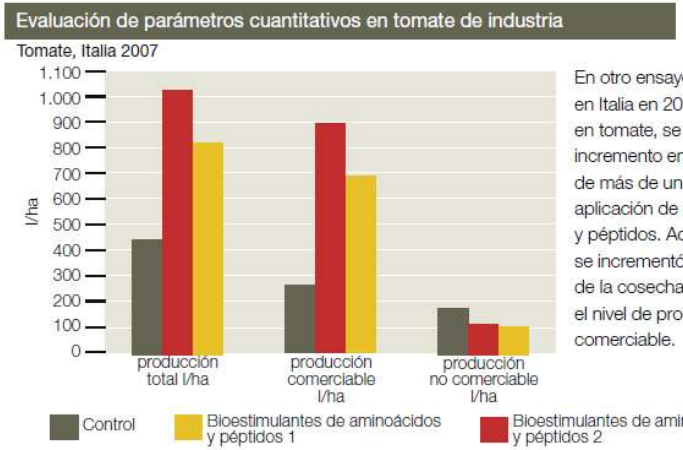
Aminoácidos Mc Biofert (Env. 20 Lt)
95,04 €
Mc Biofertilizantes, S.L

Aminoácidos Mc Biofert (Env. 5 Lt)
27,72 €
Mc Biofertilizantes, S.L

Aminoácidos Mc Biofert-B Basic (Env. 20 Lt)
89,76 €
Mc Biofertilizantes, S.L

PRODUCCIÓN DE BIOFERTILIZANTES

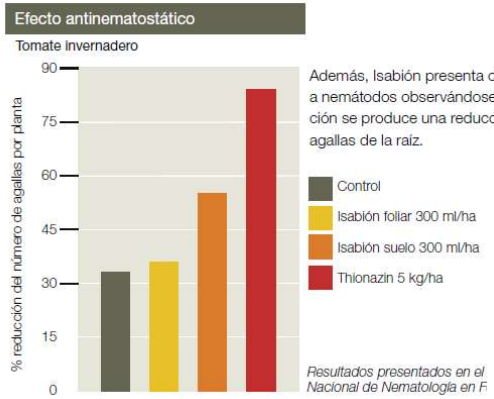
Ventajas de estos productos



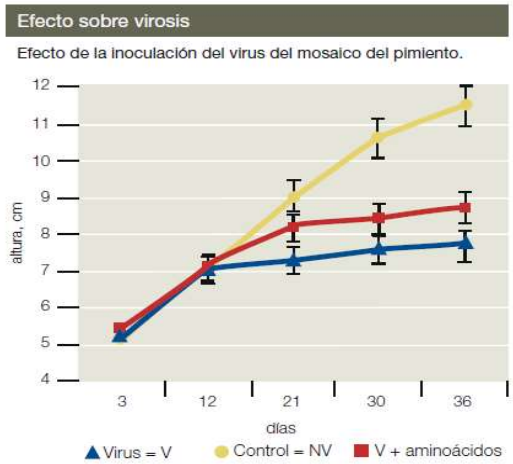
En otro ensayo realizado en Italia en 2007, tambien en tomate, se observó un incremento en la producción de más de un 50% tras la aplicación de aminoácidos y péptidos. Adicionalmente, se incrementó la calidad de la cosecha al reducirse el nivel de producción no comerciable.

- **Mayor rendimiento de cultivo: mayor peso por unidad**
- **Mayor calibre.**
- **Mayor vida postcosecha.**
- **Mayor vigor de hoja**
- **Mayor asimilación del calcio.**
- **Menos incidencia de enfermedades.**
- **Mayor resistencia frente a estrés climático**
- **Mejora de las condiciones del cultivo tras el uso de fungicidas.**

En este gráfico se aprecia, además de un incremento en la producción con respecto al control, un adelanto en la cosecha a consecuencia del tratamiento con Isabión.



Además, Isabión presenta cierta acción frente a nemátodos observándose que tras su aplicación se produce una reducción en el número de agallas de la raíz.



PRODUCCIÓN DE BIOFERTILIZANTES

Compuestos de actividad demostrada

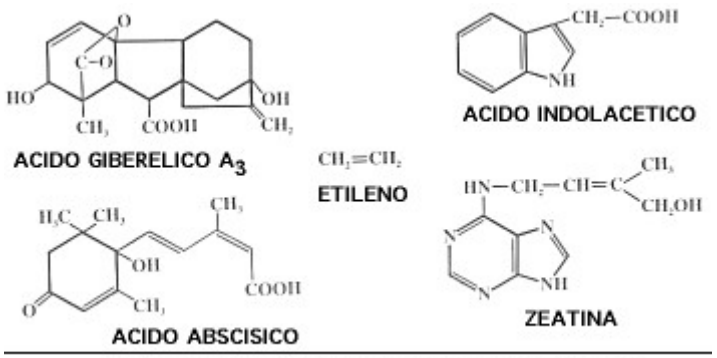
Aminoácidos

Aminoácido	Acción fisiológica y bioestimulante
Glicina	• Precursor de la clorofila. • Fuerte poder complejante de microelementos esenciales.
Prolina e Hidroxiprolina	• Regulan el equilibrio hídrico de la planta. • Mejoran la capacidad de resistencia ante situaciones de estrés por bajas temperaturas, falta de agua o exceso de sales. • Refuerzan las paredes celulares haciendo más resistentes los tejidos. • Mejoran la fertilidad del polen.
Glutámico	• Estimula los procesos de crecimiento de los meristemos radiculares, foliares y florales. • Es una reserva natural de Nitrógeno en la planta que puede transformarse en otros aminoácidos gracias a las transaminasas. • La Glutamato Deshidrogenasa es la enzima clave que hace asimilable por la planta el nitrógeno mineral aportado en el abonado.
Serina	• Regula el equilibrio hídrico de la planta. • Es esencial en la síntesis de la clorofila.
Arginina	• Es precursor de las poliaminas, necesarias para desencadenar la multiplicación celular. • Estimula el crecimiento de las raíces. • Interviene en la síntesis de la clorofila.
Fenilalanina Alanina	• Es precursor de la lignina, que confiere resistencia a los tallos. • Fundamental para la síntesis de la clorofila. • Importante en el metabolismo hormonal de las plantas. • Induce mecanismos de resistencia a virosis.

Peptidos

Aminoácido	Acción fisiológica y bioestimulante
De cadena corta	• Activación de enzimas como la Nitrato Reductasa, Glutamato Deshidrogenasa y Malato Deshidrogenasa, que permiten una mejor asimilación y utilización de macro y micronutrientes. • Activación de la síntesis de hormonas naturales de las plantas como auxinas, giberelinas y citoquininas, activadoras fundamentales del crecimiento vegetal. • Sirven de trasbordadores de otras sustancias con las que se mezclan como fungicidas e insecticidas, hormonas para el cuaje y micronutrientes (hierro, zinc, manganeso, calcio, etc), favoreciendo la penetración y asimilación por la planta. • También pueden complejar microelementos para una más fácil absorción por la planta.
De cadena larga	• En aplicaciones al suelo y foliares son una reserva regular de nutrientes y alargan el efecto de las aplicaciones de Isabión. • Efecto mojante en aplicaciones foliares. • En aplicación al suelo ayudan a activar la flora microbiana del suelo y mejoran la textura y estructura del mismo (incrementan la porosidad, aireación, capacidad de retención de agua, etc).

Fitohormonas



ESTRUCTURAS DE HORMONAS VEGETALES

PRODUCCIÓN DE BIOFERTILIZANTES

Composición poco definida

Contenido en aminoácidos/nitrógeno total

Materia orgánica	**62,50 % (p/p)**
Aminoácidos libres	*10,30 % (p/p)*
Aminoácidos ligados	*47,96 % (p/p)*
Aminoácidos totales	58,26 % (p/p)
Nitrógeno orgánico	*10,00 % (p/p)*
Nitrógeno amoniacal	*0,90 % (p/p)*
Nitrógeno total	10,90 % (p/p)
Carbono orgánico	29,40 %(p/p)
Cenizas	**4,00 % (p/p)**
Agua	**33,50 % (p/p)**
Total	**100,00 % (p/p)**

	Aminoácidos		
	Libres	Ligados	Totales
Glicina	3.80	8.65	12.45
Prolina	1.45	8.78	10.23
Alanina	1.87	5.16	7.03
Ac. Glutámico	0.27	6.33	6.60
Hidroxiprolina	0.85	5.35	6.20
Ac. Aspártico	0.35	2.71	3.06
Leucina	0.20	1.90	2.10
Lisina	0.35	1.68	2.03
Valina	0.09	1.67	1.76
Tirosina	0.33	1.14	1.47
Fenilalanina	0.16	1.18	1.34
Isoleucina	0.07	0.87	0.94
Arginina	0.12	0.80	0.92
Treonina	0.08	0.66	0.74
Metionina	0.08	0.57	0.65
Histidina	0.10	0.37	0.47
Serina	0.13	0.14	0.27
TOTAL	**10.30**	**47.96**	**58.26**

AMINOÁCIDOS AGRARES 7%

Composición:

Aminoácidos libres	7% p/p (8,4% p/v)
Péptidos	10% p/p (12% p/v)
Nitrógeno amínico	1,12% p/p (1,3% p/v)
Nitrógeno ureico	2,28% p/p (2.7% p/v)
Nitrógeno proteico	2,72% p/p (3.2% p/v)
Nitrógeno Total	5% p/p (6% p/v)
Fósforo (P_2O_5)	3,5% p/p (4.4% p/v)
Potasio (K_2O)	2,3% p/p (2.9% p/v)
Materia orgánica	35% p/p (44% p/v)
Carbono orgánico	11.60
Relación C/N	4.26
Densidad	1,2 gr/cc
pH	5.4

-Lisina	6, 9 %	-Alanina	0, 05 %
-Histidina	0, 6 %	-Cistina y cisteína	1, 0 %
-Arginina	0, 3 %	-Valina	0, 9 %
-Hidroxiprolina	7, 0 %	*-Metionina	10, 2 %
-Ácido Aspártico	4, 0 %	-Isoleucina	0, 01 %
-Treonina	0, 2 %	-Leucina	5, 0 %
-Serina	0, 01 %	-Tirosina	0, 4 %
*-Ácido glutámico	9, 13 %	-Fenilalanina	0, 2 %
*-Prolina	19, 0 %	-Triptófano	0, 1 %
*-Glicina	35, 0 %		

PRODUCCIÓN DE BIOFERTILIZANTES

Producción de biofertilizantes por hidrólisis enzimática

Bioresource Technology 112 (2012) 164–170

Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Bioresource Technology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/biortech

Development of a process for the production of L-amino-acids concentrates from microalgae by enzymatic hydrolysis

J.M. Romero García, F.G. Acién Fernández *, J.M. Fernández Sevilla

Department of Chemical Engineering, University of Almería, 04120 Almería, Spain

Table 1
Free-aminoacids composition of final product obtained.

Essential	Percentage (%)	Nonessential	Percentage (%)
Histidine	7.03	Glutamine	16.88
Lysine	5.47	Serine	16.25
Valine	4.69	Glycine	10.94
Isoleucine	4.53	Glutamic acid	7.19
Threonine	3.13	Proline	5.78
Phenylalanine	2.5	Arginine	5.63
Leucine	2.19	Tyrosine	3.44
Methionine	1.09	Alanine	1.88
Tryptophan	<0.16	Aspartic acid	1.41
		Asparagine	<0.16
		Hydroxyproline	<0.16

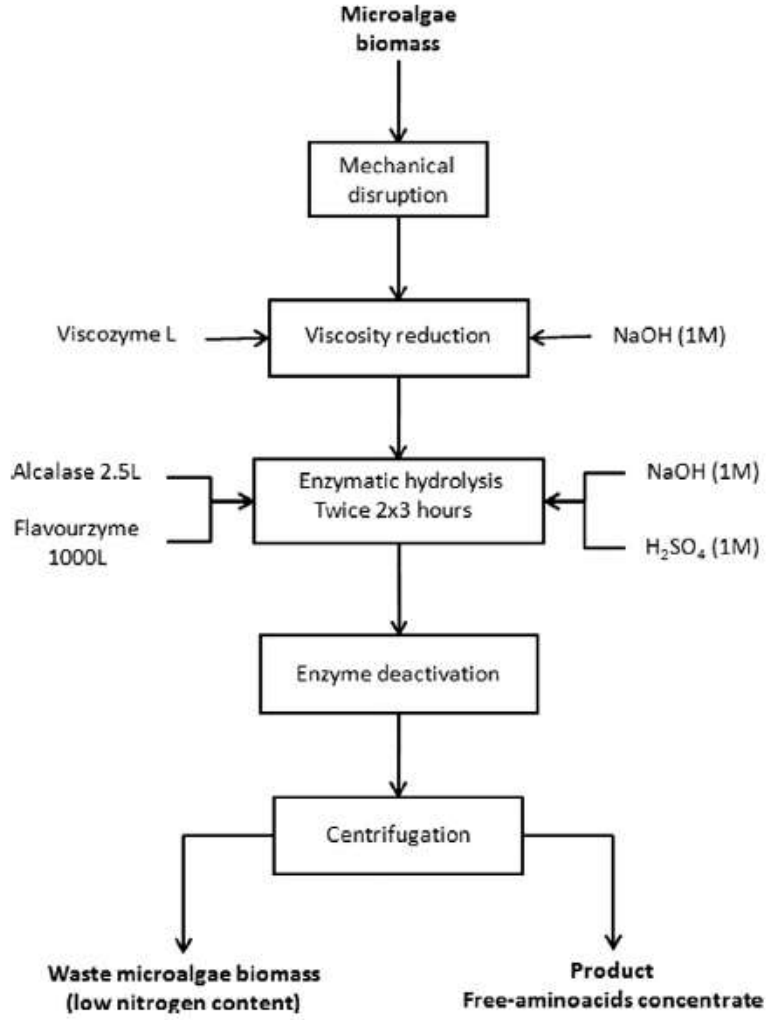


Fig. 6. Block-diagram of the proposed process for the production of free-amino-acids concentrates from *S. almeriensis* microalgae biomass.

Major factors:

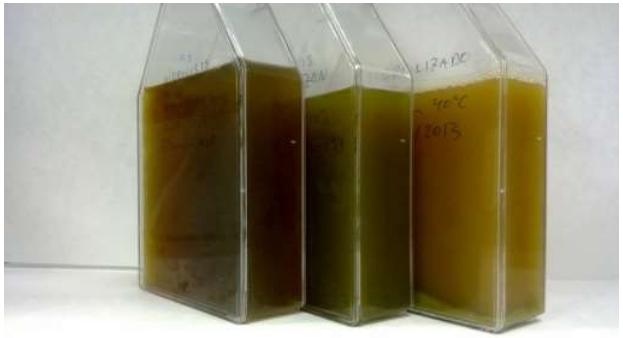
Biomass concentration

Proteins content of the biomass

Cell disruption

PRODUCCIÓN DE BIOFERTILIZANTES

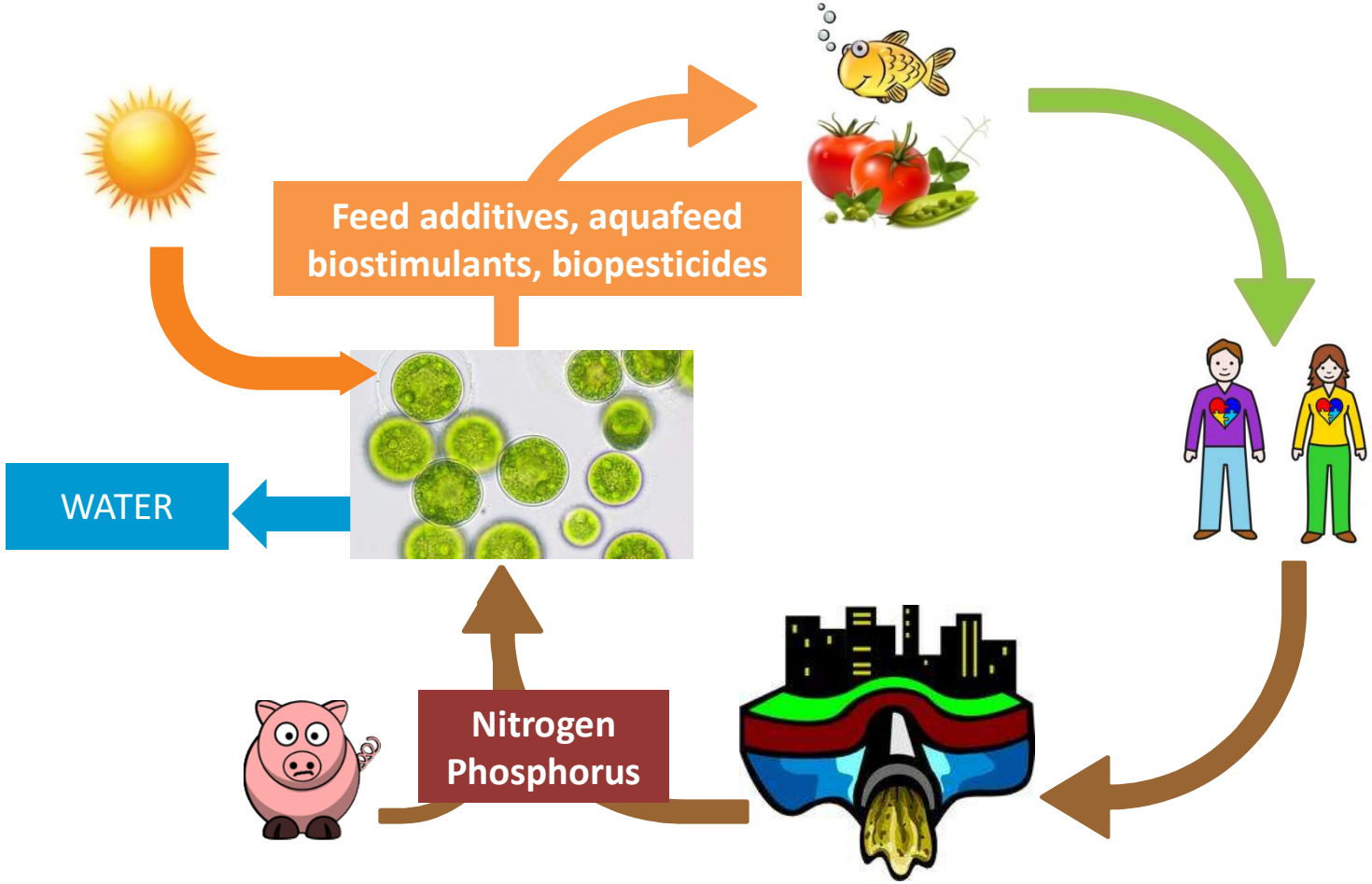
Escalado y aplicación comercial



Biorizon

PROYECTO SABANA

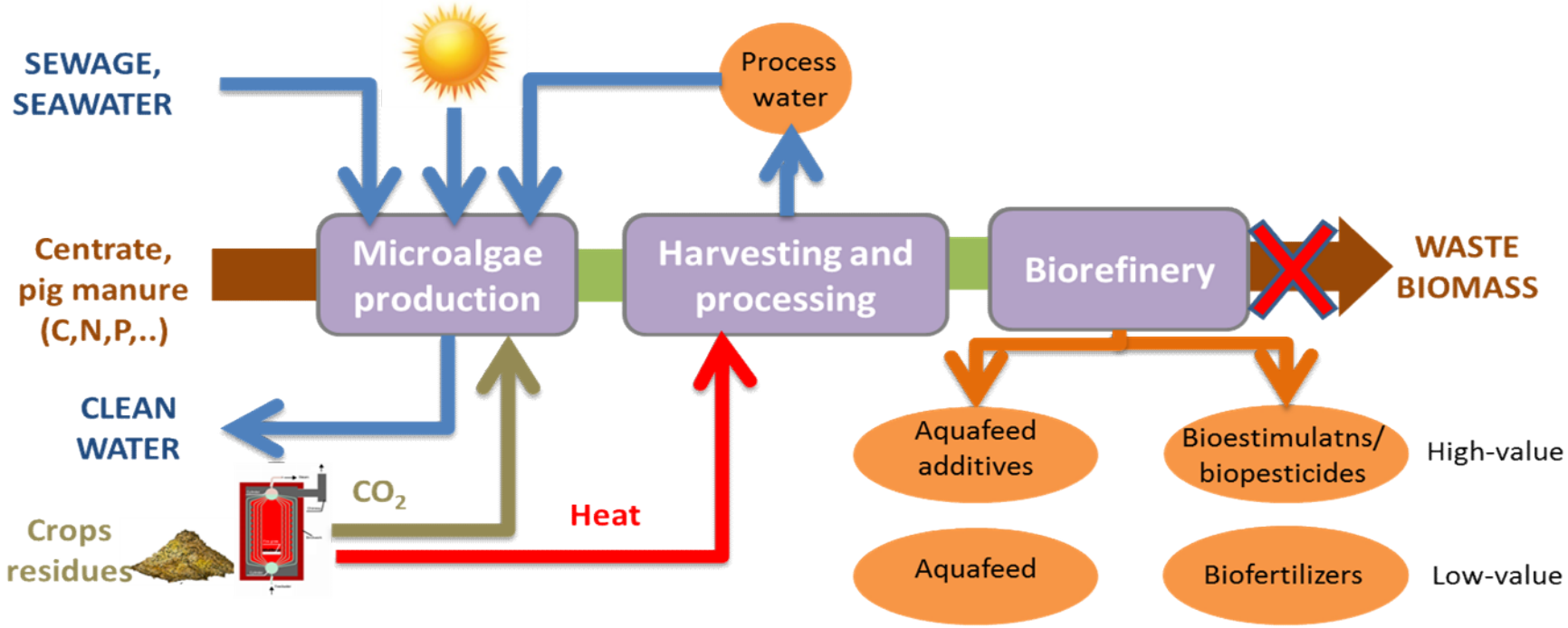
Objetivo



Save water, save energy, save CO_2 emissions, recover nutrients…, thus be sustainable

PROYECTO SABANA

Esquema del proceso



LARGE SCALE BIOMASS PRODUCTION

INTEGRAL UTILIZATION OF BIOMASS

DEMO1 SCALE=1 ha

DEMO2 SCALE=5 ha

DEMO3 SCALE=20 ha

PROYECTO SABANA

Planta Demostrativa

DEMO FACILITY (1 ha)

PROYECTO SABANA

Planta Demostrativa

DEMO FACILITY (1 ha)

Raceway reactors

Large scale reactors

Thin-layer cascade

Tubular reactors

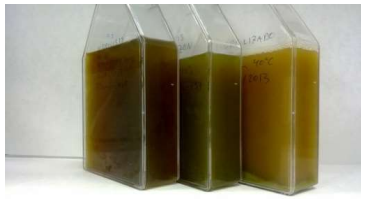
Auxiliary facilities

- Air, flue gas
- Culture medium
- Harvesting
- Spry-dryer
- Biomass processing

PROYECTO SABANA

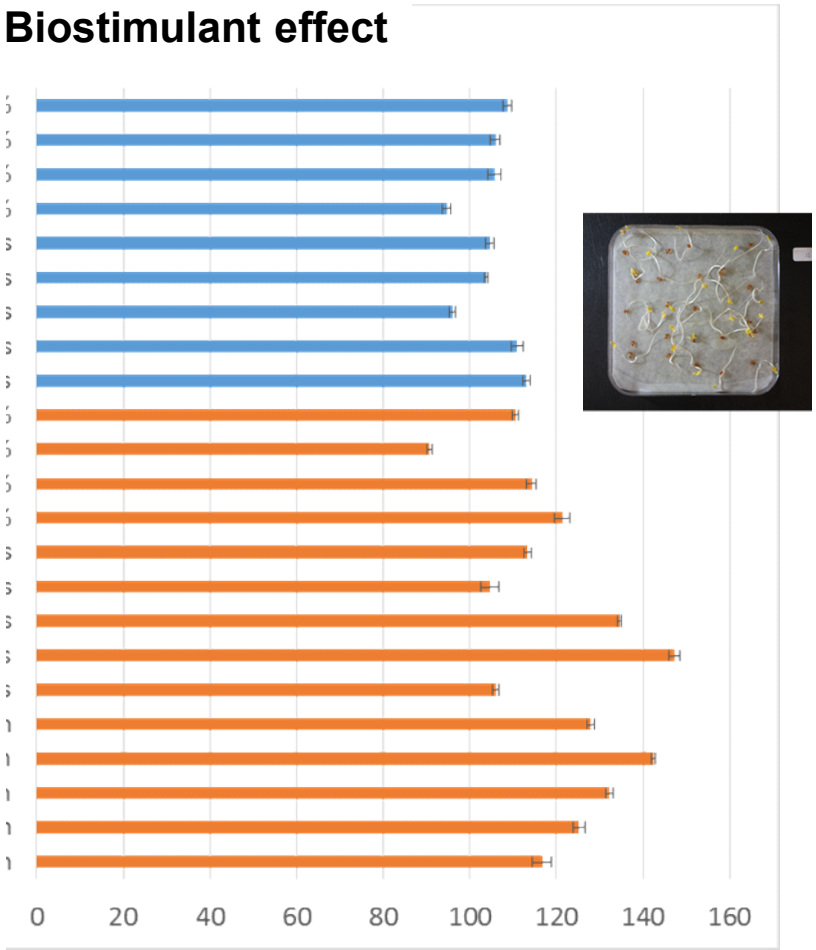
Planta Demostrativa

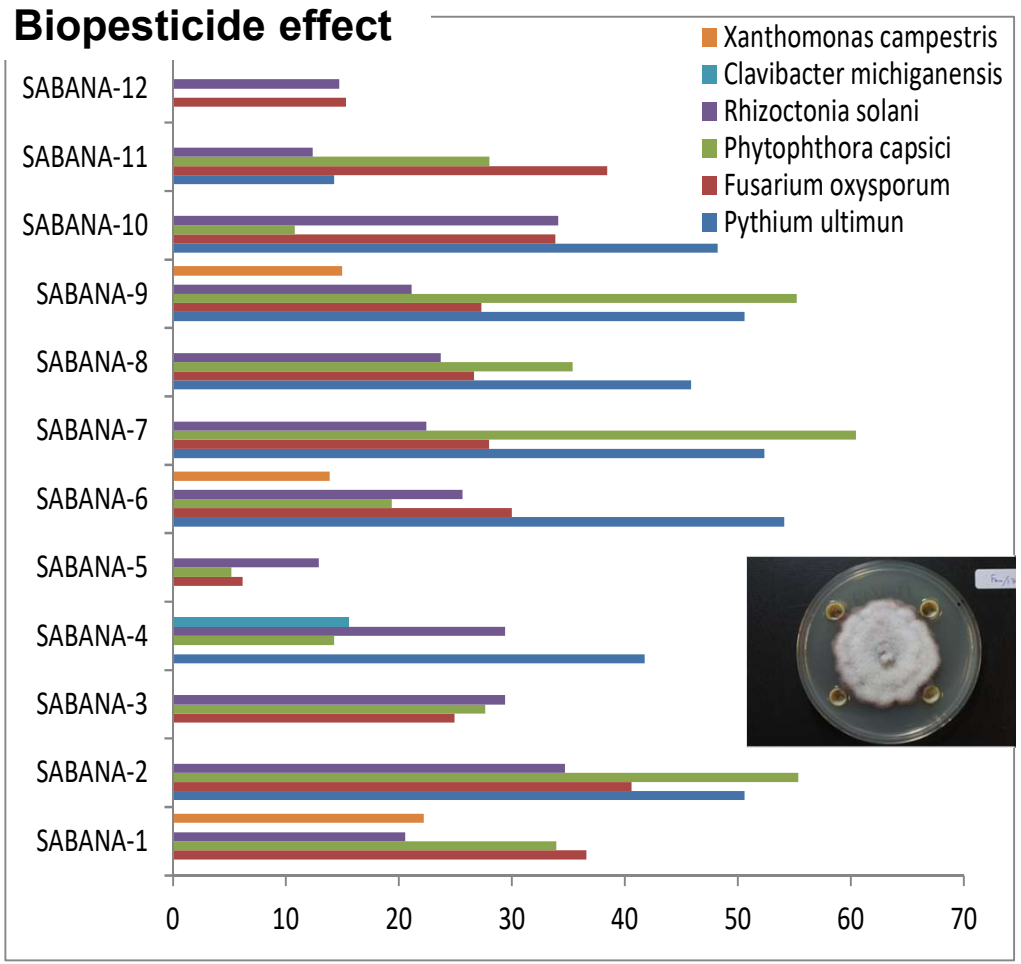
Processing pilot scale



PROYECTO SABANA

Selección de cepas





PROYECTO SABANA

Validación de productos

Evaluation of selected strains

Biostimulation *In vivo*: Application of algal extracts (Cucumber seeds)

T10 days
26 ºC

First treatment (25 mL / plant)

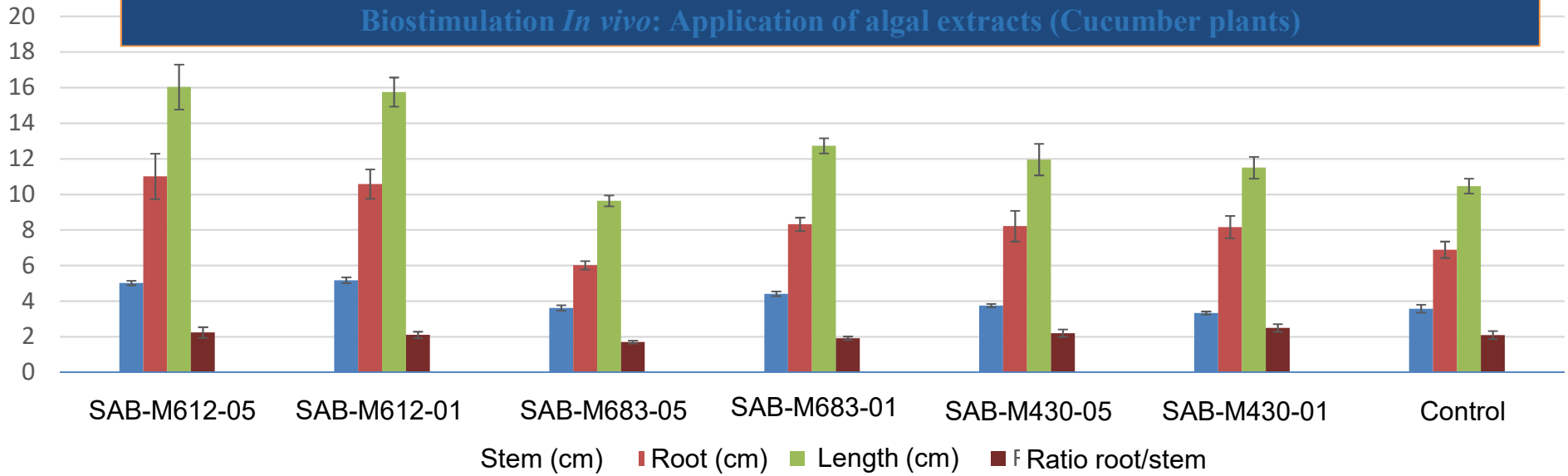
T20 days
26 ºC

Second treatment (25 mL/plant)

T40 days
26 ºC

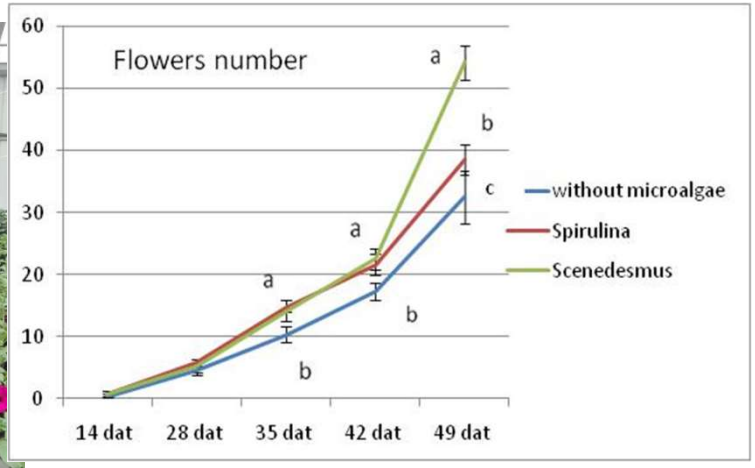
Stem length
Root length
Leaf number
Fresh-Weight
Dry-Weight

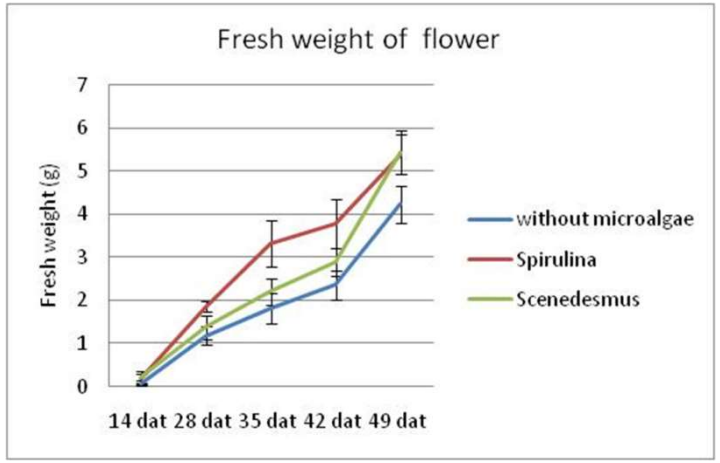
Biostimulation *In vivo*: Application of algal extracts (Cucumber plants)

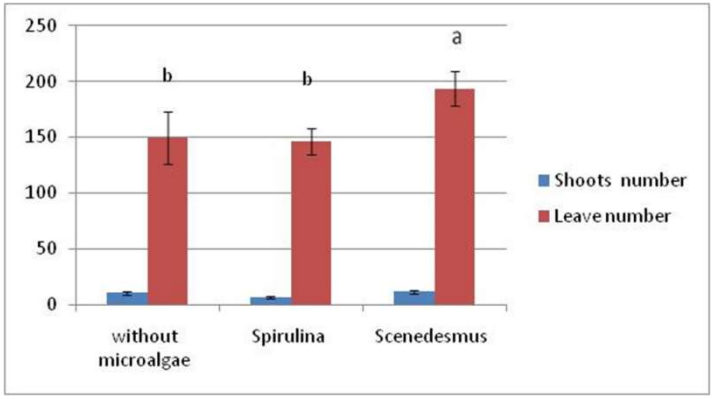


Validación de productos

Performance of selected strains using wastewaters





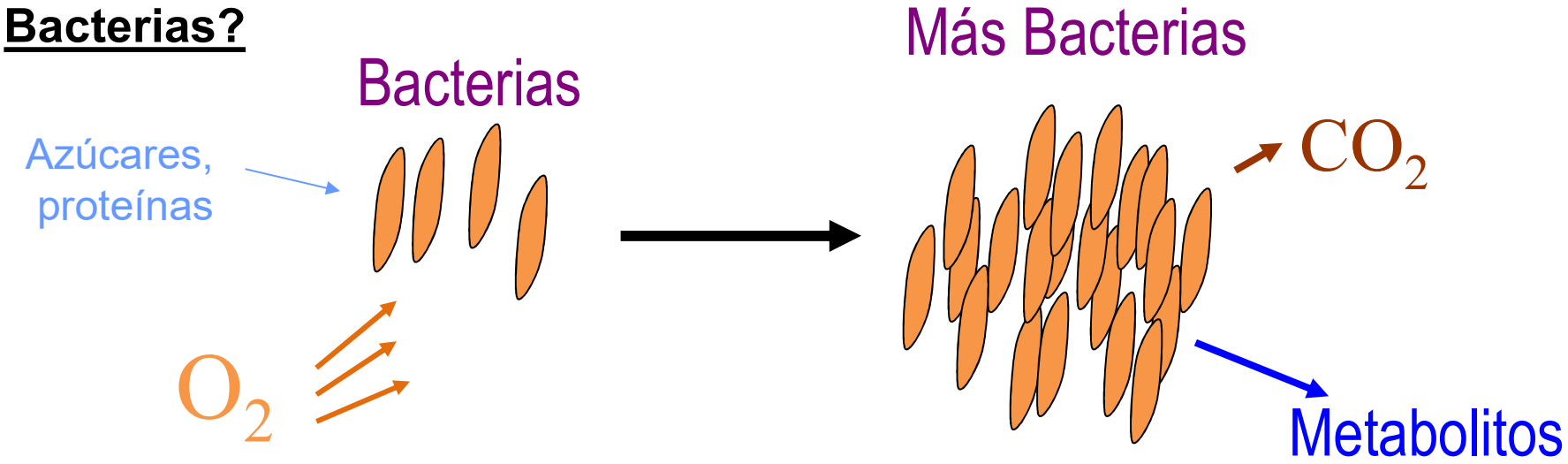


- Microalgae extracts produced enhances the performance of ornamental cultures.
- Extracts of Scenedesmus were more effective that produced using Spirulina without additional formulations

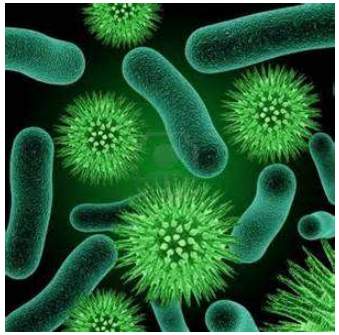
APLICACIONES DE LAS BACTERIAS EN AGRICULTURA

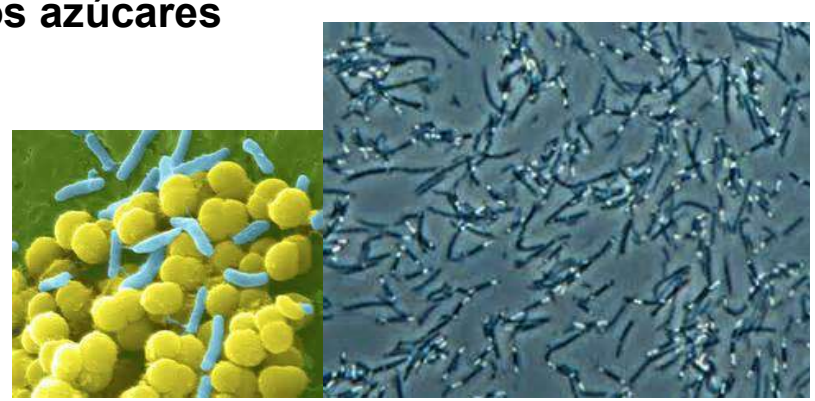
APLICACIONES DE LAS BACTERIAS EN AGRICULTURA

Bacterias?



- **Microorganismos procariotas (micras)**
- **Gran velocidad de duplicación por ser microorganismos (1 h)**
- **Quimiotrofos: su fuente de energía es la materia orgánica**
- **Heterótrofos: Su fuente de carbono son los azúcares**



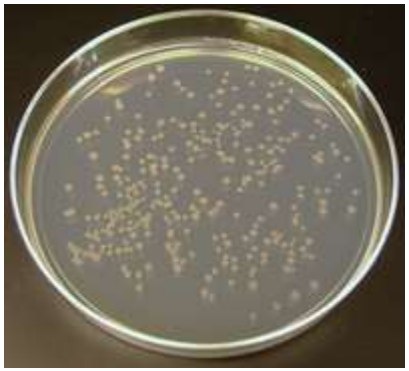


APLICACIONES DE LAS BACTERIAS EN AGRICULTURA

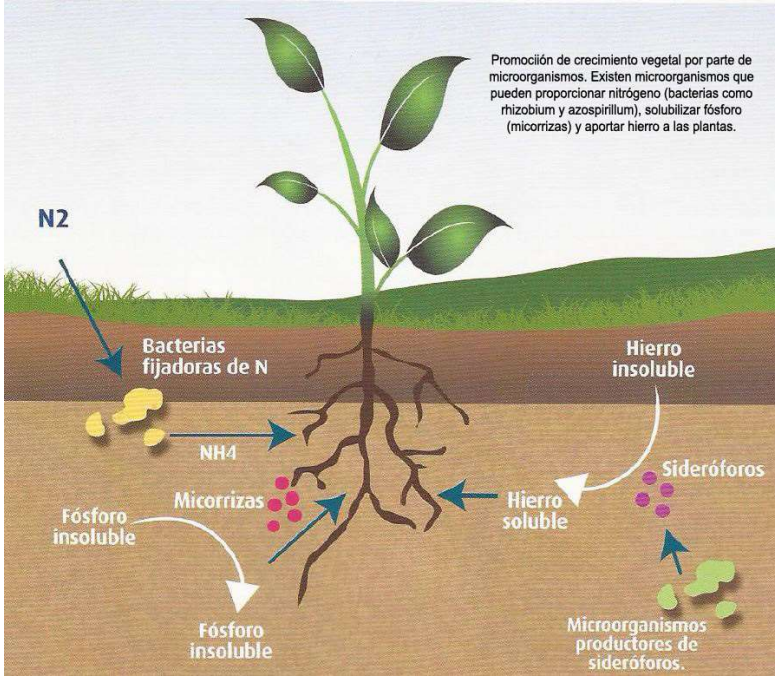
Acción de bacterias en plantas

Bacterias promotoras de crecimiento vegetal (BPCV) o "Plant Growth Promoting Rhizobacteria" (PGPR).

Bacterias que al aplicarlas al suelo colonizan las raíces de las plantas mejorando su crecimiento. Actualmente, son aplicadas como inoculantes microbianos para potenciar los fenómenos de control biológico, o bien favorecer los procesos de biofertilización y fitoestimulación, además de actuar contra fitopatógenos

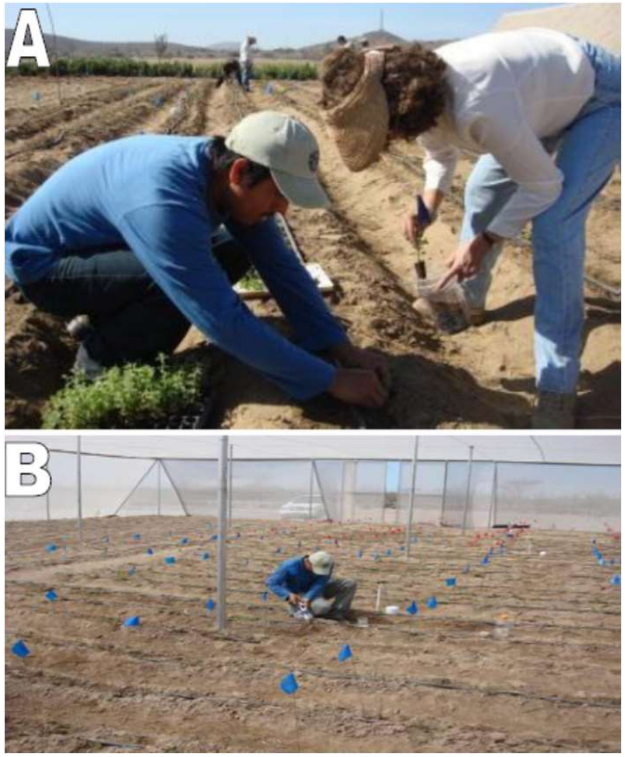


Azotobacter, Acetobacter, Azospirillum, Burkholderia, Pseudomonas y *Bacillus*



APLICACIONES DE LAS BACTERIAS EN AGRICULTURA

Experiencia previa en el uso de estos microorganismos



Pergamon

0038-0717(94)00124-3

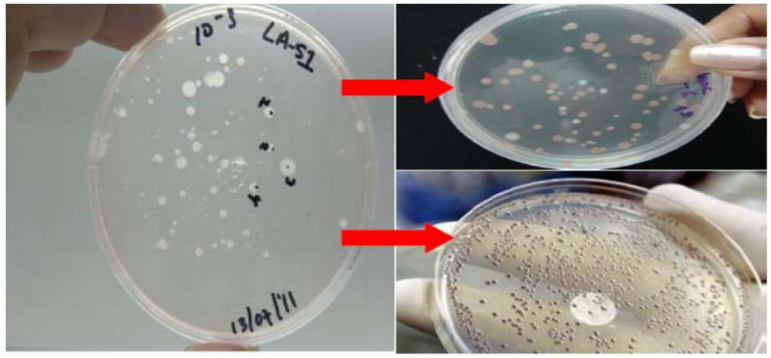
Soil Biol. Biochem. Vol. 26, No. 12, pp. 1591–1601, 1994
Copyright © 1994 Elsevier Science Ltd
Printed in Great Britain. All rights reserved
0038-0717/94 $26.00+0.00

REVIEW

AGRONOMIC APPLICATIONS OF *AZOSPIRILLUM*: AN EVALUATION OF 20 YEARS WORLDWIDE FIELD INOCULATION

YAACOV OKON[1]* and CARLOS A. LABANDERA-GONZALEZ[2]

[1]Department of Plant Pathology and Microbiology, Faculty of Agriculture, The Hebrew University of Jerusalem, Rehovot 76100, Israel and [2]Laboratorio de Microbiologia de Suelos y Control de Inoculantes, Direccion de Suelos y Aguas, Direccion General de Recursos Naturales Renovables, Ministerio de Ganaderia, Agricultura y Pesca, Burgues 3208, Montevideo, Uruguay



APLICACIONES DE LAS BACTERIAS EN AGRICULTURA

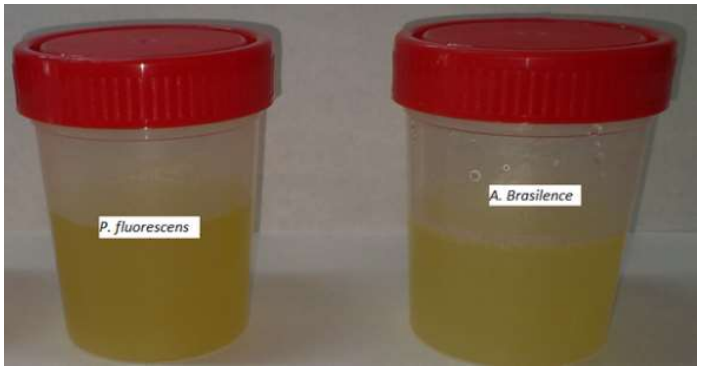
Ventajas del empleo de bacterias de uso agrícola

- Bacterias PGPB que afectan estrictamente al crecimiento vegetal:
  - Secreción de hormonas vegetales
  - Incrementa el enraizamiento
  - Mejora la solubilización de fosfatos y absorción de hierro por las plantas

- Bacterias "biocontrol-PGBV" que controlan determinados fitopatógenos:
  - Protección frente Fusarium, Rhizoctonia, Phytium, Gaeumannomyces.

Resultados previos

- Un año de trabajos sobre producción:
  - Manejo de cepas de colección
  - Medio de cultivo de bajo coste
  - Producción a escala piloto



- Un año de ensayos de campo (3 invernaderos):
  - Evaluación de mejora de enraizamiento y tamaño de frutos
  - Evaluación de acción contra fitopatógenos

PROYECTO BACAGRO:

Producción de bacterias para uso agrícola como mejoradores de la fertilidad del suelo y agentes protectores frente a fitopatógenos

MINISTERIO
DE ECONOMÍA
Y COMPETITIVIDAD

UNION EUROPEA
FONDO EUROPEO DE
DESARROLLO REGIONAL
"Una manera de hacer Europa"

SECRETARÍA DE ESTADO DE INVESTIGACIÓN, DESARROLLO E INNOVACIÓN
SECRETARÍA GENERAL DE CIENCIA, TECNOLOGÍA E INNOVACIÓN
DIRECCIÓN GENERAL DE INNOVACIÓN Y COMPETITIVIDAD
SUBDIRECCIÓN GENERAL DE COLABORACIÓN PÚBLICO-PRIVADA

Referencia Expediente: RTC-2015-3897-2
Solicitante: BIORIZON BIOTECH S.L.
NIF:B04707139

RTC-2015-3897-2

Bacagro

Participantes:

Biorizon biotech

IN LUMINE SAPIENTIA · UNIVERSITAS ALMERIENSIS

cajamar CAJA RURAL

OBJETIVOS DEL PROYECTO BACAGRO

El objetivo del proyecto es el desarrollo de nuevos productos bioestimulantes de uso agrícola para la mejora de la rentabilidad y sostenibilidad de la agricultura intensiva bajo plástico.

Cuatro objetivos tecnológicos necesarios:

- Selección e identificación de bacterias beneficiosas para suelos y plantas
- Desarrollo de procesos productivos escalables que sean competitivos con su aplicación agrícola
- Desarrollo de métodos de preservación y aplicación de las bacterias de forma que se garantice su seguridad y eficacia
- Evaluación del efecto en suelos y plantas tras la aplicación del producto

SELECCIÓN E IDENTIFICACIÓN DE BACTERIAS

Bacterias promotoras de crecimiento

Capacidad de las cepas para producir sustancias de interés agronómico y promover el crecimiento vegetal

Evaluación de efectos beneficiosos-antagónicos en ensayos *in vitro*

Cepas de colección (BC1, BC2, BC3), así como aisladas de compost, suelos y sustratos de cultivo hortícolas

Código cepas	Sideróforos	Salicílico	Cianuro	SP	Quitinasa	IG %
CRV-1-01						116
CRV-2-01						117
CRV-3-04					+	104
SFCpim-1-05						86
SFCpim-2-03						129
SFCpim-2-07						183
SFCtom-1-03						91
SFCtom-2-01						127
SFCtom-2-03			+			89
SOL-2-01		+				115
SOL-3-01		+	+			111
SOL-3-04				+		69
Supim-1-07				+		161
Supim-2-06	+		+	+		83
Supim-3-05		+	+			89
Encal-1-02*						
Encal-3-01						94
Encal-3-03	+					110
BC1	+		+			70
BC2	+	+	+	+		84
BC3			+			109

SELECCIÓN E IDENTIFICACIÓN DE BACTERIAS

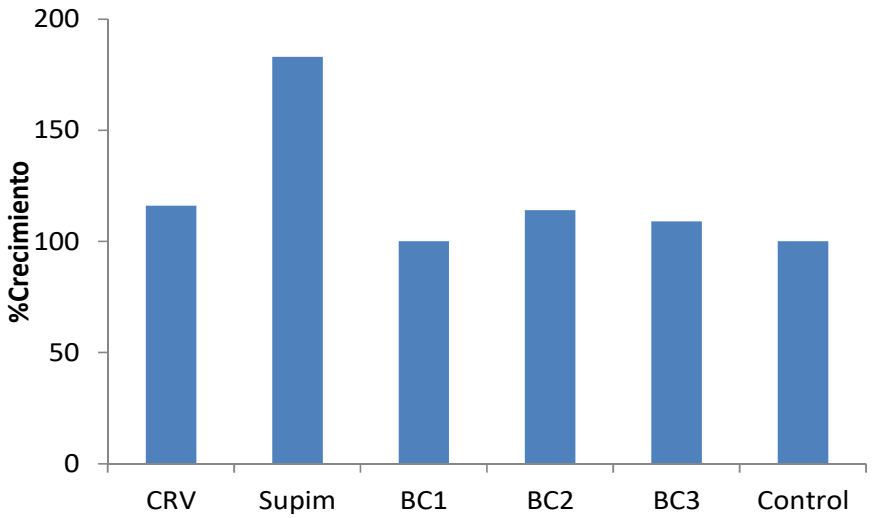
Bacterias inhibidoras de patógenos

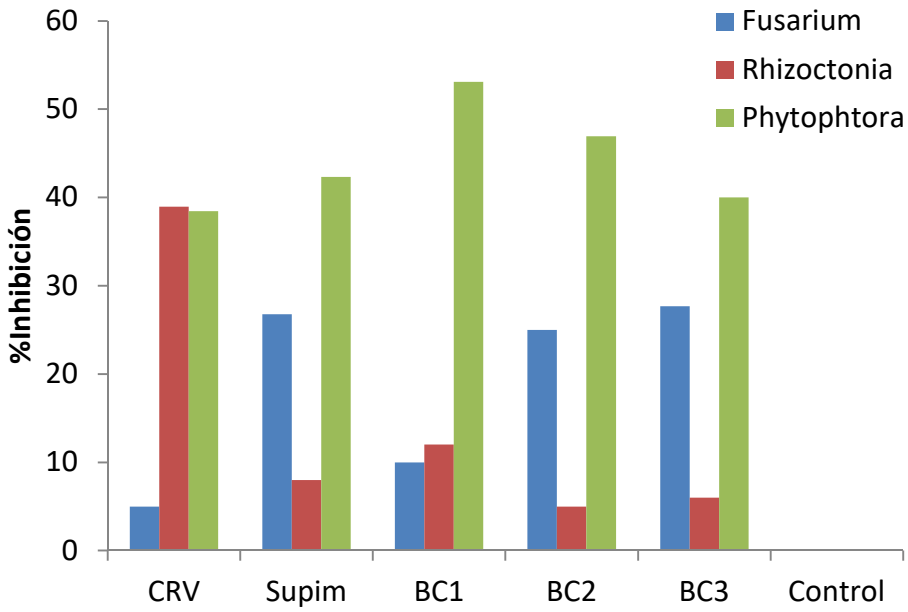
AISLADO	% I vs XC	% I vs PCC	% I vs PST	% I vs CMM	% I vs FOM	% I vs RS	% I vs PCAP
CRV-1-01	0,00	0,00	0,00	7,69	0,00	38,96	38,46
CRV-2-01	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	43,08
SFCpim-1-05	0,00	0,00	0,00	0,00	25,00	0,00	0,00
SFCpim-2-03	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	36,15
SFCpim-2-07	7,69	0,00	0,00	0,00	31,25	42,86	53,85
SFCtom-1-03	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	37,69
SFCtom-2-01	0,00	0,00	0,00	0,00	32,14	0,00	50,77
SFCtom-2-03	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	55,38
SOL-2-01	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	69,23
SOL-3-04	0,00	0,00	0,00	0,00	27,68	0,00	37,69
Supim-2-06	20,51	0,00	0,00	0,00	26,79	0,00	42,31
ENcal-3-01	5,13	0,00	0,00	7,05	0,00	0,00	0,00
ENcal-3-03	41,03	0,00	0,00	21,79	0,00	0,00	0,00
BC1	15,38	0,00	11,54	17,95	0,00	0,00	53,08
BC2	0,00	0,00	0,00	12,82	25,00	0,00	46,92
BC3	0,00	0,00	0,00	0,00	27,68	0,00	40,00

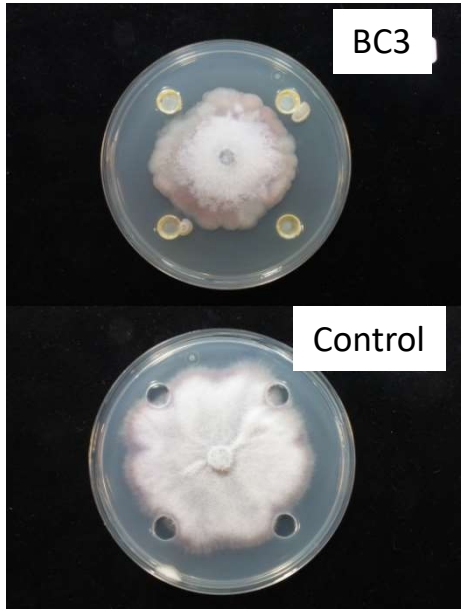
XC, Xanthomonas campestris; PCC, Pectobacterium carotovorum subsp. Carotovorum; PST, Pseudomonas syringae pv. Syringae; CMM, Clavibacter michiganensis subsp. Michiganensis; FOM, Fusarium oxysporum f.sp. melonis; RS, Rhizoctonia solani; PCAP, Phytophthora capsici

SELECCIÓN E IDENTIFICACIÓN DE BACTERIAS

Bacterias inhibidoras de patógenos







Seleccionadas cinco bacterias que han mostrado elevados valores de mejora tanto de crecimiento como de inhibición de patógenos

Estas cinco bacterias han sido secuenciadas para su identificación y clasificación, y han pasado a ensayos de producción a mayor escala.

DESARROLLO DE PROCESOS PRODUCTIVOS ESCALABLES

Desarrollo del bioreactors

Ajuste de la capacidad de transferencia de materia a los requerimientos del microorganismo

	BC1	BC2	BC3
OUR, mgO2/L·h	108.45	60.13	27.08
K_La, h^{-1}	15.49	8.59	3.87
K_La, s^{-1}	0.00430	0.00239	0.00107
V_S,m/s	0.00327	0.00159	0.00060
Q, m3/s	0.0002	0.0001	0.000043
Q, L/min	13.92	6.78	2.56

Diseño de reactor para producción a mayor escala:

- Columnas de burbujeo de bajo coste esterilizables por ozono
- Optimización de la capacidad de transferencia de materia
- Optimización del control y operación del sistema

EVALUACIÓN DEL EFECTO EN SUELOS Y PLANTAS

Ensayos con cultivos de bacterias

Ensayos en cámara de cultivo (30 días)

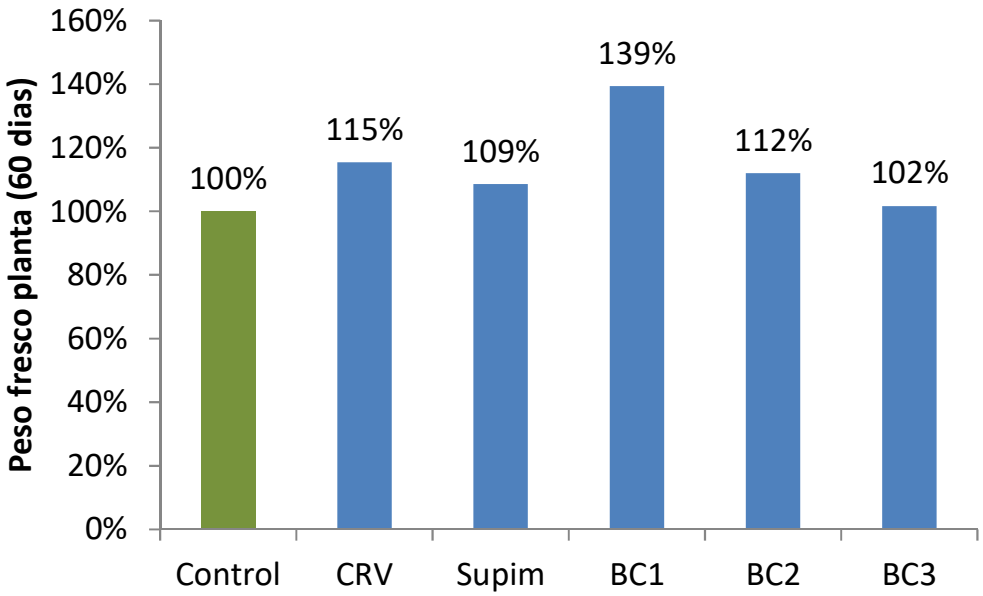
Ensayos en vivero (60 días)

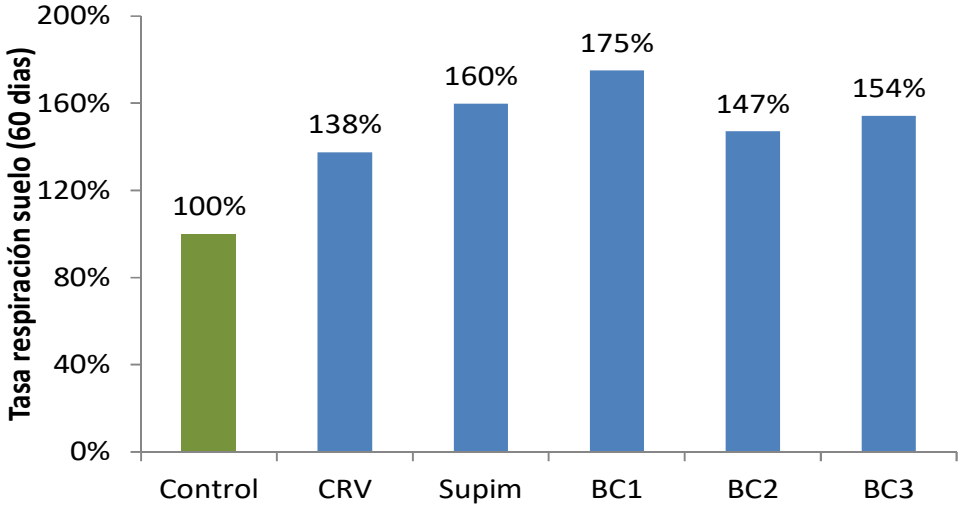
Medidas semanales:
- Longitud planta
- Anchura y longitud de hoja
- Medidas de respiración en suelo

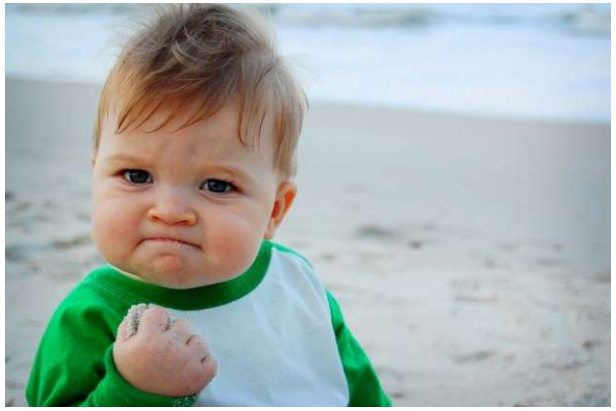
Medidas al final del ciclo:
-Área foliar (relación anchura-área)
-Peso fresco y seco de cada planta
-Peso seco de raíces.

EVALUACIÓN DEL EFECTO EN SUELOS Y PLANTAS

Ensayos con cultivos de bacterias







Todas las bacterias seleccionadas han mostrado un efecto positivo en el crecimiento, como en los ensayos de laboratorio, aunque el efecto es diferente en función de la bacteria utilizada.

La medida de actividad respiratoria del suelo confirma que la implantación de las bacterias ha tenido lugar y que éstas son las responsables del incremento de crecimiento.

EVALUACIÓN DEL EFECTO EN SUELOS Y PLANTAS

Ensayos con cultivos de bacterias

Ensayos realizados en invernaderos han mostrado una mejora radicular y de engrosamiento de fruto, se han ensayado diversos cultivos todos con resultados muy positivos.
El producto esta en fase de registro para su comercialización.

Uso de microalgas y bacterias en agricultura intensiva

F. Gabriel Acién Fernández (facien@ual.es)
Dpto. Ingeniería Química, Universidad de Almería, España

Almería, Noviembre 2018