

Universidad de Almería  
Facultad de Ciencias Experimentales

**Extractos acuosos de compost  
aplicados mediante la técnica de  
*biopriming* como herramienta  
agrobiotecnológica de interés**



**Autora:**  
**Marina Angulo Rodríguez**

**Tutora:** Macarena del Mar Jurado Rodríguez

**Cotutora:** María Rosa Martínez Gallardo

**Departamento:** Biología y Geología

**Área de Microbiología**

**Grado en Biotecnología**



## Agradecimientos

“Curiosidad, jóvenes. Tenéis que ser curiosos, interesaos por aprender, maravillaos con lo que os queda por descubrir, pero, sobre todo sed curiosos”. Estas fueron las palabras que nos dijo Joaquín Moreno, antiguo jefe del Área de Microbiología, el primer día de clase. A él tengo que agradecer el interés que despertó en mí por la Microbiología y la motivación por la que he llegado a donde estoy hoy en día.

Por el camino me encontré con Macarena Jurado, mi tutora de TFG que, desde el primer día en prácticas de Microbiología hasta el momento, ha sabido transmitirme sus amplios conocimientos con mucha alegría y cariño, siempre muy atenta a mí y dispuesta a prestar su ayuda con una sonrisa, siendo para mí, un ejemplo a seguir.

Además, me gustaría agradecer al resto del área de Microbiología, donde he tenido el placer de conocer a personas maravillosas que han compartido conmigo su labro investigadora, y cabe mencionar a María Rosa y Ana Toribio, que han estado dispuestas a ayudarme en todo momento y resolver mis dudas. Además, quiero dar las gracias a María José López y a Paqui, por haber hecho posible este proyecto y fraguado sus cimientos.

Durante los cuatro años de mi etapa como estudiante de Biotecnología, he conocido a personas maravillosas que han sabido levantarme el ánimo en los momentos más difíciles, y hacer de los buenos momentos, momentos extraordinarios. En especial, a Salva, por haber estado ahí en todo momento, a Rafa, quien le ha dado un toque cómico a mi carrera, y a Alba y María. Sois personas muy especiales para mí y deseo mantener el contacto toda la vida y encontrarnos tras terminar, en nuestra carrera profesional y fuera de ella. Gracias a todos vosotros por haberme mostrado vuestro apoyo ante cualquier desafío que se ha presentado y formar parte de esto. Nunca olvidaré el proyecto de cervecería artesanal que me queda pendiente por hacer con algunos de vosotros.

También tienen un hueco en mi corazón aquellas personas que he conocido antes de mi etapa universitaria, y un poquito más tarde en ella. Quiero agradecerle a Crescen, por haber estado ahí desde el primer momento que nos conocimos y habernos visto crecer mutuamente, casi como hermanas; a mis amigos “los matemáticos”, por haber compartido conmigo momentos geniales y hacer todo tipo de planes que me levantan el ánimo; y a Eder, quien ha sabido valorarme y creer en mí incluso cuando a mí misma me costaba, y hacer de mi vida un lugar aún más bonito.

Por último, a mi familia. Por haberme visto crecer y apoyarme en el camino hasta llegar a donde estoy, poniendo de su parte en todo lo que han podido, y en lo que queda.

Gracias a todos.

# Índice

Resumen .....	1
Abstract .....	2
<b>1. Introducción</b> .....	<b>3</b>
1.1. Problemática de la generación masiva de residuos.....	3
1.2. Valorización de residuos mediante compostaje .....	4
1.2.1. Digestión anaerobia .....	5
1.2.2. Compostaje .....	6
1.3. Extractos de compost como alternativa a los fertilizantes de síntesis.....	9
1.3.1. Uso de extractos de compost en biofertilización.....	10
1.3.2. Uso de extractos de compost como agentes bioprotectores .....	11
1.4. Nuevas formas de aplicación de los extractos de compost: <i>biopriming</i> .....	12
1.4.1 Antecedentes de experimentación en <i>biopriming</i> con extractos de compost .....	14
<b>3. Materiales y Métodos</b> .....	<b>17</b>
3.1. Diseño experimental .....	17
3.2. Obtención de extractos acuosos de compost.....	18
3.3. Ensayos <i>in vitro</i> .....	18
3.3.1. Índice de germinación de los extractos de compost mediante <i>biopriming</i> .....	18
3.3.2. Enfrentamiento dual de los extractos de compost frente a <i>Rhizoctonia solani</i> .....	20
3.4. Ensayos <i>in vivo</i> .....	21
3.4.1. Efecto fitoestimulante de los extractos de compost mediante <i>biopriming</i> .....	21
3.4.2. Efecto fitoprotector de los extractos de compost mediante <i>biopriming</i> .....	22
3.5. Análisis de datos y estadístico. ....	24
<b>4. Resultados y discusión</b> .....	<b>25</b>
4.1. Evaluación <i>in vitro</i> del efecto fitoestimulante de los extractos de compost mediante la técnica de <i>biopriming</i> . ....	25
4.2. Evaluación <i>in vitro</i> del enfrentamiento dual de los extractos procedentes de compost frente a <i>Rhizoctonia solani</i> . ....	27
4.3. Evaluación <i>in vivo</i> del efecto fitoestimulante de los extractos acuosos de compost mediante la técnica de <i>biopriming</i> .....	28
4.4. Evaluación <i>in vivo</i> del efecto biopesticida de los extractos acuosos de compost mediante <i>biopriming</i> .....	31
<b>5. Conclusiones</b> .....	<b>36</b>

6.	Bibliografia.....	38
----	-------------------	----

## Resumen

Debido al incremento en la acumulación de residuos de origen antropogénico, entre los que destacan los residuos sólidos urbanos y los procedentes de la agricultura, se plantea un reto para la sociedad actual referido a la gestión eficiente de dichos residuos para su adaptación a sistemas de bioeconomía circular y sostenible. Entre las herramientas desarrolladas para disminuir el impacto de estos residuos destaca el compostaje, cuyo producto, el compost, tiene potencial para diversificar aún más su aplicabilidad. De esta forma, se planteó la elaboración de extractos acuosos a partir de compost de residuos agroalimentarios para su aplicación como herramienta agro-biotecnológica. El objetivo de este trabajo fue evaluar, *in vitro* e *in vivo*, el potencial de estos derivados de compost como agentes biofertilizantes y biopesticidas, aplicados mediante la técnica de *biopriming*.

Para ello, se obtuvieron extractos acuosos a partir de dos tipos de compost de residuos de la industria agroalimentaria (RAA1 y RAA3) mediante la aplicación de cuatro protocolos de extracción diferentes (CEP1, CEP2, CEP3 y CEP4). Los ocho tipos de extractos resultantes fueron utilizados como tratamientos preventivos en semillas de pepino, empleando para ello la técnica de *biopriming*, que consiste en la imbibición de las semillas en una matriz biológica compuesta, en este caso, por los diferentes extractos acuosos de compost y una matriz de alginato. En primer lugar, las semillas embebidas se sometieron a un ensayo de germinación *in vitro*, para evaluar la capacidad promotora del crecimiento vegetal, así como a un enfrentamiento dual en placa Petri de los extractos frente al hongo fitopatógeno *Rhizoctonia solani*. Posteriormente, se llevaron a cabo dos ensayos *in planta* para comprobar el efecto fitoestimulante y biopesticida de los extractos.

Los resultados obtenidos a partir de los ensayos *in vitro*, pusieron de manifiesto que la mayoría de los extractos presentaron carácter fitoestimulante, destacando los obtenidos a partir del compost RAA1. Además, dichos extractos mostraron un mayor efecto antagonista tras su enfrentamiento en placa frente al hongo fitopatógeno. Por otra parte, los ensayos *in vivo* reflejaron que los extractos de compost aplicados mediante la técnica de *biopriming* poseen un efecto positivo como promotores del crecimiento vegetal, así como biopesticida, destacando los protocolos CEP1 y CEP2, respectivamente.

A partir de estos resultados, se puede concluir que los extractos acuosos de compost poseen capacidades fitoestimulantes y biopesticidas, pero que dependen de la naturaleza de dicho compost, así como del protocolo de extracción aplicado. El empleo de extractos acuosos de compost, mediante la técnica de *biopriming*, amplía la versatilidad de aplicaciones de este producto.

**Palabras clave:** Compostaje, *biopriming*, extracto de compost, *Rhizoctonia solani*.

## Abstract

Due to the increase in the accumulation of waste of anthropogenic origin, among which urban solid waste and waste from agriculture stand out, a challenge for today's society is posed by the efficient management of this waste in order to adapt it to circular and sustainable bioeconomy systems. One of the tools developed to reduce the impact of this waste is composting, whose product, compost, has the potential to further diversify its applicability. Thus, the elaboration of aqueous extracts from agri-food waste compost was proposed for its application as an agrobiotechnological tool. The aim of this work was to evaluate, *in vitro* and *in vivo*, the potential of these compost derivatives as biofertilising and biopesticidal agents, applied using the biopriming technique.

For this purpose, aqueous extracts were obtained from two types of compost from agro-food industry wastes (RAA1 and RAA3) by applying four different extraction protocols (CEP1, CEP2, CEP3 and CEP4). The eight types of resulting extracts were used as preventive treatments on cucumber seeds, using the biopriming technique, which consists of imbibing the seeds in a biological matrix composed, in this case, of the different aqueous compost extracts and an alginate matrix. First, the imbibed seeds were subjected to an *in vitro* germination test to evaluate their plant growth promoting capacity, as well as to a dual confrontation in a Petri dish of the extracts against the phytopathogenic fungus *Rhizoctonia solani*. Subsequently, two *in planta* trials were carried out to test the phytostimulant and biopesticidal effect of the extracts.

The results obtained from the *in vitro* tests showed that most of the extracts had a phytostimulant character, especially those obtained from the RAA1 compost. In addition, these extracts showed a greater antagonistic effect against the phytopathogenic fungus after being exposed to the fungus on a plate. On the other hand, *in vivo* tests showed that compost extracts applied by the biopriming technique have a positive effect as plant growth promoters, as well as biopesticides, with the CEP1 and CEP2 protocols standing out, respectively.

From these results, it can be concluded that aqueous compost extracts have phytostimulant and biopesticidal capacities, but these depend on the nature of the compost and the extraction protocol applied. The use of aqueous compost extracts, using the biopriming technique, broadens the versatility of applications of this product.

**Key words:** Composting, *biopriming*, aqueous extract of compost, *Rhizoctonia solani*.

# 1. Introducción

## 1.1. Problemática de la generación masiva de residuos

En primer lugar, no se puede hablar sobre la problemática de la generación masiva de residuos, sin saber cuál es el propio concepto de residuo. Según la *Ley 22/2011 del 28 de julio, de residuos y suelos contaminados*, se definen estos como «cualquier sustancia u objeto que su poseedor deseche o tenga la intención o la obligación de desechar» (BOE n.º 181 de 29-07-11). Por tanto, tomamos como residuo aquel objeto o sustancia sólida, líquida o gaseosa que ya ha cumplido su función y su poseedor desea desechar, perdiendo su valor económico.

Hoy en día, la velocidad de generación de residuos, principalmente de origen antropogénico, es superior a la de su tratamiento o gestión. Esto es debido a la superpoblación y al poco respeto por el medioambiente, junto con el desconocimiento de la población para hacer frente a esta situación. Esto se hace especialmente patente con la fracción orgánica de tales desechos. De hecho, se genera una gran cantidad de materia orgánica que no puede integrarse a la velocidad necesaria en los ciclos naturales (López et al., 2015). Normalmente, los microorganismos del ambiente incorporan esta materia orgánica en los ciclos biogeoquímicos de los elementos, conformando un equilibrio biológico y químico que mantiene la integridad de los ecosistemas, pero este equilibrio se ve alterado por la saturación de los sistemas por exceso de incorporación de estos residuos orgánicos.

Los residuos orgánicos se consideran residuos biodegradables o «biorresiduos». Según la previamente mencionada *Ley 22/2011 del 28 de julio*, se trata de un residuo biodegradable de jardines y parques, residuos alimenticios y de cocina procedentes de hogares, restaurantes, servicios de restauración colectiva y establecimientos de venta al por menor; así como residuos comparables procedentes de plantas de procesado de alimentos (BOE n.º 181 de 29-07-11). Como se ha resaltado anteriormente, estos residuos orgánicos tienen un fuerte impacto ambiental, debido principalmente a su alto contenido en materia orgánica. Dicha composición les confiere susceptibilidad a la biodegradación, es decir, tienen la propiedad de ser degradados o desintegrados por organismos vivos, especialmente microorganismos. Esto origina una transformación del material de partida que puede contribuir a mitigar la problemática asociada a su mala gestión, acumulación y/o vertido (Jördening y Winter, 2005; López et al., 2015).

Por otra parte, es destacable la gran importancia de la agricultura como actividad de enorme peso y relevancia en el sistema económico de muchos países y, específicamente, la agricultura intensiva, la cual supone un gran impacto ambiental y debe ser reconducida hacia un modelo económico más sostenible, ya que es una importante fuente de producción anual de residuos orgánicos a nivel mundial. La Agencia Europea del Medio Ambiente (EEA, 2020) define los residuos agrícolas como «materiales inutilizables, sólidos o líquidos, que resultan de las prácticas agrícolas». Dichas prácticas pueden considerarse como una actividad industrial o una rama de la industria que cultiva la tierra para producir alimento y materias primas. Estos residuos agrícolas pueden ser, a su vez, de diversa índole en función del tipo de cultivo o la etapa en la que se producen. Así, encontramos los residuos de campo, referidos a la propia cosecha

(constituyen un 65% de los residuos agrícolas y suelen ser restos vegetales) o los residuos procedentes del procesado de esa cosecha (no superan el 4%), como pueden ser cáscaras o bagazo (Moreno y Moral, 2007). Así, los restos vegetales son el principal residuo procedente de la actividad agraria y su importancia reside en su potencial para ser transformados desde residuo a recurso. De esta forma, se relaciona el término residuo agrícola con el término de residuo vegetal, entre los cuales enmarcamos aquella parte de la cosecha que no cumple con los requisitos de calidad mínima para ser comercializada, además de los restos de la poda de cultivos leñosos (López et al., 2015; Jurado, 2015).

Sin embargo, desde otro punto de vista, los residuos orgánicos procedentes de la agricultura constituyen una fuente de materia orgánica con una alta relación Carbono/Nitrógeno (C/N). Mediante las técnicas adecuadas, y conociendo la naturaleza y composición de dichos residuos, podrían ser aprovechados, de forma rentable, mediante su transformación en productos con valor añadido como enmienda orgánica para el suelo (López et al., 2015; Jurado, 2015).

En definitiva, teniendo en cuenta los beneficios ambientales y económicos derivados de la adecuada gestión, tratamiento y valorización de este tipo de residuos para ser convertidos en recursos, parece innegable que el aprovechamiento de esta biomasa brinda una nueva oportunidad de uso y contribuye al establecimiento de sistemas de bioeconomía circular cada vez más sólidos y sostenibles.

## **1.2. Valorización de residuos mediante compostaje**

Según la Real Academia Española (RAE), la valorización de residuos se define como: «operación cuyo resultado principal es que el residuo sirva a una finalidad útil al sustituir a otros materiales que de otro modo se habrían utilizado para cumplir una función particular o que el residuo sea preparado para cumplir esa función en la instalación o en la economía en general».

El empobrecimiento de suelos y la sobreproducción y acumulación de residuos orgánicos de fuerte impacto ambiental y sanitario han promocionado el aprovechamiento de tales materiales para obtener productos que mejoren estos suelos (Marcote et al., 2001). En la mencionada ley sobre el tratamiento de residuos no se describe cuál es el tratamiento adecuado para conseguir esta valorización de los residuos. Sin embargo, en la literatura relacionada se han propuesto distintas tecnologías para el tratamiento de otro tipo de residuos orgánicos de gran importancia socioeconómica como la fracción biodegradable de los residuos sólidos urbanos. Entre estas alternativas destacan métodos térmicos, como la incineración, pirólisis y gasificación; y métodos biológicos, como el compostaje y la digestión anaerobia (Moreno y Moral, 2007; Jurado, 2015).

Los métodos biológicos están ganando relevancia frente a los métodos térmicos porque, en general, estos últimos no permiten la recuperación de la materia orgánica o los nutrientes, además de que suelen generar otros residuos que no se pueden aprovechar (Moreno y Moral, 2007).

En la Unión Europea (UE) se desechan entre 118 y 138 millones de toneladas de residuos orgánicos cada año. De toda esta cantidad, sólo el 25% es reciclado mediante compostaje o

digestión anaerobia, predominando la primera técnica frente a la segunda (Razza et al., 2018). Aunque la digestión anaerobia está en auge debido a la generación de biogás como energía renovable, el tratamiento se elige dependiendo de la composición del residuo a tratar y de sus propiedades de separación (EEA, 2020), así como del potencial coste-beneficio esperado por la empresa o institución que gestione los tratamientos.

### 1.2.1. Digestión anaerobia

La digestión anaerobia es un proceso de degradación biológica que involucra la transformación de la materia orgánica en biogás (alrededor de un 55-70% de metano y el resto de dióxido de carbono), una fracción líquida con una pequeña cantidad de nutrientes y una fracción sólida (Moreno y Moral, 2007; González-Sánchez et al., 2014). A lo largo del proceso participan varios consorcios microbianos que establecen entre sí relaciones de simbiosis y un metabolismo coordinado (Weiland, 2010). Este proceso ha aumentado la atención recibida puesto que constituye una forma de producción de energía y es útil para reducir los problemas asociados a la generación de residuos orgánicos (Parawira et al., 2005). La producción de metano ( $\text{CH}_4$ ) e hidrógeno ( $\text{H}_2$ ) mediante este proceso, aplicado a residuos agrícolas orgánicos, podría beneficiar a la sociedad al proporcionar un combustible limpio de origen renovable (ya que proviene de la conversión de la biomasa), sustituyendo la energía derivada de los combustibles fósiles. Por tanto, se reduce el impacto ambiental en ese sentido, como el calentamiento global o la lluvia ácida (Chynoweth et al., 2001; Demirel y Scherer, 2008).

Esta digestión anaerobia se lleva a cabo en cuatro etapas (Figura 1): hidrólisis (la materia orgánica se fermenta, produciendo compuestos sencillos, tales como monómeros), acidogénesis (producción de ácidos orgánicos), acetogénesis o deshidrogenación (se generan acetatos, propionatos y butiratos) y metanogénesis (donde los microorganismos metanógenos producen metano a través de la ruta acetotrófica e hidrogenotrófica) (Parawira et al., 2005; Demirel y Scherer, 2008; Weiland, 2010). Los microorganismos fermentadores e hidrolíticos son los responsables del ataque inicial a los polímeros y monómeros, produciendo compuestos como el acetato, hidrógeno y otros ácidos orgánicos volátiles, como el propionato y el butirato. Dichas actividades hidrolíticas son el resultado de la producción de enzimas, tales como hidrolasas, entre las que destacan las celulasas, celobiasas, xilanasas, amilasas, lipasas y proteasas (Parawira et al., 2005; Weiland, 2010). Entre los microorganismos que destacan en el proceso de digestión anaerobia se hallan los pertenecientes a los géneros *Clostridium* y *Bifidobacterium*. Además de algunos anaerobios facultativos como *Streptococcus* y *Enterobacterium* (Weiland, 2010).

Una de las desventajas del proceso de digestión anaerobia es que la acumulación de hidrógeno puede inhibir el metabolismo de las bacterias acetogénicas, por lo que hay que establecer un control estricto sobre la presión de  $\text{H}_2$ . Además, algunos detalles sobre el metabolismo microbiano de algunos individuos de los consorcios no están claros (Weiland, 2010). Por otra parte, este método está mayormente destinado a residuos húmedos separados en origen para la recuperación de materia y nutrientes, por lo que la fracción sólida remanente del residuo requiere de un posterior compostaje o tratamiento adicional (Moreno y Moral, 2007). Además, la digestión anaerobia no es siempre factible. En algunos casos es necesario tratar grandes

cantidades de residuos vegetales, debido a que el balance energético obtenido de la digestión de algunos compuestos, como la lignina, no alcanza valores tan buenos como podría alcanzar con otro tipo de residuos. Cuando la digestión anaerobia no es posible, se recurre directamente al compostaje (EEA, 2020).

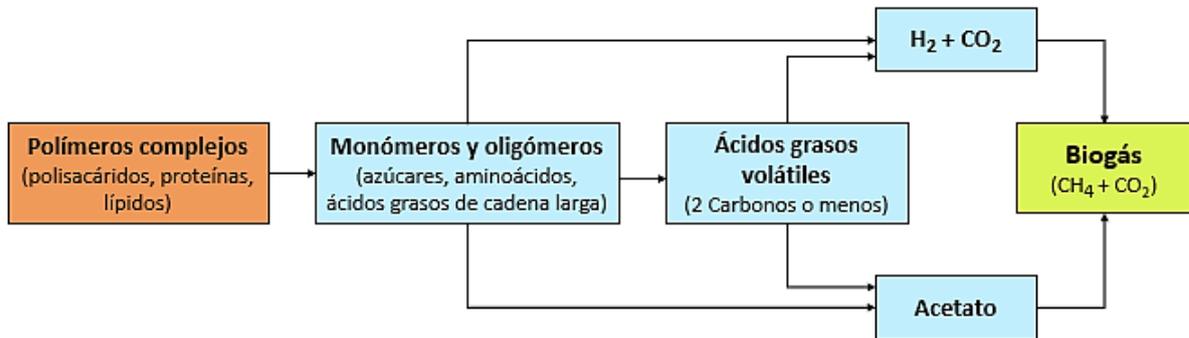


Figura 1. Esquema general del proceso de digestión anaerobia simple (Modificado de Weiland, 2010).

### 1.2.2. Compostaje

Teniendo en cuenta la composición de materiales, texturas y tejidos presentes en los residuos agrícolas, el compostaje se propone como una de las opciones más respetuosas con el medio ambiente. El proceso de compostaje se puede aplicar a distintos tipos de residuos orgánicos y permite obtener un producto de elevada calidad minimizando el gasto económico en transportes (Moreno y Moral, 2007). Además, destaca su utilidad para la restauración o recuperación de suelos contaminados (Jurado, 2015).

El compostaje es un proceso que involucra la descomposición biológica de la materia orgánica, bajo un ambiente controlado y en condiciones aeróbicas, reduciendo la humedad, el peso y el volumen de los residuos tratados. Así, conduce a la obtención de un producto humificado y estabilizado denominado compost (Epstein, 1997; Moreno y Moral, 2007). Sanitariamente, el compost se define como un producto estable e inofensivo resultante de la exposición de la fracción biodegradable de los residuos urbanos, agrícolas e industriales a una degradación bioquímica natural (García, 1984). Aunque el compost se considera un fertilizante, su función realmente es la de mantener el equilibrio estructural y funcional adecuado en el suelo. Los microorganismos presentes, mediante el desarrollo de sus actividades metabólicas, favorecen la nutrición de las plantas y el mantenimiento de dicho equilibrio (Moreno y Moral, 2007; López et al., 2015).

La pila de compostaje constituye un ecosistema en el que diversas poblaciones microbianas degradan la materia orgánica en presencia de oxígeno. Esto genera un producto estable unificado con la liberación de gases, agua y calor como residuos del metabolismo microbiano (Moreno y Moral, 2007). Este proceso puede dividirse en varias etapas, ya sea en función de las actividades microbianas o de la relación entre la funcionalidad microbiana y la temperatura del proceso (Moreno y Moral, 2007; Tortosa, 2013; Jurado, 2015) (Figura 2).

Dependiendo de la funcionalidad microbiana, el proceso de compostaje se puede dividir en dos fases globales (Tortosa, 2013; Jurado, 2015):

1. Fase Biooxidativa: se produce un crecimiento microbiano activo debido a la elevada biodisponibilidad de nutrientes, dando como resultado la generación de calor. Cuando la temperatura no se incrementa por encima del valor ambiental se considera que esta etapa ha finalizado.
2. Fase de Maduración o Estabilización: la disponibilidad de nutrientes es limitante debido a la degradación masiva producida en la etapa anterior. Así, disminuye la actividad microbiana y predominan los fenómenos químicos que favorecen la humificación.

Por otro lado, según la temperatura alcanzada el proceso puede dividirse, a su vez, en cuatro etapas (Moreno y Moral, 2007; Tortosa, 2013; Jurado, 2015):

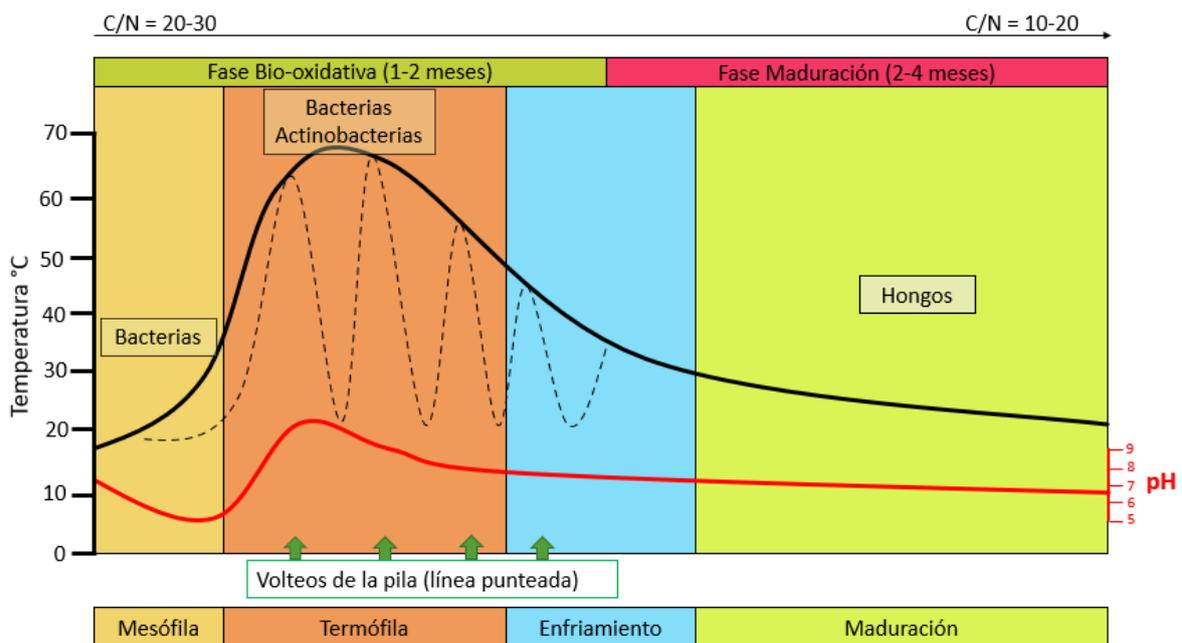
1. Etapa Mesófila. Al inicio del proceso y cuando se desciende durante la etapa biooxidativa a temperaturas menores de 40 °C. Normalmente se produce la acidificación del material constituyente de la pila por la producción de compuestos de naturaleza ácida. Predominan los microorganismos mesófilos y/o termotolerantes, siendo uno de los géneros bacterianos mayoritario *Bacillus* —capaz de producir endosporas—. En esta fase coexisten una gran diversidad de poblaciones microbianas que se relacionan con la descomposición de compuestos orgánicos fácilmente biodegradables, como es el caso de azúcares sencillos. Esta fase propicia un aumento rápido y continuo de la actividad microbiana, así como de la temperatura de la pila.
2. Etapa Termófila. Se considera esta etapa cuando la temperatura es superior a 40 °C. Se inicia la degradación de compuestos más complejos y resistentes a la biodegradación, gracias a la actividad biooxidativa de los microorganismos termófilos, los cuales son los protagonistas en esta etapa. Predominan las actinobacterias, junto con algunas especies de *Bacillus*. Esta etapa se caracteriza por la reducción de la diversidad microbiana como consecuencia de la alta temperatura, además de una elevación del pH y la liberación de otros compuestos. En esta etapa se percibe el olor característico del compost, gracias a la producción de geosmina —un sesquiterpenoide— por parte de actinobacterias. Además, se produce la higienización del material orgánico quedando libre de parásitos, agentes patógenos o semillas de malas hierbas que puedan portar algunos componentes de la mezcla.

Estas etapas se repiten de forma cíclica durante la fase biooxidativa debido a los sucesivos volteos realizados con el objetivo de mezclar los materiales de la pila y que el proceso de compostaje ocurra de forma homogénea en todo el material. Esto da lugar a nuevas fases mesófilas y termófilas donde los microorganismos mesófilos y termófilos (o termotolerantes) recolonizan hasta conseguir la degradación total de los materiales poco descompuestos, que cada vez será más lenta (Moreno y Moral, 2007; Tortosa, 2013).

3. Etapa de Enfriamiento. Durante esta etapa la población microbiana y su actividad disminuyen debido a las altas temperaturas alcanzadas en la fase termófila y a la limitación en la disponibilidad de nutrientes (disminuye la relación C/N). Por lo tanto,

vuelven a ser protagonistas los microorganismos mesófilos, mayoritariamente hongos cuyas esporas permanecieron en la pila, o bien otros microorganismos que la recolonizan desde el exterior.

4. **Etapa de Maduración.** En esta etapa se producen una gran cantidad de reacciones de condensación y polimerización molecular que conducen a la formación de complejos muy estables y no biodegradables, compuestos principalmente por lignina, celulosa y hemicelulosa. Conforme avanza la fase de maduración, la comunidad microbiana adquiere mayor estabilidad y complejidad. Aumenta la diversidad de bacterias, actinobacterias mesófilas y termotolerantes, y hongos filamentosos. Estas actividades junto con las de otros microorganismos como protozoos, nemátodos y miriápodos contribuyen a la estabilización del producto final. Esta fase puede durar varios meses (Moreno y Moral, 2007; Tortosa, 2013).



**Figura 2.** Esquema descriptivo de las distintas fases del proceso de compostaje (Modificado de Jurado, 2015).

A modo de resumen, predominan las rutas de descomposición y mineralización en las primeras etapas del proceso, donde los microorganismos utilizan la fracción más fácilmente degradable del material. Posteriormente, el material resultante se somete a una fase de maduración y estabilización para dar lugar a un producto que conocemos como compost. En la última fase ocurren fenómenos de humificación (un proceso algo más lento que la mineralización) a partir de aquellos compuestos menos biodegradables. Ambos procesos ocurren simultáneamente durante el proceso de compostaje (Moreno y Moral, 2007).

La actividad microbiana del suelo juega un papel importante tanto en la estabilidad como en la fertilidad del sistema edáfico, dado que interviene en los procesos de estructuración y es protagonista de los ciclos biogeoquímicos (Marcote et al., 2001). Por tanto, la aplicación del compost en suelo nos permite observar la importancia de sus poblaciones microbianas e, incluso más relevante, sus actividades enzimáticas (Moreno y Moral, 2007). De hecho, la microbiota del compost sintetiza compuestos que le aportan unas características muy interesantes,

convirtiéndolo en un producto de calidad para la agricultura o la biorremediación. Estos constituyentes pueden ser separados del compost para su aplicación agro-biotecnológica (Moreno y Moral, 2007).

Antes de los años 80 se aplicaban con frecuencia fertilizantes orgánicos, como la gallinaza, estiércol, compost, paja u otros restos orgánicos. Hoy en día, se aplican en horticultura distintos tipos de compost y derivados como alternativa a los fertilizantes de síntesis. Las aplicaciones del compost, de hecho, abarcan un amplio abanico de posibilidades, desde servir como fuente de nutrientes para el desarrollo vegetal hasta actuar como supresor de enfermedades vegetales (Moreno y Moral, 2007). Algunos de esos derivados son, por ejemplo, las extracciones acuosas y los tés de compost, que no son más que muestras líquidas obtenidas a partir de compost mediante distintos procedimientos tales como presión, destilación, evaporación o tratamientos con solventes (Martin, 2014).

### **1.3. Extractos de compost como alternativa a los fertilizantes de síntesis**

Cada vez se presta mayor interés a los fertilizantes naturales, en concreto al uso de tés de compost para la mejora de la calidad de los cultivos. A lo largo de años de investigación, los resultados en campo han demostrado el poder de esta tecnología que se abre paso en la agricultura actual. Generalmente, hay dos aspectos principales que caracterizan los tés de compost: su capacidad biofertilizante y bioprotectora (Ingham, 2003).

Una definición sencilla de té de compost puede ser un extracto acuoso, preparado a partir de compost (Ingham, 2005). Aunque a veces los términos té de compost y extracto acuoso de compost se usan indistintamente con objeto de referirse a la misma solución acuosa (Martin, 2014). Sin embargo, muchos científicos inciden en la diferencia conceptual entre extracto acuoso de compost (considerado un concepto más amplio) y té de compost. En el primero, el proceso consiste simplemente en hacer correr agua a una presión significativa a través del compost para extraer los microorganismos y nutrientes de interés, separándolos de los sólidos no deseados. En cuanto al té de compost, contiene varios ingredientes como son el compost y ciertos aditivos que se añaden al inicio del proceso de preparación (Ingham, 2005; Martin, 2014). Además, el té de compost se puede obtener bajo condiciones de aerobiosis o anaerobiosis (Scheuerell y Mahaffee, 2002; Ingham, 2005; Martin, 2014), dando como resultado el té de compost aireado (ACT de sus siglas en inglés “Aerated Compost Tea”) y el té de compost no aireado (NCT de sus siglas en inglés “Non-aerated Compost Tea”), respectivamente (Scheuerell y Mahaffee, 2002; Dearborn, 2011; Martin y Brathwaite, 2012). Los procedimientos para la obtención de ambos tipos de té de compost se describen a continuación:

- **Té de compost no aireado (NCT)**: es un método tradicional de fabricación que involucra un procedimiento pasivo de crecimiento microbiano donde no se inyecta oxígeno. NCT se basa en el uso de compost estable sin aditivos azucarados, bajo condiciones de baja oxigenación y agitación ocasional. El término de anaerobiosis no encaja completamente en este proceso debido a que se realiza normalmente en tanques abiertos, aunque sin

aireación forzada, durante un periodo de incubación de 14 días. A este proceso a veces se le denomina fermentación (Martin, 2014).

- Té de compost aireado (ACT): se trata de un enfoque más reciente del proceso de fabricación que implica un proceso activo que incluye el uso de un aireador para oxigenar la mezcla durante el proceso de incubación, produciendo un ACT en un tiempo de elaboración más corto (entre 12 horas y 3 días). Durante el proceso se suelen añadir aditivos nutritivos (Martin, 2014).

### **1.3.1. Uso de extractos de compost en biofertilización**

Un producto biofertilizante es un fertilizante natural obtenido a partir de microorganismos, bien aplicados directamente o a través de un soporte, como el compost, y cuya aplicación e interacción con el sistema planta-suelo mejora las características del propio suelo, aumentando la disponibilidad de nutrientes para las plantas y favoreciendo especialmente el crecimiento radicular. Se aplican en el suelo o sobre la planta con el fin de sustituir la fertilización sintética, lo que permite reducir costes y problemas ambientales derivados de la contaminación del suelo y los acuíferos (Armenta-Bojórquez et al., 2010; Bhattacharya y Jha, 2012; Kumar et al., 2017).

Durante muchos años, los pesticidas, herbicidas y otros fertilizantes químicos han constituido el pilar base para la producción intensiva en distintas formas de agricultura. Sin embargo, debido a su uso indiscriminado ha aumentado el riesgo de contaminación provocando serios cambios en el equilibrio ecológico y la desestabilización de suelos (Naidu et al., 2010). Por tanto, surge la necesidad de buscar otras alternativas sostenibles para reemplazar el uso de químicos en agricultura. Una alternativa sería el uso de sistemas microbianos como biofertilizantes en diferentes tipos de cultivo para mejorar, por ejemplo, la movilización de nutrientes. Esos sistemas microbianos pueden estar contenidos en el compost, pero esto depende de su composición, calidad y tiempo (Pant et al., 2012; Martin, 2014).

Existen una serie de características y cualidades que postulan a los té y extractos de compost como los candidatos apropiados para este fin, por ejemplo, su composición en nutrientes solubles idóneos para nutrir tanto a los propios microorganismos que colonizan el extracto acuoso como a la planta, fomentando su crecimiento saludable. Otras cualidades destacables de los extractos de compost para su uso como biofertilizantes (Ingham, 2003) son las siguientes:

- Permiten que los nutrientes se mantengan en el sustrato. Esto supone un beneficio económico adicional, ya que si los nutrientes están contenidos en las células microbianas se mantienen en el sustrato en lugar de filtrarse con el agua. Así, el tratamiento de aguas residuales procedentes de estas prácticas agrícolas será menos intensivo que usando químicos de síntesis.
- Aumentan la disponibilidad de nutrientes para las plantas.
- Detoxifican el sustrato y el agua.

Como resultado se obtiene una mejor estructuración del sustrato en el que se encuentran los cultivos, de forma que hay una mejor distribución de los recursos nutritivos e hídricos. Esto desemboca en un mejor crecimiento y salud vegetal (Ingham, 2003).

### 1.3.2. Uso de extractos de compost como agentes bioprotectores

El término fitoprotector o biopesticida abarca una amplia gama de aspectos en cuanto al control de plagas y enfermedades, y en pro de un tipo de agricultura más sostenible, como puede ser el empleo de organismos microbianos, nemátodos entomopatógenos, pesticidas derivados de vegetales, metabolitos secundarios procedentes de microorganismos (sustancias antibióticas), entre otros (Copping y Menn, 2000). La presencia de una amplia diversidad microbiana en los extractos de compost les confiere interesantes funcionalidades como agentes de control biológico (ACBs) (Ingham, 2003). Entre estas funciones, destacan:

- El consumo de nutrientes a partir de los exudados de las plantas, tanto de raíz como de hojas. Además, a diferencia de los fertilizantes y pesticidas sintéticos, no destruyen la microbiota beneficiosa que rodea a la planta, solo son supresores de microorganismos patógenos.
- Colonizan la superficie de la planta ocupando los sitios de infección, de esta manera impiden que los patógenos penetren los tejidos de la planta.
- Compiten con microorganismos patógenos por espacio y nutrientes y/o produciendo componentes que inhiben su crecimiento.

El uso de té o extractos de compost como herramientas bioprotectoras para hacer frente a diferentes fitopatógenos representa una alternativa de biocontrol que supera el paradigma convencional del manejo de enfermedades vegetales (Martin, 2015). El interés en el uso de este método aumenta con el incremento en la demanda de productos agrícolas orgánicos y sostenibles, en concordancia con la necesidad de reducir los efectos negativos de los pesticidas sintéticos en la salud humana y el medioambiente (Martin, 2015).

Algunos patógenos colonizadores de suelo de mayor incidencia y, por tanto, de mayor interés comercial pueden ser, por ejemplo, *Pythium ultimum*, *Phytophthora cryptogea* y *Sclerotinia sclerotirum*. Existen precedentes de la supresión de dichos microorganismos por algunos ACBs presentes en los extractos procedentes de compost, como es el caso de *Trichoderma* spp., que suele ser abundante en el té de compost aireado. En otros estudios similares de antagonismo se estudió el efecto inhibitorio de ACT frente a las especies *Rhizoctonia solani*, *Phytophthora parasítica* y dos cepas de *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici*. En este caso, se demostró que la inhibición estaba mediada por la excreción de agentes sideróforos por parte de microorganismos presentes en el compost (Martin, 2014). Otros autores han demostrado la capacidad supresiva *in vitro* de NCT frente a patógenos como *Fusarium graminearum*, *Rhizoctonia bataticola*, *Fusarium solani*, *Pythium ultimum*, *Rhizoctonia solani* y *Sclerotium rolfsii*. Sin embargo, en algunos estudios en los que se esterilizó el NCT se siguió observando su poder como supresor de fitopatógenos (en este caso frente a *P. ultimum*). Por lo tanto, se asocia la supresividad del NCT a un carácter químico en lugar de biológico (Martin, 2014).

Por otra parte, se encuentra especial importancia en patógenos foliares y de frutos, frente a los cuales se han realizado numerosos estudios en relación con su supresión mediada por té de compost. Por ejemplo, se ha demostrado que el ACT procedente del compostaje de residuos de

almazara es capaz de inhibir el crecimiento de *Botrytis cinerea* gracias a las propiedades biológicas del té. Además, otros estudios han demostrado la supresión, por parte de estos tés, de la germinación conidial de *Glovinomyces cichoracearum*, el agente causal del mildiú en melón (Martin, 2014). Por otro lado, también ha sido demostrada la capacidad supresora *in vitro* de los NCT frente a diversos patógenos, como es el caso de *Phytophthora infestans* o *Alternaria* sp. Sin embargo, pese a que se suelen atribuir las capacidades supresoras del NCT a su composición química más que a su fracción biológica, los resultados indican que algunos microorganismos específicos presentes en él son muy importantes en el enfrentamiento con patógenos (Martin, 2014).

#### **1.4. Nuevas formas de aplicación de los extractos de compost: *biopriming***

Debido al cambio climático y otras condiciones medioambientales desfavorables para el rendimiento agrícola, así como la protección de los cultivos frente a fitopatógenos, surge el uso de fertilizantes químicos y pesticidas. No obstante, se ha comprobado que estos compuestos tienen efectos adversos en la salud humana, así como en la del medio ambiente, especialmente por el agotamiento de los suelos y la pérdida de biodiversidad (Chennappa et al., 2019). Como alternativas, han surgido tecnologías aplicables a semillas con el fin de solventar los problemas relacionados. Entre estas tecnologías aplicables a semillas y con el objetivo de favorecer la agricultura sostenible, surge la técnica de “*priming* de semillas”.

El *priming* de semillas es un método aplicable a un determinado lote de semillas. Dicha aplicación ha demostrado ser útil para la mejora de la germinación de las semillas y el establecimiento de las plántulas de numerosos cultivos (Taylor et al., 1998). Básicamente, el *priming* es una técnica basada en la hidratación controlada de las semillas para desencadenar el «metabolismo pre-germinativo», pero que no interviene en la transición de la semilla a una completa germinación. Esta técnica destaca como una forma potencial de promover el rendimiento de los cultivos mediante la mejora de la tolerancia de las plantas al estrés biótico y abiótico (Bruce et al., 2007). En realidad, hace que mejore la germinación y también el vigor de los brotes, que es un rasgo agronómico complejo controlado por múltiples factores genéticos y ambientales (Rakshit y Singh, 2018).

Cuando la semilla es embebida en el agua (o matriz), se da una sucesión de tres fases hasta que germina. El *priming* lo que acelera es que la semilla se hidrate hasta un contenido de agua adecuado para las fases I y II, justo antes de la protrusión de la radícula cuando la germinación sigue siendo reversible, activando, por tanto, el «metabolismo pre-germinativo». Las fases son las siguientes (Rakshit y Singh, 2018):

- Fase I (imbibición): hay una rápida absorción de agua que disminuye el potencial hídrico de la semilla, gracias al movimiento del líquido por la vía apoplasto.
- Fase II: se produce la activación de los procesos metabólicos de reparación, en relación con la traducción del ARNm y síntesis de proteínas necesarias para la siguiente fase.
- Fase III: esta fase está relacionada con la capacidad para recuperar agua y la iniciación de la elongación celular, que desemboca en la protrusión de la radícula.

Las técnicas de priming de semillas incluyen diferentes categorías según la elección del soporte o matriz empleada para la imprimación del material vegetal. Dicha elección depende de la especie de planta, de la morfología y fisiología de la semilla, entre otros parámetros. Entre estas técnicas, que mejoran la producción agrícola, se encuentran el *hydro-priming* (adición continua de una cantidad limitada de agua a las semillas), *halo-priming* (imbibición de las semillas en una solución salina), *osmo-priming* (exposición de las semillas a un bajo potencial hídrico externo), *hormonal-priming* (la solución de imbibición contiene una pequeña cantidad de reguladores del crecimiento u hormonas vegetales), *nutri-priming* (las semillas son embebidas en soluciones que contienen nutrientes limitantes en lugar de agua), *redox-priming* (la célula se somete a un estímulo externo modificando el estado redox y, por tanto, desarrollando tolerancia a dicho estrés), *priming* de matriz sólida (mezcla de semillas en un material sólido o semisólido mezclado con cierta cantidad de agua) y el *biopriming* (Rakshit y Singh, 2018).

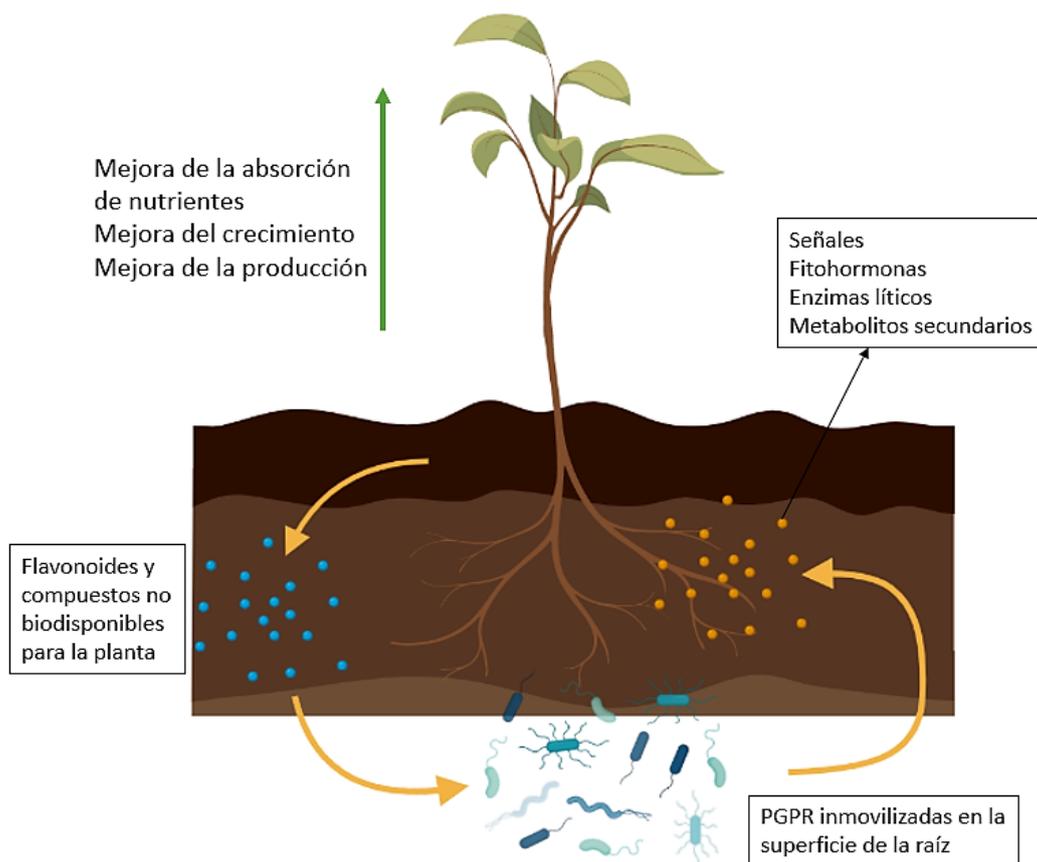
En la técnica de *biopriming* o *priming* biológico las semillas se ponen en contacto con una solución acuosa que contiene microorganismos promotores del crecimiento vegetal (PGPM de sus siglas en inglés “Plant Growth Promoting Microorganisms”). Con ello, se consigue mejorar el nivel de defensa basal de la planta induciendo la memoria inmunológica vegetal, además de los beneficios que el *priming* implica *per se* (Rakshit y Singh, 2018). Hoy en día esta técnica está ganando una gran importancia en el control de enfermedades de los cultivos (Chennappa et al., 2019).

Los PGPMs son un grupo de microorganismos que tienen una influencia positiva en el crecimiento y salud vegetal. Algunos de los microorganismos considerados como PGPM pertenecen a los géneros *Azotobacter*, *Azospirillum*, *Pseudomonas*, *Acetobacter*, *Bacillus* o *Trichoderma*, entre otros. Los beneficios que aportan el uso de estos microorganismos se atribuyen a su capacidad para producir diversos compuestos como fitohormonas, ácidos orgánicos, sideróforos, fijación atmosférica del nitrógeno, solubilización de fosfatos, antimicrobianos, etc. Por ello, resultan idóneos para su uso como biofertilizantes, agentes de control biológico o fitoestimulantes (Chennappa et al., 2019). Los PGPMs engloban un grupo de microorganismos denominado PGPR, en inglés *Plants Growth Promoting Rhizobacteria*. Se trata de un grupo de bacterias que coloniza activamente las raíces de plantas y promueve el crecimiento, así como un incremento de la productividad agraria (Figura 3) (Kloepper et al., 1980). Para ello, estos microorganismos establecen relaciones con la planta, tanto en la propia rizosfera como endofíticas, para aumentar la absorción de nutrientes gracias, entre otros mecanismos, por su capacidad para llevar a cabo la fijación biológica de nitrógeno (Bhattacharya et al., 2012; Chennappa et al., 2019).

Para poder llevar a cabo la inoculación de agentes microbianos en las semillas se debe garantizar la viabilidad de los microorganismos que son introducidos. Por lo tanto, se necesita una matriz o «carrier» para la formulación del *biopriming*, que constituye el principal aporte de microorganismos inoculantes (PGPRs) al sustrato (Ajeng et al., 2020). Dichos *carriers*, que pueden ser orgánicos o inorgánicos, facilitan la supervivencia de los microorganismos durante un tiempo considerable (Reddy, 2013). Algunos ejemplos de *carriers* son turba, talco, zeolita y polímeros como el alginato, la goma xantano o la carboximetilcelulosa (Caro, 2019). La selección

de un tipo de *carrier* u otro dependerá del método de inoculación que se aplique (Ajeng et al., 2020).

Durante el *biopriming*, la semilla percibe un estímulo desencadenado por la presencia y funcionalidad de los microorganismos beneficiosos, implicando cambios en el comportamiento fisiológico, transcripcional, metabólico y epigenético de la planta (Meena et al., 2016; Rakshit y Singh, 2018). Este proceso permite una rápida colonización de microorganismos beneficiosos sobre la superficie de la semilla y una mayor uniformidad en la cobertura frente a otras técnicas de *priming* (Ashraf y Foolad, 2005). Así, la población microbiana alrededor de la superficie de la semilla puede aumentar de 10 a  $10^5$  veces dependiendo de la cantidad inicial del inóculo. El proceso asegura una mejor supervivencia de las plantas, así como una correcta germinación de la semilla. Además, los microorganismos beneficiosos juegan un papel importante en la mejora de los valores nutricionales de los productos alimenticios procedentes de los cultivos agrícolas (Rakshit y Singh, 2018).



**Figura 3.** Esquema del mecanismo de acción de microorganismos considerados PGPRs inmobilizados en la rizosfera gracias al *biopriming* y su interacción con la planta (Modificado de Ajeng et al., 2020).

#### 1.4.1 Antecedentes de experimentación en *biopriming* con extractos de compost

A raíz de un sinnúmero de estudios en los que se ha comprobado el efecto de la inoculación microbiana de semillas mediante la técnica de *biopriming*, se ha comprobado, recientemente, el efecto de esta técnica aplicando extractos procedentes del compostaje o vermicompostaje de distintos residuos como herramienta agro-biotecnológica. Rajput et al. (2021) trataron de

determinar el efecto del método *biopriming*, aplicando como agentes inoculantes *Trichoderma pseudokoningii* BHUR2 y un extracto acuoso de vermicompost, en la respuesta de plantas de tomate frente al estrés biótico ocasionado por *Sclerotium rolfsii*, además de comprobar sus efectos sobre los nutrientes en el fruto. Los resultados obtenidos demostraron que las semillas tratadas con dicho inóculo mostraron mejores características fenotípicas frente a plantas control (sin tratamiento). Otro experimento paralelo demostró que la aplicación de *biopriming* únicamente con el extracto acuoso de vermicompost diluido en una matriz acuosa ocasionó un mayor crecimiento de la planta, así como una mejora de la producción agrícola. Por otra parte, se comprobó el efecto antagonista de la formulación de *biopriming* frente al patógeno. Esto se explica por la mayor actividad de las enzimas superóxido dismutasa, peroxidasa y fenilalanina amonio liasa que protagoniza la planta al ser tratada con *Trichoderma pseudokoningii* y el extracto acuoso de vermicompost (Rajput et al., 2021). Otros estudios recientes se han centrado en el efecto en plantas de trigo harinero con *biopriming* de semillas basada en una formulación constituida por una solución de estiércol de aves de corral (50%) y vermicompost (50%). Los resultados mostraron que las plantas cuyas semillas fueron embebidas en dicha formulación presentaron un máximo de crecimiento frente a otros tratamientos (Rahangdale et al., 2022).

Estos resultados parecen corroborar la idea de que los extractos acuosos de compost y sus derivados tienen un alto potencial biotecnológico como biofertilizantes y biopesticidas. En el marco de la economía circular y la agricultura orgánica, esto puede suponer un avance hacia un modelo de agricultura sostenible en la que se eviten fertilizantes de síntesis, pesticidas, reguladores de crecimiento, etc. (Rahangdale et al., 2022).

## 2. Objetivos

El compostaje ha demostrado ser un proceso económica y ambientalmente eficaz. Empleado principalmente como medida de gestión de residuos, permite remediar e higienizar materiales contaminados, así como obtener subproductos con valor añadido útiles para la restauración de suelos agotados y como fertilizantes para cultivos de interés agronómico. La aplicación del producto final, compost, como enmienda orgánica puede ser limitante en determinadas prácticas agrícolas con alta tecnificación que en la actualidad apuestan por la adición de nutrientes a través de los sistemas de riegos. En este contexto, surge la necesidad de buscar alternativas sostenibles al fertirriego tradicional basado en productos sintéticos. Teniendo en cuenta estos antecedentes, se planteó como objetivo principal del presente Trabajo Fin de Grado el “estudio de la eficacia de extractos acuosos de compost procedentes de residuos de origen agroalimentario aplicados mediante la técnica de *biopriming* como herramienta agrobiotecnológica”. Para la consecución de dicho **objetivo principal**, se plantearon los siguientes **objetivos específicos**:

1. Preparar extractos acuosos de compost de residuos agroalimentarios aplicando cuatro protocolos de extracción diferentes.
2. Evaluar *in vitro* el efecto fitoestimulante de los extractos aplicados mediante la técnica de *biopriming* en semillas.
3. Estudiar *in vitro* el potencial supresivo de los extractos de compost frente al hongo fitopatógeno *Rhizoctonia solani*.
4. Comprobar *in vivo* el potencial promotor del crecimiento vegetal y biopesticida de los extractos aplicados mediante *biopriming*.

### 3. Materiales y Métodos

#### 3.1. Diseño experimental

La primera fase del diseño experimental consistió en la obtención de diferentes extractos acuosos, procedentes de dos compost de residuos agroalimentarios (RAA1 y RAA3), mediante cuatro protocolos de extracción distintos (**Objetivo 1**). En una segunda fase, los extractos obtenidos se aplicaron en semillas de pepino mediante la técnica de *biopriming* para evaluar, en la tercera fase, su efecto fitoestimulante y bioprotector *in vitro* e *in vivo*. La técnica de *biopriming* consistió en la sumersión de 100 semillas de pepino en diferentes matrices, constituidas por alginato y los diferentes extractos de compost, durante media hora. Con las semillas en imbibición se realizó el estudio *in vitro* de la capacidad fitoestimulante de los diferentes extractos, mediante un bioensayo de índice de germinación en placas Petri (**Objetivo 2**), y de la capacidad biopesticida mediante enfrentamientos duales en placa de los diferentes extractos frente a un hongo fitopatógeno, *Rhizoctonia solani* (**Objetivo 3**). Tras la obtención de estos primeros resultados, se llevó a cabo el estudio *in vivo* de la capacidad fitoestimulante de los extractos de compost a nivel de plántula (**Objetivo 4**). De forma adicional, en esta tercera fase también se evaluó *in vivo* el efecto biopesticida de los diferentes extractos de compost mediante la inoculación de las plántulas con *Rhizoctonia solani* (**Objetivo 4**). En la Figura 4 encontramos un esquema orientativo del proceso global.

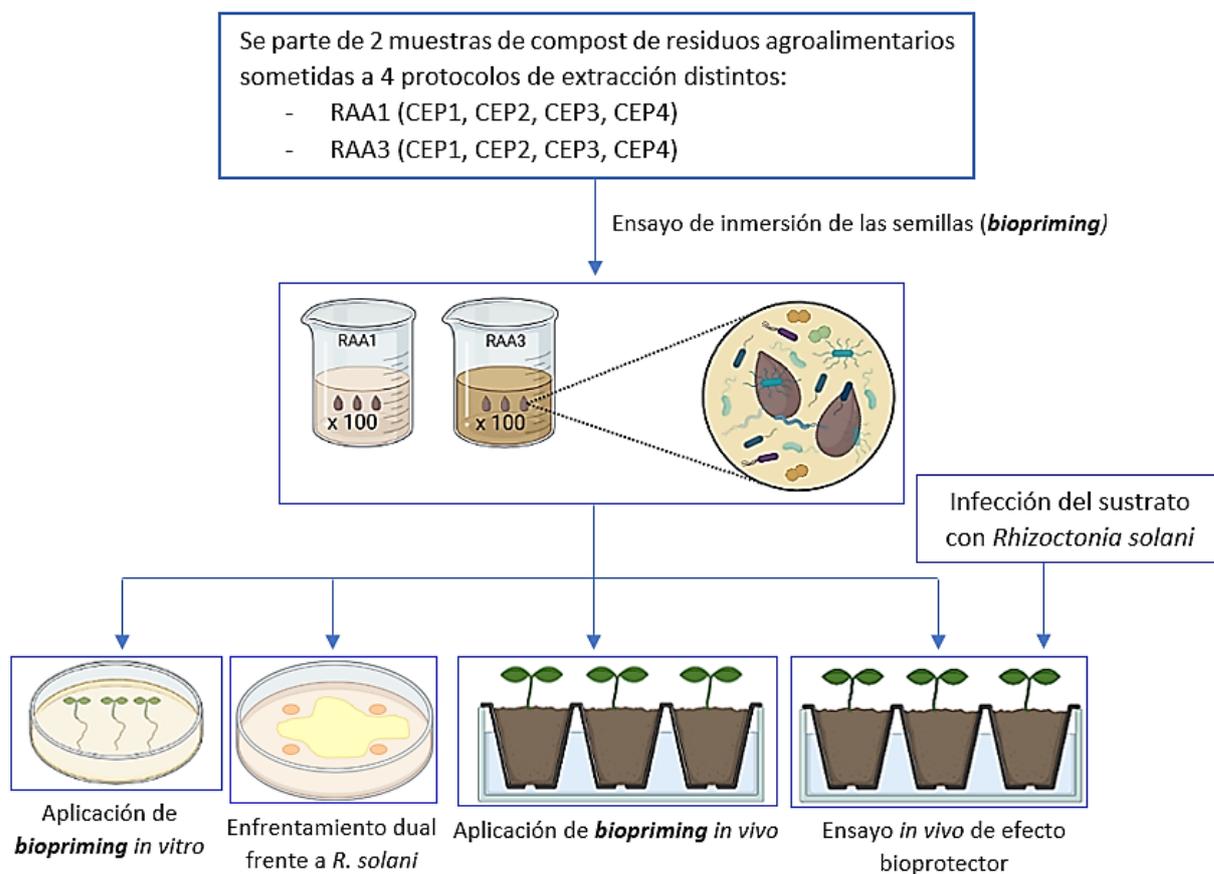


Figura 4. Esquema general del diseño experimental.

### 3.2. Obtención de extractos acuosos de compost

El primer paso de la fase experimental del presente trabajo perseguía la consecución del primero de los objetivos planteados: «preparar extractos acuosos de compost de residuos agroalimentarios aplicando cuatro protocolos de extracción diferentes». Para la elaboración de los extractos acuosos se utilizaron dos tipos de compost procedentes de procesos de compostaje llevados a cabo a escala industrial y empleando como materias primas principales residuos agroalimentarios, en la siguiente proporción: RAA1, lodos de cítricos y palmera (1:3); y, RAA3, lodos de cítricos, palmera y purines de cerdo (3:1:1,5). En primer lugar, se llevó a cabo la determinación de la humedad de los compost, mediante el equipo Moisture Analyzer HE73, para preparar los extractos a una proporción 1:5 de peso seco de compost en agua destilada. Posteriormente, se utilizaron diferentes protocolos de extracción (CEP, en inglés “Compost Extraction Protocol”), descritos previamente en bibliografía (Oka y Yermiyahu, 2002; Bernal-Vicente et al., 2008; Koné et al., 2010), basados en el empleo de condiciones distintas de extracción:

- **CEP-1:** el compost se mezcló con agua en una relación 1:5 en peso seco/volumen. Después se incubó a temperatura ambiente durante 48 horas en agitación a 120 rpm.
- **CEP-2:** el compost se mezcló con agua en una relación 1:5 en peso seco/volumen. Después se incubó a 40 °C durante 24 horas en agitación a 120 rpm.
- **CEP-3:** el compost se mezcló con agua en una relación 1:5 en peso seco/volumen. Después se incubó a 70 °C durante 12 horas en agitación a 120 rpm.
- **CEP-4:** el compost se mezcló con agua en una relación 1:5 en peso seco/volumen. Después se incubó a 18 °C durante 14 días sin ningún tipo de

Tras el tiempo de incubación, para retirar las partículas sólidas de mayor tamaño los extractos resultantes se sometieron a centrifugación a 4000 rpm durante 20 minutos (Eppendorf 5810R). Posteriormente, para eliminar los sólidos en suspensión, los extractos resultantes de la centrifugación se filtraron por un sistema de filtración con Kitasato y, posteriormente, para eliminar las partículas de menor tamaño, los extractos se filtraron con un filtro de profundidad de celulosa (Whatman).

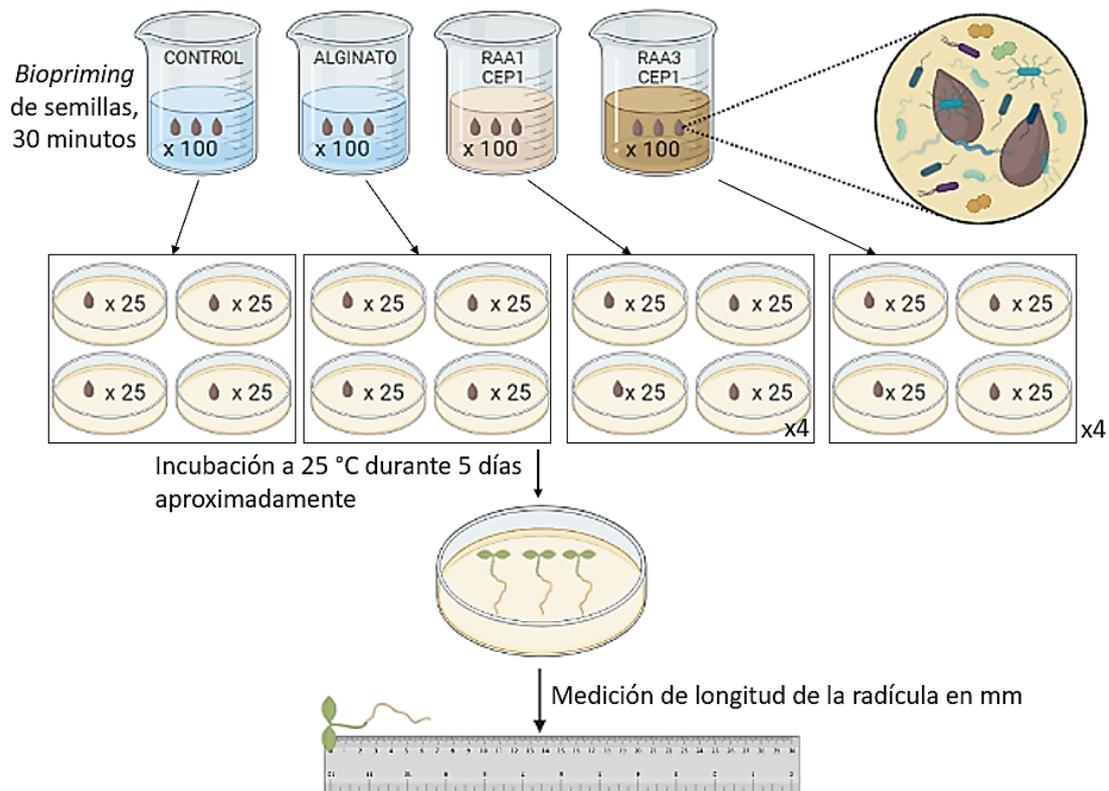
Finalmente, tras la obtención de los extractos acuosos de compost, se prepararon alícuotas en Eppendorf y tubos Falcon y se conservaron en congelación a -20°C hasta la realización de las analíticas pertinentes.

### 3.3. Ensayos *in vitro*

#### 3.3.1. Índice de germinación de los extractos de compost mediante *biopriming*

Para comprobar el efecto fitoestimulante de los extractos acuosos en un ensayo *in vitro*, atendiendo al segundo de los objetivos del presente TFG, se llevó a cabo el estudio del efecto de los extractos de compost aplicados mediante *biopriming* sobre la germinación y crecimiento de semillas de pepino (*Cucumis sativa*) (variedad Ashley, BATLLE). En primer lugar, se

prepararon matrices de alginato sódico (Sigma-Aldrich) al 0,5%, en esterilidad (Caro, 2019), y se les añadió 1 mL del extracto correspondiente, para conseguir una dilución 1/10. Por tanto, se obtuvieron formulaciones con una concentración de extracto de compost de un 10%. También se realizaron dos matrices control: una con alginato sódico (sin extracto de compost) y otra solo con agua destilada. Posteriormente, se llevó a cabo la imbibición de las semillas mediante su contacto con las matrices durante 30 min. Las semillas embebidas se dispusieron en placas de Petri a razón de 25 semillas por placa equidistantes, sobre un papel de filtro humectado con 2 mL de agua destilada estéril, para propiciar unas condiciones idóneas de humedad. En total, se usaron 100 semillas (4 placas) para cada extracto. Las placas se incubaron a 25 °C en oscuridad durante 3 días. A continuación, en la Figura 5, se muestra un esquema detallado del proceso.



**Figura 5.** Esquema del procedimiento seguido para el ensayo *in vitro* de comprobación del efecto fitoestimulante de los extractos acuosos de compost mediante la técnica de *bioprimería*.

Tras la incubación, se añadió alcohol a las placas para paralizar el crecimiento de las semillas germinadas y se hicieron medidas de la longitud de la raíz, así como del número de semillas germinadas en cada placa para realizar el cálculo del índice de germinación (IG) mediante la siguiente fórmula (Zucconi et al., 1981):

$$\text{Índice de Germinación (IG), \%} = \frac{G_T * L_T}{G_C * L_C}$$

Donde:

GT es la media del número de semillas germinadas tras el tratamiento.

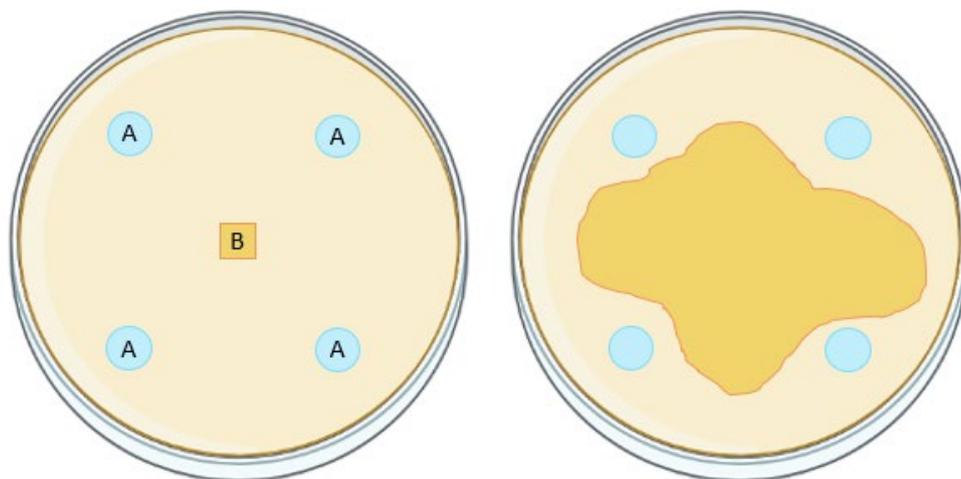
LT es la media de la longitud de la raíz (mm) tras el tratamiento.

GC es la media del número de semillas germinadas en el control con agua destilada estéril.

LC es la media de la longitud de la radícula (mm) en el control con agua destilada estéril.

### 3.3.2. Enfrentamiento dual de los extractos de compost frente a *Rhizoctonia solani*

El ensayo de antagonismo de los extractos frente a *Rhizoctonia solani* se llevó a cabo mediante el ensayo de difusión en placa con medio de cultivo bicapa con pocillos (Sánchez-San Fulgencio et al., 2018). Para la preparación de dicho medio se adicionaron las placas Petri con una fina base de agar-agua (AA) al 2% (p/v) a sobrefusión. Una vez solidificada, sobre ella se colocaron cuatro Torrecillas de Oxford estériles de acero inoxidable (8 mm de diámetro y 10 mm de altura), a una distancia de 10 mm del borde de la placa y equidistantes al centro de la misma. Posteriormente, se incorporó una segunda capa de medio a sobrefusión, en este caso PDA (en inglés "Potato Dextrose Agar", PanReac 413758.1210), que favorece el crecimiento del hongo fitopatógeno. El medio vertido en las placas Petri se dejó enfriar y solidificar, para poder retirar las torrecillas en condiciones de asepsia, quedando un pocillo en el medio de cultivo. Para realizar este ensayo, previamente se sembró *Rhizoctonia solani* como preinóculo en cultivo purso en placas de PDA y se incubó durante 72 horas a 30 °C. Este hongo fitopatógeno fue suministrado por la Colección Española de Cepas Tipo (CECT 2824) al grupo de investigación BIO-175 perteneciente al Área de Microbiología de la Universidad de Almería. Una vez que el micelio del hongo colonizó la superficie de la placa, con la ayuda de un sacabocados estéril, se depositó un *plug* de la parte más externa del crecimiento radial y se colocó en el centro de la placa de PDA con pocillos. Para llevar a cabo el enfrentamiento, los extractos de compost se incorporaron a razón de 70 µL en cada uno de los pocillos del medio PDA + AA. Las placas se incubaron durante 72 horas a 30 °C y se determinó el diámetro de crecimiento del hongo en presencia de los extractos de compost, respecto a una placa control del hongo sin enfrentar. Se realizaron los enfrentamientos por triplicado. En la Figura 6 se muestra un esquema ejemplo del enfrentamiento dual.



**Figura 6.** Representación gráfica de la posición en la placa de Petri del hongo (B) y los extractos (A) para el enfrentamiento dual. A la derecha, ejemplo del crecimiento del hongo en el enfrentamiento.

Pasado el tiempo de incubación, se midió el diámetro de crecimiento del hongo sobre la placa con los extractos de compost y en las placas control. Con ello se determinó el porcentaje de inhibición I (%) mediante la siguiente fórmula (Landa et al., 1997):

$$I, \% = \frac{C_T - T}{C_T} * 100$$

Donde:

$C_T$  es la medida del diámetro del hongo fitopatógeno en la placa control, en mm.

T es la medida del diámetro del hongo fitopatógeno en la placa sometida al enfrentamiento, en mm.

### 3.4. Ensayos *in vivo*

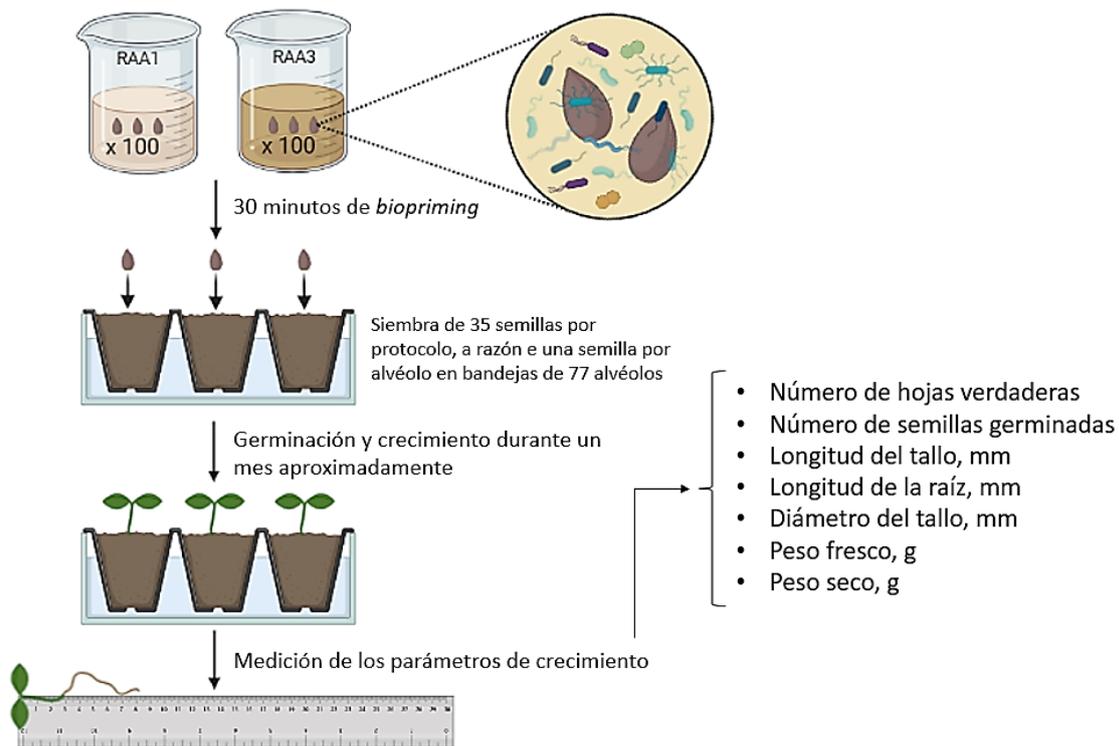
#### 3.4.1. Efecto fitoestimulante de los extractos de compost mediante *biopriming*

En una primera parte, se realizó la técnica de *biopriming* en semillas de pepino, previamente descrita (apartado 3.3.1.). Las semillas se colocaron en alveolos, previamente rellenos en una proporción 3:1 de sustrato comercial y vermiculita, respectivamente, ambos estériles. Se sembraron 35 alveolos para cada bloque de tratamientos, es decir, por cada extracto de compost probado, así como para los dos controles descritos en el apartado 3.3.1., agua y alginato. Las semillas se mantuvieron unos días en oscuridad para favorecer la germinación. Tras ello, se sometieron a un fotoperiodo controlado de 12 h de luz y 12 h de oscuridad, a una temperatura de 25 °C, hasta alcanzar las primeras hojas verdaderas, es decir, aquellas hojas no cotiledonares, las cuales indican el fin del estadio de plántula. Las plántulas se sometieron a un riego periódico.

A continuación, para evaluar el efecto promotor del crecimiento vegetal de los extractos o fitoestimulante, se retiraron los cepellones con cada plántula de los alveolos, eliminando el sustrato adherido a las raíces. Después, se colocó cada plántula limpia sobre un papel de filtro para tomar las siguientes medidas (Santoro et al., 2011): diámetro del tallo (mm); longitud del tallo (mm); longitud de la raíz (mm); peso fresco (g); peso seco (g); y recuento de hojas verdaderas. Además, se realizó el cálculo de la relación raíz/tallo aplicando la siguiente fórmula:

$$Ratio \left( \frac{R}{T} \right) = \frac{Longitud\ de\ la\ raíz,\ mm}{Longitud\ del\ tallo,\ mm}$$

A continuación, en la Figura 7 se puede observar un esquema detallado del proceso:



**Figura 7.** Esquema detallado del procedimiento realizado en el ensayo de aplicación del *biopriming* de semillas *in vivo*.

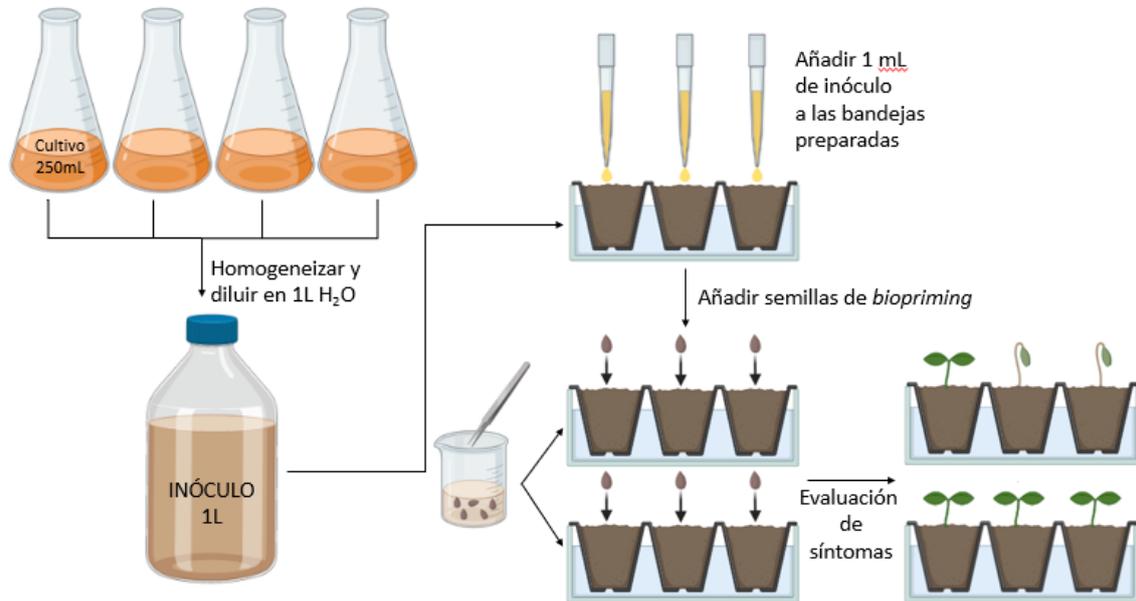
### 3.4.2. Efecto fitoprotector de los extractos de compost mediante *biopriming*

Este apartado corresponde al último de los objetivos planteados en el presente trabajo, relacionado con la evaluación del efecto bioprotector de los extractos *in vivo* aplicados mediante *biopriming*.

El procedimiento para este ensayo fue llevado a cabo en diferentes etapas. En la primera de ellas se cultivó el hongo fitopatógeno, *R. solani*, mediante su inoculación en 4 matraces Erlenmeyer con capacidad para 250 mL con 100 mL de medio líquido Potato Dextrose Broth (PDB) (Scharlan 02-483-500) cada uno. Los matraces inoculados se incubaron durante 12 días a 30 °C. Pasado el tiempo de incubación, se filtró el medio de cultivo sobre una muselina estéril colocada en un embudo, para recoger todo el micelio generado por el hongo. Esta biomasa se diluyó en 1 L de agua de grifo estéril y se homogeneizó en un *stomacher* (DATHAN Scientific), en condiciones de esterilidad. Se prepararon semilleros con sustrato estéril tal como se explicó en el apartado anterior (3.4.1.), donde se incorporaron semillas sometidas a *biopriming* con los extractos probados. En cada uno de los alveolos se inoculó con 1 mL de una dilución 1/10 de la mezcla homogénea del hongo fitopatógeno *Rhizoctonia solani*. De forma paralela, para conocer la carga microbiana del inóculo, se realizó un ensayo de viabilidad. Para ello, se hicieron diluciones seriadas en tubos Eppendorf con solución salina estéril (0,9%), desde la dilución  $10^{-1}$  del inóculo hasta la dilución  $10^{-5}$ . Tras esto, se sembraron por triplicado, 100  $\mu$ L de cada dilución en placas de Petri mediante el uso de bolitas de vidrio estériles (siembra en superficie). Las placas se incubaron a 30 °C durante 6 días y, posteriormente, se realizaron los recuentos de colonias para poder determinar la concentración microbiana, aplicando la siguiente fórmula:

$$\frac{UFC}{mL} = \frac{n^{\circ} \text{ de colonias}}{\text{volumen inoculado} * \text{dilución}}$$

Las condiciones de temperatura y luminosidad, así como el mantenimiento de las plántulas, fueron las mismas que se describieron en el apartado 3.4.1. En la Figura 8 se muestra un esquema detallado del proceso.



**Figura 8.** Esquema detallado del procedimiento seguido para la evaluación *in vivo* del potencial biopesticida.

En paralelo a este ensayo, para comprobar la persistencia de *Rhizoctonia solani* en interacción con las plántulas, en presencia y ausencia de extractos de compost, se tomaron semanalmente muestras de 1g procedentes de los sustratos infectados mediante el uso de una espátula pequeña. Cada muestra se suspendió en 9 mL de agua destilada estéril (dilución 1/10) y se mantuvo en agitación a 200 rpm durante 60 min en un agitador RSLAB-7PRO. Posteriormente, a partir de dicha suspensión, se realizaron diluciones decimales seriadas hasta llegar a 10<sup>-5</sup> y se sembraron 100 µL de cada una en placas de Petri con PDA y RB (Rosa de Bengala) (PanReac 414855.1210). Se dejaron incubar durante 5 días a 30 °C y, pasado ese tiempo, se hizo un recuento para comprobar la concentración de hongos totales, así como específicamente de *Rhizoctonia solani* (utilizando la misma fórmula de recuento –ufc/mL- que en la primera etapa de este ensayo).

Cuando las semillas alcanzaron el estado de plántulas, se aplicó de nuevo el protocolo modificado de Santoro et al. (2011) para la medida de algunos de los parámetros previamente mencionados más interesantes para este ensayo de supresividad *in vivo*, como son: longitud del tallo (mm) y longitud de la raíz (mm), con objeto de obtener el ratio raíz/tallo. En este caso, además, se llevó a cabo un análisis cualitativo de los síntomas de la enfermedad *Damping off* causada por *Rhizoctonia solani*.siguiendo la siguiente escala de valores:

- 0) Ningún síntoma
- 1) Del 1 al 50% decoloración en la raíz o más de una hoja amarillenta

- 2) Del 51 al 75% decoloración en la raíz o en el sistema vascular y hoja marchita
- 3) Más del 76% decoloración en la raíz o en el sistema vascular y más de una hoja marchita
- 4) Planta completamente muerta

### **3.5. Análisis de datos y estadístico.**

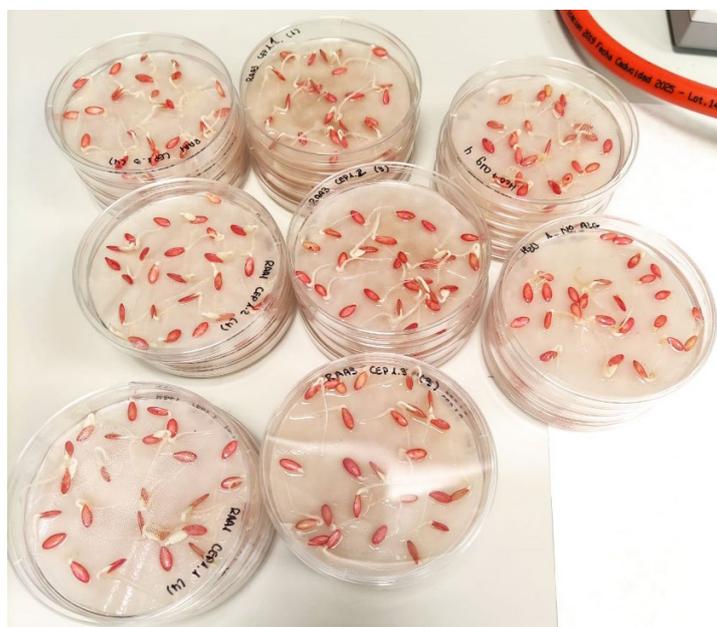
Todos los resultados obtenidos fueron procesados en Microsoft Office Excel 365 para Windows, así como la obtención de las gráficas correspondientes al análisis. Por otra parte, con el programa Statgraphics Centurion XVIII se hizo un Análisis Factorial de Varianza (ANOVA Simple) para comparar los grupos de homogeneidad y diferencias significativas entre las medias mediante el Test de Mínima Diferencia de Fisher (LSD), utilizando un intervalo de confianza del 95% ( $p < 0,05$ ). Además, algunas representaciones gráficas se elaboraron con el programa BioRender.

## 4. Resultados y discusión

Los resultados del presente trabajo se dividen en dos bloques principales. El primero de ellos corresponde al estudio *in vitro*, tanto del efecto promotor del crecimiento vegetal de los extractos acuosos de compost, obtenidos a partir de los cuatro protocolos de extracción, aplicados mediante *biopriming* en semillas de pepino, así como el efecto antagonista de dichos extractos sobre el hongo fitopatógeno *Rhizoctonia solani*. El segundo bloque corresponde a la extrapolación a escala *in vivo* de sendos efectos, fitoestimulante y biopesticida, de los extractos de compost en semillas de pepino sometidas a *biopriming*.

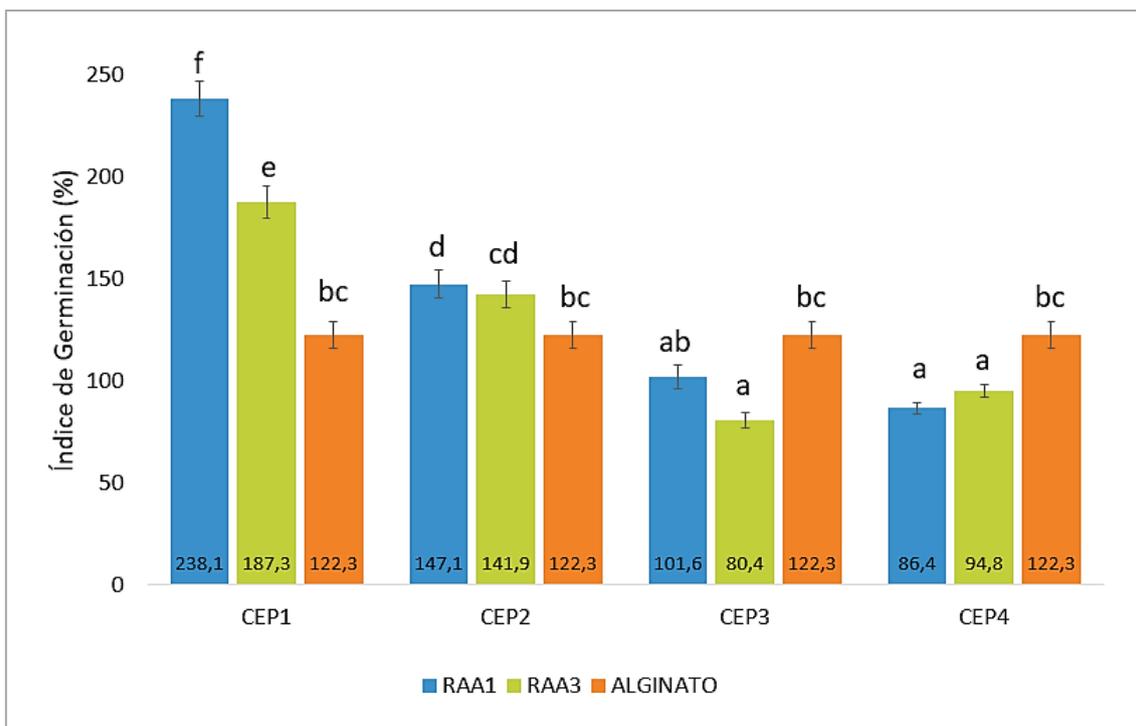
### 4.1. Evaluación *in vitro* del efecto fitoestimulante de los extractos de compost mediante la técnica de *biopriming*.

En este apartado se presentan los resultados procedentes del ensayo descrito en la sección de metodología (3.3.1) del presente trabajo, relativos a la comprobación *in vitro* del efecto fitoestimulante (o fitotóxico) de diferentes tipos de extractos de compost aplicados en semillas de pepino. En la Figura 9 se muestra cómo se observan las semillas de pepino con la cubierta de alginato y extracto, tras el periodo de incubación correspondiente, a partir de las cuales se hace el recuento de semillas germinadas y la medida de longitud de la radícula.



**Figura 9.** Imagen de semillas de pepino sometidas a biopriming para el ensayo de índice de Germinación *in vitro*.

Tras la aplicación de los diferentes extractos acuosos de compost a los diferentes lotes de semillas de pepino mediante *biopriming*, se obtuvieron los resultados que pueden observarse en la Figura 10.



**Figura 10.** Porcentaje de Índice de Germinación de los distintos extractos acuosos (CEP1, CEP2 CEP3 y CEP4) elaborados con las dos muestras de compost, RAA1 y RAA3, más alginato aplicados sobre semillas de pepino mediante la técnica de *biopriming*, así como resultados comparativos solo empleando *priming* de alginato. Letras distintas indican valores significativamente diferentes según el test de mínima diferencia significativa de Fisher (LSD) en  $P < 0,05$ .

Según la clasificación estipulada por Zucconi (1981), que llevó a cabo a partir de estudios en la planta modelo *Arabidopsis thaliana*, se considera que existe un efecto promotor del crecimiento vegetal cuando se supera el 100% de índice de Germinación (IG), mientras que un valor fitotóxico se encuentra por debajo del 80%. Un valor entre el 80-100% indica que el tratamiento no resulta tóxico, aunque tampoco fitoestimulante. En el presente trabajo, este ensayo *in vitro* puso de manifiesto que todos los extractos de compost aplicados mediante biopriming en semillas de pepino, tanto los elaborados a partir de la muestra RAA1 como con RAA3, presentaron valores de IG por encima de 80%. Estos resultados indican ausencia de toxicidad, es decir, ninguno de los tratamientos ensayados afectó negativamente a la germinación e incluso, cabe destacar que, en la mayor parte de los casos los tratamientos se pueden considerar promotores del crecimiento vegetal con valores muy por encima del 100% de IG (Figura 10).

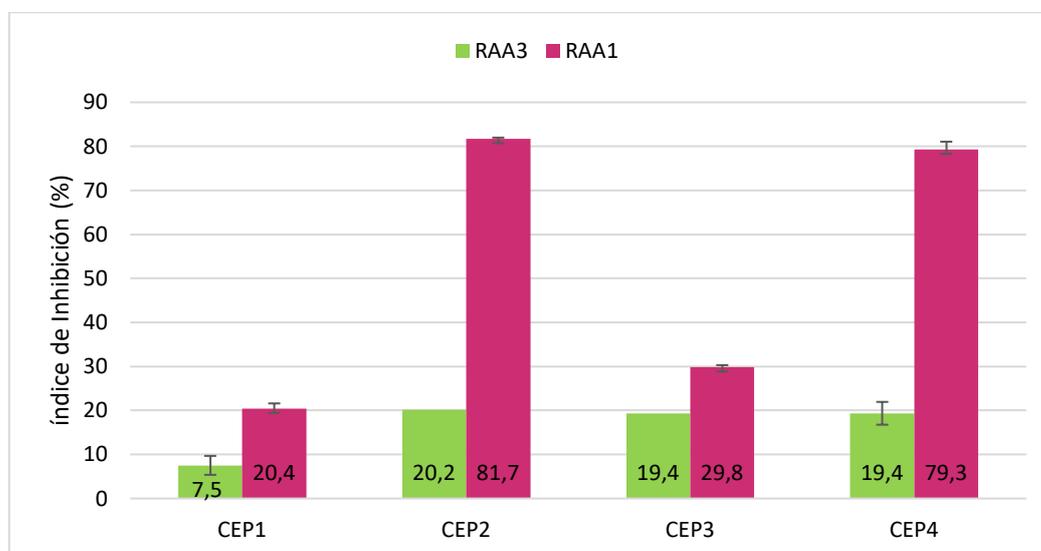
Atendiendo a los valores medios y a los distintos grupos de homogeneidad (Figura 10), se puede deducir que los extractos acuosos obtenidos mediante el protocolo CEP1, elaborados en base a ambas materias primas –RAA1 y RAA3–, y el protocolo CEP2 procedente del compost RAA1, mostraron los valores promedio de IG más altos, además significativamente diferentes (y superiores) a los valores mostrados por las semillas con cobertura solo de alginato. Se tienen en cuenta los valores de IG de alginato, para comparar las muestras estudiadas, ya que esta matriz, por sí misma, presenta propiedades fitoestimulantes (Reddy, 2013), puesto que favorece la retención de agua y un bajo potencial osmótico, así como una buena oxigenación durante la hidratación (Sher et al., 2019). Por su parte, los extractos obtenidos con los protocolos CEP3 y

CEP4 mostraron la tendencia opuesta, es decir, los resultados más bajos de IG, en general y respecto al alginato.

Teniendo en cuenta que en los ensayos *in vitro* ninguno de los extractos resultó fitotóxico, a priori no se descartó comprobar el funcionamiento de todas las combinaciones de compost y tipo de extracción *in vivo*.

#### 4.2. Evaluación *in vitro* del enfrentamiento dual de los extractos procedentes de compost frente a *Rhizoctonia solani*.

En la primera fase del estudio de la capacidad biopesticida de los extractos de compost, se hizo un ensayo *in vitro* para comprobar qué tipo de extractos, de entre los extractos acuosos obtenidos a partir de los dos tipos de compost y mediante los cuatro protocolos de extracción, presentaban una mayor supresividad, expresada como índice de inhibición (I, %), frente a *R. solani*. En la Figura 11 se presentan los resultados obtenidos tras dicho experimento.



**Figura 11.** Porcentaje de inhibición (I, %) mostrado por los distintos extractos acuosos (CEP1, CEP2, CEP3 y CEP4) elaborados con las dos muestras de compost, RAA1 y RAA3, frente al hongo fitopatógeno *Rhizoctonia solani*.

De forma general, en la Figura 11 se observa que los extractos acuosos obtenidos a partir de RAA1 presentaron mejores resultados de inhibición frente al hongo fitopatógeno que los obtenidos a partir de RAA3. Algunos trabajos destacan como porcentajes de inhibición iguales o superiores al 20% suficientes para considerar a un microorganismo antagonista frente a un fitopatógeno (Suárez-Estrella et al., 2013). Esto corrobora que los extractos procedentes de las muestras de compost RAA1 funcionaron mejor que las de RAA3, en global, sin tener en cuenta el tipo de extracción, destacando, con diferencia, RAA1-CEP2 y RAA1-CEP4, con valores en torno a un 80% de inhibición. Estos resultados coinciden con los mostrados en otros trabajos donde se ensayó *in vitro* el potencial antagonista de determinados microorganismos, *Trichoderma viride*, *Trichoderma harzianum*, *Aspergillus niger*, *Bacillus subtilis* y *Penicillium spp.* frente a *R. solani*, alcanzando valores de inhibición de entorno al 70%, 67%, 57%, 50% y 44%,

respectivamente (Seema y Devaki, 2012). Este tipo de microorganismos, por su parte, coincide con especies y géneros típicamente asociados a procesos de compostaje y cuya microbiota ha sido señalada como efectiva frente a *R. solani* y otros agentes fitopatógenos asociados al desarrollo de la enfermedad de *Damping-off*, como *Fusarium oxysporum* o *Pythium ultimum*, según otros autores (Suárez-Estrella et al., 2013). No obstante, actualmente sigue habiendo pocos estudios llevados a cabo directamente con téis o extractos de compost y su papel en fitopatología como supresores de patógenos y de enfermedades de plantas *in vitro* e *in vivo* a pequeña escala, bajo unas condiciones ambientales controladas (Martin, 2014).

A la luz de los resultados mostrados, se decidió seleccionar los extractos acuosos obtenidos a partir del compost RAA1 mediante los cuatro protocolos de extracción para comprobar *in vivo* el efecto biopesticida, mediante biopriming de semillas de pepino.

#### 4.3. Evaluación *in vivo* del efecto fitoestimulante de los extractos acuosos de compost mediante la técnica de *biopriming*.

El siguiente bloque de resultados se corresponde con el apartado 3.4.1 de Materiales y Métodos del presente trabajo. En este ensayo se trató de comprobar *in vivo* la capacidad fitoestimulante de los extractos acuosos de compost mediante la aplicación de *biopriming* en semillas de pepino. En la Figura 12 se muestra un ejemplo visual de resultados obtenidos tras el cultivo de las plántulas.



**Figura 12.** Plántulas procedentes de semillas de pepino sometidas a ensayo de biopriming *in vivo*. Se muestra a la izquierda RAA3-CEP3 y a la derecha las plántulas del control (embebidas solo en agua).

Visualmente, se aprecia la mejora de las plántulas tratadas mediante biopriming con RAA3-CEP3, respecto a las plántulas control, especialmente en cuanto a la densidad y longitud de la raíz.

En la Tabla 1 se muestra la recopilación de todos los resultados obtenidos tras el estudio *in vivo* de la capacidad fitoestimulante de los diferentes tratamientos ensayados, mediante el análisis de los siguientes parámetros: número de hojas, longitud del tallo, longitud de raíz, ratio raíz/tallo, peso fresco, peso seco y diámetro del tallo.

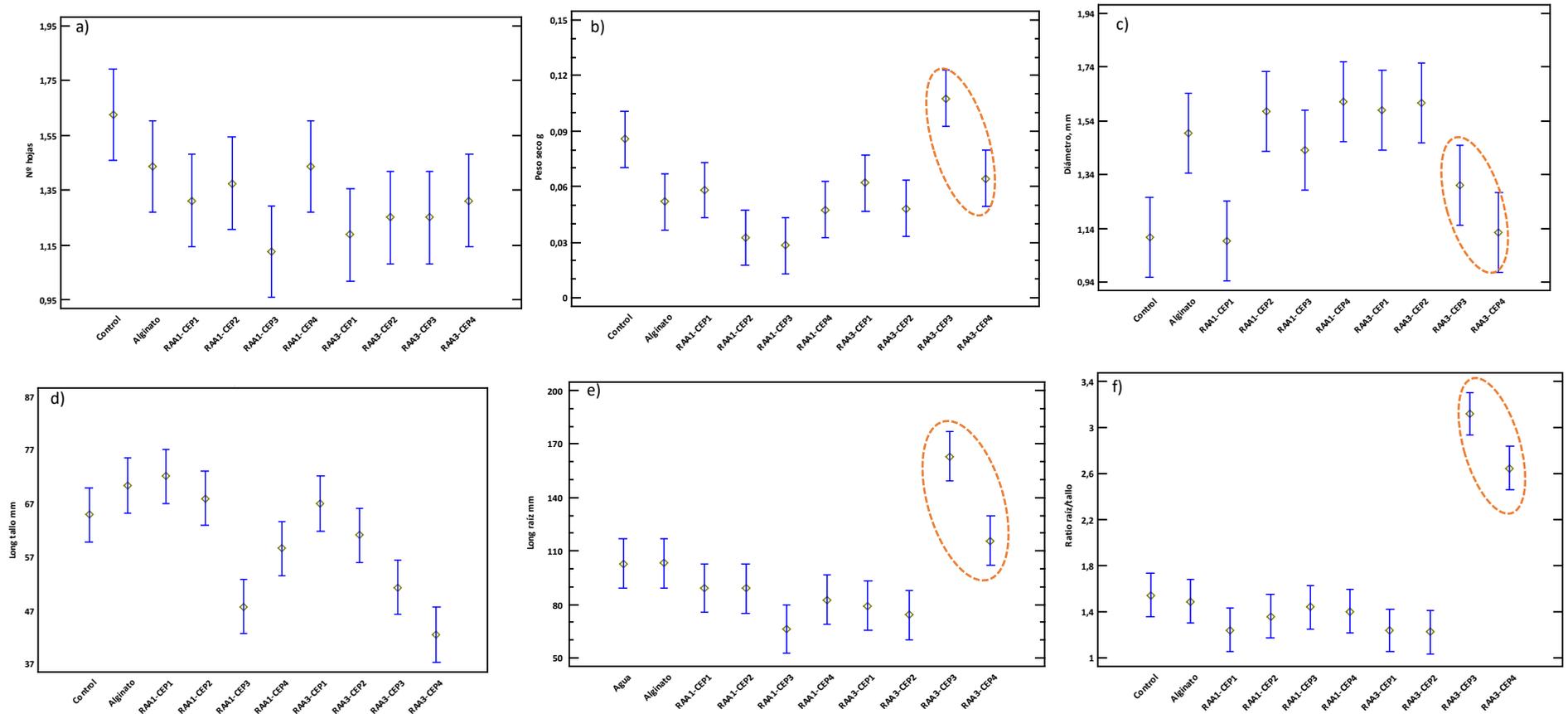
**Tabla 1.** Resultados del tratamiento *in vivo* de *biopriming* realizado sobre semillas de pepino con los distintos extractos acuosos (CEP1, CEP2 CEP3 y CEP4) procedentes de las muestras de compost RAA1 y RAA3. En rojo: grupos que muestran diferencias significativas respecto al control de agua. Distintas letras denotan la existencia de diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).

Tratamiento	Nº hojas	Long tallo mm	Long raíz mm	Ratio raíz/tallo	Peso fresco g	Peso seco g	Diámetro mm
CONTROL	1,63 b	64,81 cde	103 bc	1,55 a	0,39 ab	0,09 de	1,11 a
ALGINATO	1,44 ab	70,31 de	103,31 bc	1,49 a	0,38 ab	0,05 abc	1,49 bc
RAA1 CEP1	1,31 ab	72,06 e	89,19 abc	1,24 a	0,34 a	0,06 abcd	1,09 a
RAA1 CEP2	1,38 ab	67,88 cde	88,94 abc	1,36 a	0,35 ab	0,03 ab	1,58 bc
RAA1 CEP3	1,13 a	47,69 a	66,25 a	1,44 a	0,29 a	0,03 a	1,43 bc
RAA1 CEP4	1,44 ab	58,56 bc	82,56 ab	1,40 a	0,39 ab	0,05 abc	1,61 c
RAA3 CEP1	1,19 a	66,94 cde	79,44 ab	1,24 a	0,39 ab	0,06 bcd	1,58 bc
RAA3 CEP2	1,25 a	61 bcd	74,25 a	1,3 a	0,38 b	0,05 abc	1,61 c
RAA3 CEP3	1,25 a	51,25 ab	163,13 d	3,12 c	0,48 ab	0,11 e	1,30 ab
RAA3 CEP4	1,31 ab	42,44 a	115,88 c	2,65 b	0,32 a	0,06 cd	1,13 a

No se observaron diferencias significativas respecto al control en el peso fresco de las plántulas, por lo que este parámetro no permitió discernir entre tratamientos. Sin embargo, sí se observaron diferencias en el resto que ayudaron a establecer, a su vez, las disparidades o similitudes existentes entre los distintos extractos acuosos probados, como se muestra en la Figura 13, donde aparecen representados los diagramas de Fisher correspondientes a los valores medios de cada tratamiento, así como el bloque de plantas evaluadas tras someterse solo a *priming* de alginato y un bloque correspondiente al control de agua, en relación con el resto de variables analizadas y recogidas en la tabla anterior (Tabla 1) donde destacan diferencias significativas, esto es, número de hojas, peso seco (g), diámetro de tallo (mm), longitud de tallo (mm), longitud de raíz (mm) y ratio raíz/tallo.

En la gráfica destacan los tratamientos RAA3-CEP3 y RAA3-CEP4 con los mayores valores del ratio raíz/tallo, así como respecto a la longitud de la raíz, ambos significativamente diferentes al control de agua y al tratamiento solo con alginato. Paralelamente, se observa como estos dos extractos acuosos presentan valores altos de peso seco y bajos en cuanto a la medida del diámetro del tallo, aunque sin significancia estadística respecto al control.

Los comportamientos observados, respecto a la mejora en el crecimiento de una u otra parte de la plántula, tras ser sometidas a la presencia de microorganismos, en este caso mediante la inmersión en extractos no estériles de compost, podría deberse al tipo de microorganismo presente y/o al tipo de sustancia procedente de dichos microorganismos, extraída al llevarse a cabo los diferentes protocolos empleados. En este caso, los extractos elaborados con las muestras de compost RAA3 y los protocolos 3 y 4 (CEP3 y CEP4), mostraron resultados significativos y satisfactorios para uno de los parámetros de mayor importancia respecto a la promoción del crecimiento vegetal: el ratio raíz/tallo.



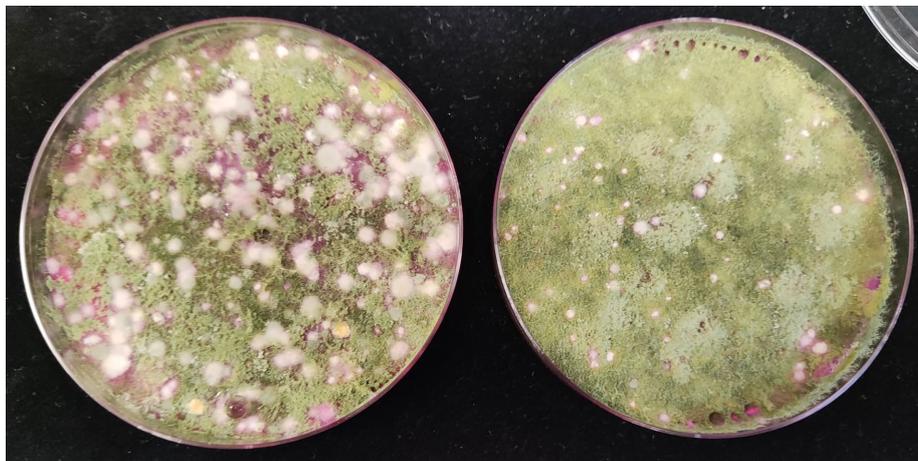
**Figura 13.** Diagramas de Fisher donde se analizan las distintas variables estudiadas en función de los tratamientos aplicados mediante *biopriming* (tipos de extracción, CEP1, CEP2, CEP3 y CEP4; compost, RAA1 y RAA3), así como teniendo en cuenta el *priming* de alginato y el control de agua. Variables analizadas: a) Número de hojas, b) peso seco (g), c) diámetro de tallo (mm), d) longitud de tallo (mm), e) longitud de raíz (mm), f) ratio raíz/tallo.

El aumento de la superficie del sistema radicular de la planta toma gran importancia debido al modo de acción de los microorganismos considerados PGPR, que causan este cambio en la morfología de la radícula. En la mayoría de los casos, estos cambios están asociados a la producción de fitohormonas que afectan a los patrones de crecimiento en las raíces originando mayor superficie y ramificación en las mismas (Vessey, 2003). Estudios similares se han llevado a cabo anteriormente, como es el caso de Zhang et al. (2007), en el cual se inoculó *Arabidopsis thaliana* con una cepa de *Bacillus subtilis* productora de auxinas, de forma que la bacteria aumentó su producción de auxinas originando un aumento en la concentración de esta fitohormona en los primordios laterales de la radícula. De esta manera, aumentó el desarrollo radicular, lo cual contribuyó a una absorción de agua y extracción de nutrientes del suelo más efectivas. Así, la relación raíz/tallo, como se mencionó anteriormente, es un parámetro interesante de estudiar en este caso porque un buen sistema radicular es indicativo de una mayor absorción de nutrientes y un mejor establecimiento del cultivo en el sustrato, además de que los microorganismos presentes en la solución de *biopriming* se establecen en el sustrato, en contacto con la raíz (Ajeng et al., 2020). Por esta razón, se presta especial atención a dicha variable en este ensayo, cuyos resultados aparecen representados en la Figura 13.

#### 4.4. Evaluación *in vivo* del efecto biopesticida de los extractos acuosos de compost mediante *biopriming*.

Esta última parte está relacionada con la metodología expuesta en el apartado 3.4.2 del presente trabajo. El objetivo de estos ensayos fue comprobar *in vivo* el efecto supresivo de los extractos acuosos de compost que previamente habían mostrado *in vitro* un elevado efecto biopesticida frente a *Rhizoctonia solani*, un patógeno de suelo que causa la enfermedad *damping-off*, pero, en este caso, aplicados como tratamientos preventivos de semillas mediante la técnica de *biopriming*.

Durante el desarrollo del ensayo *in vivo*, se tomaron muestras periódicas del sustrato o suelo de las plántulas de pepino para comprobar la viabilidad del patógeno en el suelo tras la infección. Se comprobó visualmente la persistencia de *Rhizoctonia solani* en el sustrato (Figura 14).



**Figura 14.** Medio RB sembrado con muestras de sustrato provenientes del ensayo del carácter biopesticida *in vivo* de los extractos de compost. A la izquierda la placa inoculada con sustrato infectado por *R. solani* y a la derecha la placa control, sin patógeno.

Como se puede observar, existió una mayor proliferación de colonias con una morfología típicamente asociada al hongo fitopatógeno (colonias blancas) en las muestras de sustrato inoculadas con el patógeno (Figura 14, izquierda) frente a la placa sembrada con una muestra del suelo control (Figura 14, derecha), donde se percibe una mayor ocupación del sustrato por hongos típicos de este tipo de materiales orgánicos, como aquellos pertenecientes al género *Trichoderma* (colonias verdes). Estos resultados revelan que el hongo mantenía su viabilidad en suelo.

En la Figura 15 se muestra una comparativa del desarrollo de las plántulas de pepino sometidas a la técnica de *biopriming* con los extractos de compost y sembradas en sustrato infectado con *R. solani*. Se puede observar la evolución del crecimiento de las plántulas pretratadas mediante *biopriming* en el estado de semillas, con el extracto de RAA1 obtenido con el protocolo CEP3 en la imagen de la izquierda, donde se aprecian plantas que apenas presentaron síntomas de la enfermedad *damping-off*; mientras que las plantas de la imagen de la derecha, pertenecientes a un control del patógeno, presentaron síntomas típicos de la enfermedad como el decaimiento que se aprecia en algunas de las plántulas.



**Figura 15.** Plántulas crecidas sobre suelo infectado con el fitopatógeno *R. solani* tras ser sometidas a un pretratamiento con *biopriming* (izquierda) y en control solo con el patógeno (derecha).

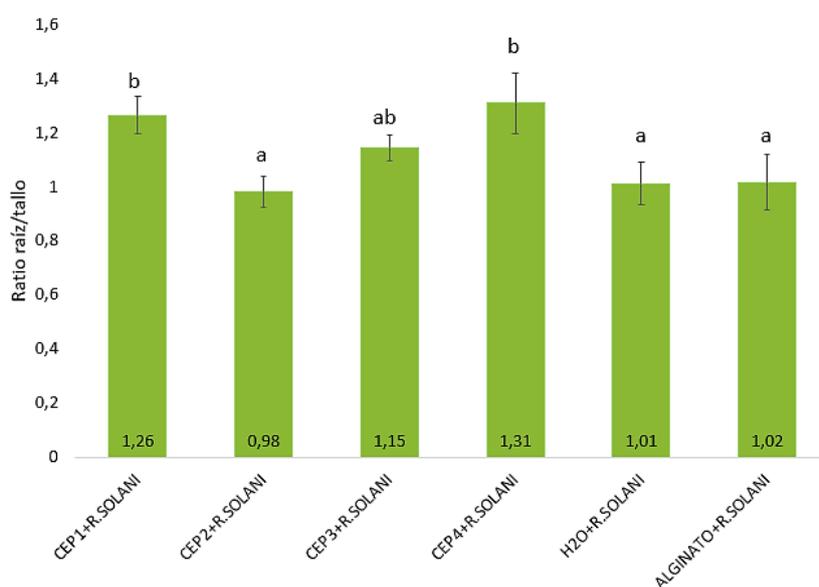
Tras haber hecho la recolección de las plántulas, y un análisis de los datos obtenidos según el protocolo modificado de Santoro et al. (2011), se obtuvieron diferentes resultados de interés. En primer lugar, cabe destacar el mayor vigor del sistema radicular patente directamente de manera visual en aquellas plantas que fueron sometidas a *biopriming* con los diferentes extractos acuosos de compost (Figura 16a), donde además es notable la mejora general de los vegetales, lo que incide en el efecto fitoestimulante de la técnica de *biopriming*, en general, previamente estudiada (ver apartados 4.1. y 4.3.) (Figura 16a y b).



**Figura 16.** Fotografía comparativa entre las raíces de plántulas pretratadas (a) y no tratadas (b) mediante biopriming.

Este último bloque de resultados se basa en el estudio *in vivo* del efecto biopesticida de los cuatro tipos de extractos de compost de RAA1, que mostraron los mejores resultados frente a *Rhizoctonia solani in vitro*. Para ello, se evaluó el ratio raíz/tallo por su relación con la fortaleza del vegetal al contacto con el sustrato, hábitat del hongo fitopatógeno del suelo *R. solani*.

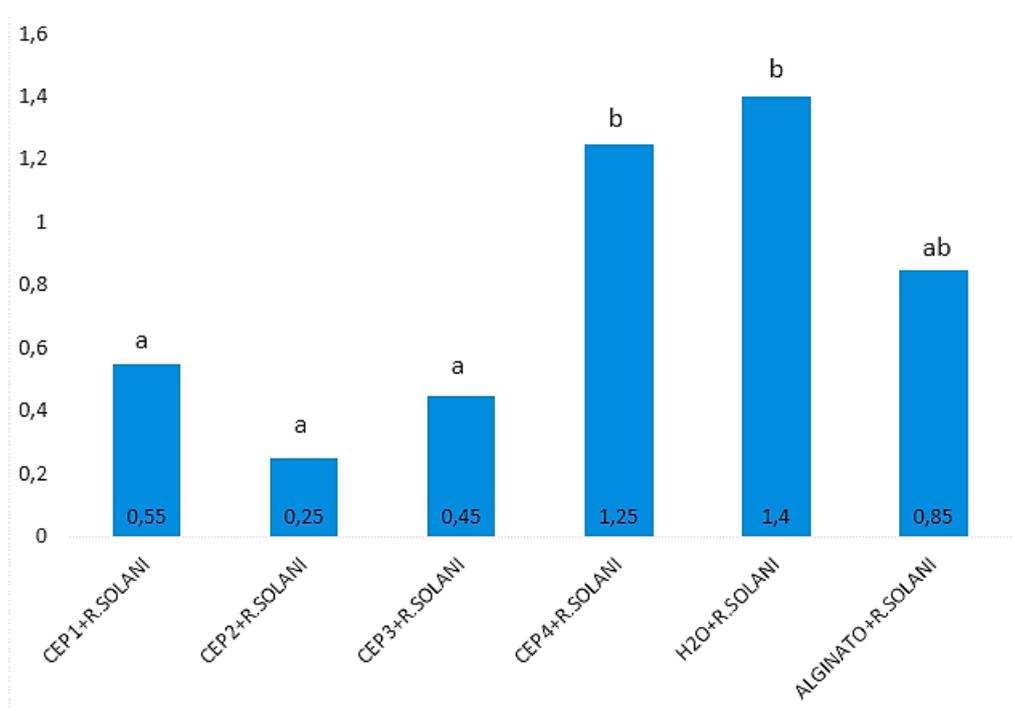
En la Figura 17 se recogen los datos correspondientes al ratio raíz/tallo presentado por las plántulas sometidas a *biopriming* con los extractos de RAA1 obtenidos mediante los cuatro protocolos de extracción, y aquellos correspondientes a las plántulas control, es decir, con el tratamiento de biopriming solo con alginato o simplemente embebidas en agua. Todas las plántulas fueron infectadas con *R. solani* cuando alcanzaron el estado de plántula. Se comparó el ratio raíz/tallo de las plantas embebidas en cada extracto acuoso con aquellas embebidas en alginato y/o agua.



**Figura 17.** Ratio raíz/tallo de las plántulas sometidas a *biopriming* de manera preventiva en el estado de semilla con los extractos de RAA1, obtenidos mediante los cuatro protocolos de extracción (CEP1, CEP2, CEP3 y CEP4) e incorporadas en sustratos infectados con *Rhizoctonia solani*.

Teniendo en cuenta los valores promedio obtenidos para cada bloque de tratamientos, se deduce que el *biopriming* con RAA1-CEP4 favoreció vigor de las raíces, mostrando los mayores valores junto con RAA1-CEP1, según las diferencias significativas demostradas mediante un análisis estadístico de variable. De esta forma, se deduce que ambos protocolos (CEP1 y CEP4) aplicados sobre el compost de la muestra RAA1, promueven un mayor establecimiento del sistema radicular en el sustrato, en base a los mismos principios utilizados en el apartado 4.3. del presente trabajo.

Además del parámetro de producción vegetal previamente analizado, en este ensayo se tuvo en cuenta el desarrollo de los síntomas de la enfermedad *Damping-off* asociada al fitopatógeno objeto de estudio. En la Figura 18 se muestran los valores promedio de la escala de valores asociada a los síntomas esperados de la enfermedad, tal como se describe en la metodología (aparatado 3.4.2.).



**Figura 18.** Resultados obtenidos en el ensayo *in vivo* para la visualización de síntomas causados por *Rhizoctonia solani* para los lotes que fueron inoculados con el patógeno.

A la luz de los resultados obtenidos en cuanto a presencia de síntomas de *Damping-off* en las plántulas, se pueden resaltar varios aspectos. El primero de ellos es que el grupo control (H2O+R.SOLANI en la Figura 18) es el que presentó una mayor afectación por la enfermedad. Por tanto, se puede afirmar, con carácter general, que la aplicación de los extractos mediante la técnica de *biopriming* a las semillas tiene un efecto positivo, en mayor o menor medida, para combatir el efecto de *R. solani*. Por otra parte, prestando atención a las diferencias significativas entre las medias obtenidas para la repercusión de la enfermedad en cada una de las aplicaciones, destacan los extractos RAA1-CEP1, RAA2-CEP2 y RAA3-CEP3. Estos lotes son los que menos afectados se ven por el patógeno y los que menor número de síntomas de presentan. Por su parte, las semillas embebidas en el extracto RAA1-CEP4, a pesar de presentar un sistema

radicular consistente (Figura 17), la visualización de síntomas de la parte aérea mostró un alto grado de decaimiento, con una incidencia similar a las semillas sometidas a priming con alginato y a las semillas sin tratar (control). Además, cabe destacar que el lote que mayor efectividad presentó en cuanto a la superación de los síntomas causados por el fitopatógeno fue el sometido al pretratamiento con RAA1-CEP2 (CEP2+R.SOLANI en la Figura 18). Estos resultados *in vivo*, corroboran los resultados obtenidos para el ensayo de Inhibición *in vitro* mediante enfrentamientos duales, representado en el apartado 4.2. del presente trabajo.

Por ello, se puede deducir que la muestra RAA1-CEP2 aplicada en la cubierta de semillas mediante la técnica de *biopriming* se sitúa como una candidata efectiva para ser empleada como herramienta de control biológico en suelos con incidencia de enfermedad provocada por el agente fitopatógeno *Rhizoctonia solani* y, por tanto, resulta de gran interés para su aplicación *in vivo* en el ámbito de la agrobiotecnología.

## 5. Conclusiones

En base a los resultados descritos en el presente trabajo, se extrajeron las siguientes conclusiones:

1. La elaboración de los extractos procedentes de compost de residuos agroalimentarios brinda una oportunidad para tener una alternativa de aplicación efectiva desde el punto de vista agronómico. Se ha comprobado que dichos extractos presentan potencial biotecnológico en este ámbito y mantienen su viabilidad tras su aplicación mediante la técnica de *biopriming*.
2. Los extractos acuosos procedentes de compost de residuos agroalimentarios aplicados mediante la técnica de *biopriming* pueden emplearse como herramienta agrobiotecnológica, ya que no aportan toxicidad en su interacción con las semillas de pepino ensayadas.
3. Los extractos acuosos procedentes del compost de residuos agroalimentarios funcionan como herramienta de control biológico, destacando el tratamiento RAA1-CEP2 por sus altos valores de inhibición sobre el patógeno estudiado (*R. solani*) tanto *in vivo* como *in vitro*.
4. La técnica de *biopriming* realizada con los extractos acuosos de compost funciona como promotor del crecimiento vegetal, destacando el tratamiento RAA3-CEP3 que alcanzó los mejores valores de producción vegetal.

## Financiación

Este trabajo ha sido financiado a través del Proyecto Puente del Plan Propio de Investigación y Transferencia 2022 de la Universidad de Almería (PID2020-118402RB-I00).

## 6. Bibliografía

- Ajeng, A. A., Abdullah, R., Ling, T. C., Ismail, S., Lau, B. F., Ong, H. C., Chew, K. W., Show, P. L., Chang, J. S., 2020. Bioformulation of biochar as a potential inoculant carrier for sustainable agriculture. *Environmental Technology and Innovation*, 20, 101168.
- Armenta-Bojórquez, A. D., García-Gutiérrez, C., Camacho-Báez, J. R., Apodaca-Sánchez, M. Á., Gerardo-Montoya, L., Nava-Pérez, E., 2010. Biofertilizantes en el Desarrollo Agrícola de México. *Ra Ximhai*, 6(1), 51-56.
- Ashraf, M., Foolad, M. R., 2005. Pre-sowing seed treatment—A shotgun approach to improve germination, plant growth, and crop yield under saline and non-saline conditions. *Advances in Agronomy*, 88, 223-271.
- Bernal-Vicente, A., Ros, M., Tittarelli, F., Intrigliolo, F., Pascual, J. A., 2008. Citrus compost and its water extract for cultivation of melon plants in greenhouse nurseries. Evaluation of nutriactive and biocontrol effects. *Bioresource Technology*, 99(18), 8722-8728.
- Bhattacharya, P. N., Jha, D. K., 2012. Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): emergence in agriculture. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 28, 1327-1350.
- BOE n. 181 de 29-07-11. Ley Orgánica 22/2011, del 28 de julio, de residuos y suelos contaminados, *Boletín Oficial del Estado*, 181, del 29 de julio de 2011, 1 a 57. Obtenido de: <https://www.boe.es/buscar/act.php?id=BOE-A-2011-13046>. (Consultado 12/02/22).
- Bruce, T. J., Matthes, M. C., Napier, J. A., Pichett, J. A., 2007. Stressful "memories" of plants: Evidence an possible mechanisms. *Plant Science*, 173, 603-608.
- Caro, R., 2019 Promoción del crecimiento vegetal mediante recubrimiento de semillas (*biopriming*) con actinobacterias. Trabajo Fin de Grado. Universidad de Almería. Almería, España.
- Chennappa, G., Naik, M. K., Udaykumar, N., Vidya, M., Sreenivasa, M. Y., Amaresh, Y. S., Mathad, P. F., 2019. Plant growth promoting microbes: a future trend for environmental sustainability. En: *New and future depelovements in Microbial Biotechnology and Bioengineering* (págs. 163-178). Elsevier .
- Chynoweth, D. P., Owens, J. M., Legrand, R., 2001. Renewable methane from anaerobic digestion of biomass. *Elsevier Science Ltd.*, 22, 1-8.
- Copping, L. G., Menn, J. J., 2000. Biopesticides: a review of their action, applications and efficacy. *Pest Management Science*, 56, 651-676.
- Dearborn, Y., 2011. *Compost Tea: Literature review on production, application and plant disease management*. San Francisco Department of Environment.

- Demirel, B., Scherer, P., 2008. The roles of acetotrophic and hydrogenotrophic methanogens during anaerobic conversion of biomass to methane: a review. *Reviews in Environmental Science and Biotechnology*, 7, 173-190.
- EEA (European Environmental Agency), 2020. *Bio-Waste in Europe — turning challenges into opportunities*. EEA Report 04/2020. URL: <https://www.eea.europa.eu/publications/bio-waste-in-europe>. (Consultado 30/05/22).
- Epstein, E., 1997. *The Science of Composting* (1st ed.). CRC Press.
- García, C., 1984. *Abonos orgánicos: Catálogo general de productos* (Vol. IV). Madrid: Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, Dirección General de la Producción Agraria.
- González-Sánchez, M. E., Pérez-Fabiel, S., Wong-Villareal, A., Bello-Mendoza, R., Yañez-Ocampo, G., 2015. Residuos agroindustriales con potencial para la producción de metano mediante la digestión anaerobia. *Revista Argentina de Microbiología*, 47(3), 229-235.
- Holzappel, W. H., Geisen, R., Schillinger, U., 1995. Biological preservation of foods with reference to protective cultures, bacteriocins and food-grade enzymes. *International Journal of Food Microbiology*, 24, 343-362.
- Ingham, E., 2003. Compost Tea: Promises and Practicalities. *AGRES USA*, 33(12), 1-5.
- Ingham, E., 2005. *The Compost Tea Brewing Manual* (Quinta ed.). Corvallis, Oregon: Soil Foodweb Inc.
- Jördening, H. J., Winter, J., 2005. *Environmental Biotechnology. Concepts and Applications*. Weinheim: WILEY-VCH Verlag GmbH and Co. KGaA.
- Jurado, M. M., 2015. *Empleo de Inoculantes Microbianos en el proceso de Compostaje de Restos Vegetales*. Tesis Doctoral. Universidad de Almería, Almería, España.
- Kloepper, J. W., Leong, J., Teintze, M., Schroth, M. N., 1980. Enhanced plant Growth by siderophores produced by plant growth-promoting bacteria. *Nature*, 286(5776), 885-886.
- Koné, S. B., Dionne, A., Tweddell, R. J., Antoun, H., Avis, T. J., 2010. Suppressive effect on non-aerated compost teas on foliar fungal pathogens of tomato. *Biological Control*, 52, 167-173.
- Kumar, R., Kumawat, N., Kumar Sahu, Y., 2017. Role of Biofertilizers in Agriculture. *Popular Kheti*, 5(4), 63-66.
- Landa, B., Hervás, A., Bettioli, W., Jiménez-Díaz, R.M., 1997 Antagonistic activity of bacteria from the chickpea rhizosphere against *Fusarium oxysporum* f.sp. *ciceris*. *Phytoparasitica*, 25 (4) 305–318.
- López, M. J., Ros, M., Masaguer, A., Salas-Sanjuan, M. C., Paredes Gil, C., Boluda z, R., Roca-Pérez, L., 2015. En: J. Moreno, R. Moral, J. L. García-Morales, J. A. Pascual, M. P. Bernal

(Edits.), *De Residuo a Recurso: El Camino hacia la Sostenibilidad*. Madrid, España: Ediciones Mundi-Prensa.

López-Rodríguez, M. M., 2021. *Biopriming de semillas basado en la aplicación de bacterias beneficiosas*. Trabajo Fin de Grado. Universidad de Almería. Almería, España.

Marcote, I., Hernández, T., García, C., Polo, A., 2001. Influence of one or two successive annual applications of organic fertilisers on the enzyme activity of a soil under barley cultivation. *Bioresource Technology*, 79, 147-154.

Martin, C. C., Brathwaite, R., 2012. Compost and compost tea: Principles and prospects as substrates and soil-borne disease management strategies in soil-less vegetable production. *Biological Agriculture and Horticulture*, 28(1), 1-33.

Martin, C. C., 2014. Potential of compost tea for suppressing plant diseases. *CAB Reviews*, 9(32), 1-38.

Martin, C. C., 2015. Enhancing Soil Suppressiveness Using Compost and Compost Tea. En: M. Meghvansi, A. Varma (Edits.), *Organic Amendments and Soil Suppressiveness in Plant Disease Management*, 46, 25-49. Cham: Springer.

Meena, S. K., Rakshit, A., Meena, V. S., 2016. Effect of seed bio-priming and N doses under varied soil type on nitrogen use efficiency (NUE) of wheat (*Triticum aestivum*) under greenhouse conditions. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 6, 68-75.

Moreno, J., Moral, R., 2007. *Compostaje*. Madrid, México: Ediciones Mundi-Prensa.

Naidu, Y., Meon, S., Kadir, J., Siddiqui, Y., 2010. Microbial Starter for the Enhancement of Biological Activity of Compost Tea. *International Journal of Agriculture and Biology*, 12(1), 51-56.

Oka, Y., Yermiyahu, U., 2002. Suppressive effects of composts against the root-knot nematode *Meloidogyne javanica* on tomato. *Nematology*, 4, 891-898.

Pant, A. P., Radovich, T. J., Hue, N. V., Paull, R. E., 2012. Biochemical properties of compost tea associated with compost quality and effects on pak choi growth. *Scientia Horticulturae*, 148, 138-146.

Rahangdale, P., Kumar, A., Kumar, R., Kumar, A., Kumar, A., Kumar, D., Singh, C., Singh, D., Kumar, S., Bharti, A. K., Kumar, S., 2022. Influence of biopriming and organic manures on growth, seed yield and quality of black wheat (*Triticum aestivum* L.). *Journal of Pharmacology and Phytochemistry*, 11(1), 132-135.

Rajput, R. S., Singh, J., Singh, P., Valshnav, A., Singh, H. B., 2021. Influence of seed biopriming and vermiwash treatment on tomato plant's immunity and nutritional quality upon *Sclerotium rolfsii* challenge inoculation. *Journal of Plant Growth Regulation*, 40, 1493-1509.

Rakshit, A., Singh, K. B., 2018. *Advances in Seed Priming*. Springer.

- Razza, F., D'Avino, L., L'Abate, G., Lazzeri, L., 2018. *The Role of Compost in Bio-waste Management and Circular Economy*. En: E. Benetto, K. Gericke, M. Guiton (Edits.), *Designing Sustainable Technologies, Products and Policies*. 133-143. Cham: Springer.
- Real Decreto Ley 999/2017, del 24 de noviembre, por el que se modifica el Real Decreto 506/2013, de 28 de junio, sobre productos fertilizantes, *Boletín Oficial del Estado*, 296, del 6 de diciembre de 2017, 119396 a 119450. Obtenido de: <https://www.boe.es/eli/es/rd/2017/11/24/999>. (Consultado 17/03/22).
- Reddy, P. P., 2013. *Recent Advances in Crop Protection*. Springer India.
- Sánchez-San Fulgencio, N., Suárez-Estrella, F., López, M.J., Jurado, M., López- González, J.A., Moreno, J., 2018. Biotic aspects involved in the control of damping-off producing agents: the role of the thermotolerant microbiota isolated from composting of plant waste, *Biological Control* 124, 82–91.
- Santoro, M.V., Zygadlo, J., Giordano, W., Banchio, E., 2011. Volatile organic compounds from rhizobacteria increase biosynthesis of essential oils and growth parameters in peppermint (*Mentha piperita*). *Plant Physiology and Biochemistry*, 49, 1177–1182.
- Scheuerell, S., Mahaffee, W., 2002. Compost tea: Principles and Prospects For Plant Disease Control. *Compost Science and Utilization*, 10(4), 313-338.
- Seema, M., Devaki, N. S., 2012. *In vitro* evaluation of biological control agents against *Rhizoctonia solani*. *Journal of Agricultural Technology*, 8(1), 233-240.
- Sher, A., Sarwar, T., Nawaz, A., Ijaz, M., Sattar, A., Ahmad, S., 2019. *Methods of seed priming*. En: Hasanuzzaman, M., Fotopoulos, V. (Edits), *Priming and pretreatment of seeds and seedlings*. Springer Singapore, 1–10.
- Suárez-Estrella, F., Jurado, M. M., Vargas-García, M. C., López, M. J., Moreno, J., 2013. Isolation of bio-protective microbial agents from eco-composts, *Biological Control*, 67 (1), 66-74.
- Taylor, A. G., Allen, P. S., Bennett, M. A., Bradford, K. J., Burris, J. S., Misra, M. K., 1998. Seed Enhancements. *Seed Science Research*, 8, 245-256.
- Tortosa, G., 2013. *Blog y noticias: Microbiología del compost según la temperatura del compostaje*. Obtenido de Compostando ciencia: <http://www.compostandociencia.com/2013/08/microbiologia-del-compost-segun-la-temperatura-del-compostaje-html/>. (Consultado 26/02/22).
- Vessey, J., 2003. Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizer. *Plant and Soil*, 255, 571-586.
- Parawira, W., Murto, M., Read, J. S., Mattiasson, B., 2005. Profile of hydrolases and biogas production during two-stage mesophilic anaerobic digestion of solid potato waste. *Process Biochemistry*, 40, 2945-2952.

- Weiland, P., 2010. Biogas production: current state and perspectives. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 85, 849-860.
- Zhang, H., Kim, M. S., Krishnamachari, V., Payton, P., Sun, Y., Grimson, M., Farag, M. A., Ryu, C.-M., Allen, R., Melo, I. S., Paré, P. W., 2007. Rhizobacterial volatile emissions regulate auxin homeostasis and cell expansion in *Arabidopsis*. *Plants*, 226(4), 839-851.
- Zucconi, F., Forte, M., Monaco, A.D.E., De Bertoldi, M., 1981. Biological evaluation of compost maturity. *BioCycle*, 22 (4), 27–29.