



UNIVERSIDAD DE ALMERÍA
ESCUELA SUPERIOR DE INGENIERÍA Y FACULTAD
DE CIENCIAS EXPERIMENTALES

GRADO DE BIOTECNOLOGÍA

CARACTERIZACIÓN DE EXTRACTOS ACUOSOS DE COMPOST
PROCEDENTES DE RESIDUOS AGROALIMENTARIOS Y SU
POSIBLE APLICACIÓN BIOPESTICIDA

Alumna:

María del Mar Sánchez Cánovas

Directoras:

Francisca Suárez Estrella
Ana Josefa Toribio Gallardo

Fecha de defensa: Junio de 2022

AGRADECIMIENTOS

Después de 8 meses desde que comencé este proyecto, aún no me puedo creer que haya llegado el momento de defender mi Trabajo de Fin de Grado y con ello, finalizar una etapa tan importante como es la universidad, tras cuatro años de esfuerzo y dedicación. Aún recuerdo la incertidumbre que sentí en 1º de Bachillerato por no saber qué carrera estudiar al año siguiente. Sin embargo, gracias a una serie de situaciones que tuvieron lugar por casualidad, o posiblemente por destino, dando como resultado que yo lograra estudiar la carrera de Biotecnología en la Universidad de Almería. Esto no solo me ha permitido aumentar mis conocimientos sino conocer personas maravillosas que me han acompañado a lo largo de este extenso camino tanto en los buenos como malos momentos, viéndome crecer hasta lo que soy ahora.

En primer lugar, me gustaría hacer una mención especial a una gran persona como fue Joaquín Moreno Casco. Aunque no tuve el placer de trabajar junto a él en el laboratorio, quiero darle las gracias por su apoyo incondicional y sus enseñanzas a lo largo del Grado, que me permitieron descubrir lo maravillosa que es la Microbiología. Asimismo, quiero agradecer a María José López López por darme la oportunidad de entrar en su grupo de investigación. Agradezco enormemente todos sus consejos, su simpatía, su capacidad de motivarme y darme ánimos en los momentos complicados, tanto en el ámbito profesional como en el ámbito personal.

La siguiente persona a la que quiero dar las gracias es a mi tutora Francisca Suárez Estrella por la gran oportunidad que me ha dado de poder realizar mi Trabajo de Fin de Grado en el área de Microbiología y por su tiempo, su incansable dedicación y por su preocupación por ayudarnos en todo lo que hemos podido necesitar a lo largo del desarrollo del trabajo. Gracias por la confianza puesta en mí y siempre estar ahí, no solamente estos últimos meses, sino en los 4 años de carrera, resolviendo mis dudas y enseñarme a mí y a mis compañeros, conocimientos que me han permitido enfocar mi carrera como biotecnóloga. Gracias de corazón por tu infinita paciencia y comprensión a pesar de no haberte puesto las cosas fáciles en estos años.

Otra de las personas que ha pasado más tiempo conmigo cada día y que, por lo tanto, también se merece una mención especial es mi cotutora Ana. Estoy muy agradecida por toda la ayuda que me ha brindado en todo momento y encontrar una solución a todos los problemas que me habían ido surgiendo en el trabajo. Gracias por hacer el trabajo en el laboratorio mucho más ameno con la alegría que transmites y tu positivismo, hasta en los momentos donde no salían los resultados deseados. Sin duda, me siento muy afortunada de haberte conocido durante estos meses en el laboratorio.

A todos los compañeros de laboratorio y al resto de profesores del departamento, por acogerme con los brazos abiertos y por hacer que todas las horas que pasaba trabajando en el laboratorio fueran más amenas, y llenas de muchas risas y momentos, gracias a vuestra presencia y el buen ambiente de trabajo.

No habría llegado tan lejos sin el apoyo incondicional de mi familia, que ha podido vivir de primera mano, desde fuera, cada paso que he dado hasta llegar al día de hoy. Quiero agradecer de corazón a mis padres por estar ahí siempre para mí, sacrificándose por mí y por mi hermano para darnos lo mejor, por aguantar y calmarme en todos los agobios que he sufrido a lo largo de la carrera, y por celebrar cada una de mis victorias por muy pequeñas que fuesen. También, gracias a mi hermano por su apoyo y palabras de ánimo en los momentos difíciles, dándome las fuerzas para seguir adelante y para sacar lo mejor de mí, a pesar de la distancia que nos separa.

Por último, pero no menos importante, quiero agradecer a mis amigos de toda la vida por permanecer a mi lado año tras año, y a mis amigos de la carrera que han estado junto a mí estos 4 años llegando a convertirse personas muy importantes en mi vida. Gracias a ellos, he podido disfrutar de mi etapa universitaria llena de risas, dramas, consejos y anécdotas, haciendo que las reuniones de trabajo se volvieran más divertidas y más llevaderas a su lado. Nunca olvidaré todos los momentos vividos con vosotros y espero seguir formando recuerdos a vuestro lado por mucho más tiempo.

Una vez más, gracias a todos.

ÍNDICE

RESUMEN	6
ABSTRACT	7
1. INTRODUCCIÓN	8
1.1. Problemática ambiental y sanitaria del uso de agroquímicos	8
1.2. Alternativas sostenibles al uso de pesticidas.....	8
1.2.1. Rotación de cultivos.....	9
1.2.2. Semillas tolerantes a enfermedades y plantas genéticamente modificadas.....	9
1.2.3. Compost y derivados	9
1.3. Aplicación del compost y sus derivados para el control de patógenos vegetales	10
1.3.1. Factores abióticos implicados en la supresión de patógenos:.....	11
1.3.2. Factores bióticos implicados en la supresión de patógenos:.....	12
1.3.3. Extractos de compost para el control de patógenos vegetales	14
2. OBJETIVOS	16
2.1. Objetivo general.....	16
2.2. Objetivos específicos	16
3. MATERIAL Y MÉTODOS	16
3.1. Material de partida	16
3.2. Protocolos de obtención de los extractos acuosos del compost	17
3.3. Hongos y oomicetos fitopatógenos.....	17
3.4. Medios de cultivo y reactivos	18
3.5. Diseño experimental	22
3.6. Caracterización Físico-Química de los extractos de compost.....	23
3.6.1. Determinación del pH de las muestras.....	23
3.6.2. Determinación de la conductividad eléctrica de las muestras	23
3.6.3. Determinación de la concentración de compuestos fenólicos	24
3.7. Caracterización biológica de los extractos de compost	24
3.7.1. Índice de germinación (Test de Zucconi)	24
3.7.2. Caracterización enzimática: Ensayos cualitativos	26
3.7.3. Espectro antagónico de los extractos frente al crecimiento de hongos y oomicetos fitopatógenos.....	27
3.8. Análisis estadístico	29
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	29
4.1. Caracterización físico-química de los extractos de compost.....	30
4.1.1. Determinación del pH de las muestras.....	30

4.1.2. Determinación de la conductividad eléctrica de las muestras	31
4.1.3. Determinación de la concentración de compuestos fenólicos	32
4.2. Caracterización biológica de los extractos de compost	33
4.2.1. Índice de germinación (Test de Zucchini)	33
4.2.2. Caracterización enzimática: Ensayos cualitativos	35
4.2.3. Espectro antagónico de los extractos frente al crecimiento de hongos y oomicetos fitopatógenos.....	36
5. CONCLUSIONES.....	41
6. FINANCIACIÓN	42
7. BIBLIOGRAFÍA	42

RESUMEN

En los últimos años, la práctica agrícola intensiva ha garantizado la sostenibilidad en el suministro de alimentos para hacer frente a las necesidades alimentarias de una población en continuo desarrollo. Sin embargo, a pesar de la eficacia demostrada, las prácticas agrícolas intensivas no están exentas de limitaciones. El uso regular de plaguicidas y herbicidas hace que, en la actualidad, esta actividad represente una de las causas más importantes de contaminación ambiental y puede provocar, además, la aparición de resistencias por parte de determinadas plagas y agentes fitopatógenos. Esta situación ha derivado en la búsqueda de alternativas sostenibles que permitan incrementar la producción agrícola a la vez que posibilitan controlar eficientemente el crecimiento y desarrollo de los patógenos vegetales. Desde hace varias décadas, se han reconocido las capacidades de supresión de enfermedades de los abonos orgánicos, mediante mecanismos de supresión principalmente biológicos, por los microorganismos autóctonos pertenecientes a hongos (como *Trichoderma* spp.) y bacterias (*Pseudomonas putida*, *Xanthomonas* sp. y *Bacillus* sp.), así como por sus características abióticas tales como las moléculas húmicas, fenólicas o antifúngicas termolábiles, el pH, la relación C/N y la madurez en los extractos de compost. Un conocimiento más profundo de los mismos, resultaría esencial para hacer más predecible y eficiente su uso.

Bajo esta perspectiva, el presente Trabajo de Fin de Grado se ha centrado en la caracterización y selección de un protocolo de obtención de extractos acuosos de compost procedentes de residuos agroalimentarios (RAA-1 y RAA-3), en relación con su perfil físico-químico y enzimático, así como por su carácter fitotóxico mediante la realización de bioensayos de germinación con semillas de berro y la determinación de su capacidad supresiva *in vitro* frente a agentes fitopatógenos fúngicos seleccionados por su importancia en el entorno agrícola Almeriense.

Los resultados pusieron de manifiesto, que los extractos acuosos derivados de compost elaborados a partir de restos agroalimentarios muestran un importante potencial biopesticida frente a hongos y oomicetos fitopatógenos causantes de graves enfermedades en el entorno agrícola Almeriense. La aplicación de distintos protocolos de extracción, así como la procedencia de las muestras, repercuten de forma significativa en las características físico-químicas y biológicas de los extractos. De hecho, a la hora de aplicarlos con fines biopesticidas, hay que tener en cuenta no sólo el espectro de actuación antagonista que presenta, sino también su carácter fitotóxico, que podría afectar a la planta en estados tempranos de desarrollo.

Palabras clave: Compost, biopesticida, Microorganismos Promotores del Crecimiento Vegetal (PGPMs), enzimas, índice de germinación, hongos fitopatógenos.

ABSTRACT

In recent years, intensive agricultural practice has ensured sustainability in food supply to meet the food needs of a continuously developing population. However, despite the demonstrated effectiveness, intensive agricultural practices are not without limitations. The regular use of pesticides and herbicides currently represents one of the most important causes of environmental pollution and can also lead to the appearance of resistance by certain pests and phytopathogens. This situation has led to the search for sustainable alternatives to increase agricultural production while making it possible to efficiently control the growth and development of plant pathogens. For several decades, the disease suppression capabilities of organic fertilizers have been recognized through mainly biological suppression mechanisms by indigenous microorganisms belonging to fungi (such as *Trichoderma* spp.) and bacteria (*Pseudomonas putida*, *Xanthomonas* sp. and *Bacillus* sp.), as well as by their abiotic characteristics such as thermolabile humic, phenolic or antifungal molecules, pH, C/N ratio and maturity in compost extracts. A deeper knowledge of these would be essential to make their use more predictable and efficient.

Under this perspective, the present Final Degree Project has focused on the characterization and selection of a protocol for obtaining aqueous compost extracts from agri-food waste (RAA-1 and RAA-3), in relation to their physicochemical and enzymatic profile, as well as their phytotoxic character by performing germination bioassays with cress seeds and determining their in vitro suppressive capacity against phytopathogenic fungal agents selected for their importance in the agricultural environment of Almeria.

The results showed that aqueous extracts derived from compost made from agro-food wastes show an important biopesticidal potential against fungi and oomycetes that cause serious phytopathogenic diseases in the agricultural environment of Almeria. The application of different extraction protocols, as well as the origin of the samples, have a significant impact on the physicochemical and biological characteristics of the extracts. In fact, when applying them for biopesticidal purposes, it is necessary to take into account not only their antagonistic spectrum of action, but also their phytotoxic character, which could affect the plant in early stages of development.

Keywords: Compost, biopesticide, Plant Growth Promoting Microorganisms (PGPMs), enzymes, germination index, phytopathogenic fungi.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Problemática ambiental y sanitaria del uso de agroquímicos

En la actualidad, la agricultura necesita garantizar la sostenibilidad en el suministro de alimentos y hacer frente a las necesidades alimentarias de una población en continuo desarrollo. Para ello, es imprescindible mantener elevadas tasas de producción y obtener un mayor rendimiento de la superficie de cultivo. En este contexto, la práctica agrícola intensiva se caracteriza por el uso indiscriminado de fertilizantes químicos y plaguicidas, lo cual ha originado problemas importantes a nivel ambiental y sanitario, muchos de ellos de carácter irreversible, tanto para la salud humana como para el medio ambiente, debido a su naturaleza tóxica y persistente (Carvalho, 2017). En este sentido, el uso excesivo de agroquímicos ha provocado contaminación en el agua, suelo y aire, provocando un desequilibrio en el ecosistema. Entre los efectos más relevantes provocados como consecuencia de esta situación, se encuentran la contaminación de los recursos naturales, el aumento de salinidad en el suelo, la pérdida de la materia orgánica, y la acumulación de nitratos y metales pesados, que afectarán negativamente a la fertilidad del suelo y a la diversidad de microorganismos promotores del crecimiento vegetal.

Ante tal problemática, surge la necesidad de sustituir la gran variedad de agroquímicos existentes por otras alternativas sostenibles, que den paso a una agricultura más responsable, que permita mantener y/o aumentar la producción agrícola, aprovechando los recursos propios del suelo y los sistemas naturales, preservando siempre el medio ambiente y la salud de la población.

1.2. Alternativas sostenibles al uso de pesticidas

En las últimas décadas, se ha conseguido desarrollar una amplia gama de métodos alternativos al uso de agroquímicos con el fin de potenciar la práctica de una agricultura más sostenible, caracterizada por ser capaz de preservar y mejorar la calidad ambiental, y al mismo tiempo contribuir al crecimiento de la población (Djebaili y col., 2020). La aplicación de bioplaguicidas es todavía limitada en comparación con la de plaguicidas químicos sintéticos, debido a los costosos métodos de producción, la escasa estabilidad en el almacenamiento, la susceptibilidad a las condiciones ambientales y problemas de eficacia, entre otros. Algunos de estos problemas pueden resolverse mediante mejoras en la formulación (Gasic y Tanovic, 2013), y es en lo que actualmente trabajan las áreas de I+D+i de las empresas del sector agrobiotecnológico.

Es, sin embargo, indiscutible, que el uso de bioplaguicidas presenta una serie de ventajas con respecto al uso de pesticidas de síntesis química:

- Se generan cultivos más ecológicos y sostenibles, al evitar de forma total o parcial el uso de sustancias químicas.

- No generan residuos de naturaleza química en el producto final, por lo que disminuyen los efectos adversos sobre la salud humana.
- Se utilizan materias primas y medios de producción renovables y de bajo coste.

Entre las alternativas sostenibles al uso de pesticidas existentes, destacan algunas más tradicionales como la rotación de cultivos o el uso de enmiendas orgánicas, tipo compost, así como otras más innovadoras aunque quizá más controvertidas como es el uso de plantas genéticamente modificadas.

1.2.1. Rotación de cultivos

La rotación de cultivos constituye uno de los métodos más tradicionales y utilizados. Consiste en cultivar una secuencia de especies vegetales en la misma tierra de cultivo, siguiendo un orden definido. Su finalidad radica en mantener la fertilidad del suelo evitando que se requieran los mismos nutrientes en varios ciclos consecutivos, para una utilización óptima de los recursos. Asimismo, también contribuyen a romper los ciclos de malas hierbas, reducir la dependencia de insumos externos y de enfermedades (Bullock 1992; Leteinturier y col., 2006). La rotación de los cultivos actúa como una perturbación que da lugar a una dinámica frecuente de tipo barrido selectivo. El seguimiento de la frecuencia y la velocidad de estos barridos sería útil para detectar períodos de menor aptitud y de reducción del tamaño de la población, en los que el patógeno podría verse empujado a la extinción. Entonces, ajustar los modelos utilizados en la coevolución natural planta-patógeno al estudio de las rotaciones de cultivos, puede ser un enfoque útil para abordar los problemas agrícolas (Orr y Unckless, 2008; Bargués-Ribera y Gokhale, 2020).

1.2.2. Semillas tolerantes a enfermedades y plantas genéticamente modificadas

La resistencia de la planta huésped, ya sea desarrollada a través del cultivo convencional o a través de la ingeniería genética, es una herramienta complementaria a otras prácticas de manejo de plagas. Los cultivos transgénicos se han cultivado en áreas cada vez mayores y proporcionan tolerancia a los herbicidas, protección contra plagas de lepidópteros y/o coleópteros, o una combinación de ambos rasgos y resistencia genética de las plantas frente a microorganismos fitopatógenos, constituyendo una alternativa prometedora para hacer frente a las enfermedades y plagas de los cultivos. No obstante, los patógenos son capaces de adaptarse con frecuencia a la resistencia por medio de mecanismos de evasión, logrando superarla principalmente, cuando está establecida por genes principales (Pilet-Nayel et al., 2017).

1.2.3. Compost y derivados

El compostaje es considerado una de las tecnologías más eficientes, económicas y respetuosas con el medio ambiente, utilizadas en la actualidad para el tratamiento de los residuos orgánicos producidos por actividades antropogénicas (Siles-Castellano y col., 2021). El compostaje es un proceso de transformación biológica aeróbica de la materia orgánica, que da lugar a un producto muy estable conocido como compost. En los últimos años, su aplicación en forma de abono y enmienda orgánica húmica del suelo ha tenido como fin, el incremento del contenido de sustancias húmicas del suelo para

restaurar suelos erosionados, degradados o contaminados, así como la mejora general de la fertilidad física, química y biológica (Suárez-Estrella y col., 2008). Con respecto a sus propiedades físicas, el color oscuro del compost permite la absorción de las radiaciones solares, aumentando la temperatura y con ello, favoreciendo una mayor absorción de nutrientes. También es capaz de mejorar la textura, estructura, aireación y drenaje del suelo. Por otro lado, en lo referente a las propiedades químicas, reduce las variaciones de pH y mejora la CIC (Capacidad de Intercambio Catiónico), incrementando como resultado su fertilidad. En cuanto a las propiedades biológicas, el compost puede fomentar el desarrollo de microorganismos beneficiosos, favorecer la aireación y oxigenación del suelo, y con ello, mejorar la actividad de la raíz (Jara-Samaniego, 2016).

En algunos casos, la elaboración de compost *a la carta*, implica la incorporación de determinados componentes a un compost estable y maduro, lo que tiene como objetivo, mejorar la calidad del producto final y promover la actividad de los microorganismos presentes en el mismo (Ahmad y col, 2008). Se obtiene por tanto, un producto que debido a sus características, se puede utilizar como soporte para el uso de inoculantes microbianos, como biorregulador de suelos degradados, como biorrecuperador de suelos contaminados, así como para suprimir parcial o totalmente los fitopatógenos del suelo que producen podredumbre y necrosis radicular en plantas (Sánchez y col., 2017). Por lo tanto, el compost se puede utilizar para sobrevivir a enfermedades ocasionadas por patógenos mediante mecanismos de resistencia inducida basados en el reconocimiento del patógeno y la consiguiente respuesta de señalización que activa las defensas de la planta (Gupta y col, 2015). Esto se debe a que algunas bacterias presentes en el compost son capaces de desencadenar respuestas similares que una bacteria patógena pero sin provocar la sintomatología asociada. Este tipo de resistencia se produce a partir de la colonización de las raíces de la planta por rizobacterias y se caracteriza por estar mediada por rutas metabólicas sensibles al etileno y al ácido jasmónico (Jara-Samaniego, 2016).

A este factor hay que sumarle el hecho de que, en los últimos años, se viene utilizando el aporte de nutrientes en forma líquida, mediante técnicas de “fertirrigación” consideradas hoy día muy efectivas. Ante esta situación surge el concepto de extractos o tés de compost, los cuales presentan una gran diversidad de beneficios a escala edáfica y agronómica, no sólo mejorando las características físico-químicas de los suelos sino también el perfil microbiológico de los mismos (Litterick y col., 2004; Scheuerell y Mahaffee, 2013). Más adelante (apartado 1.3.3.) se dedicará un apartado para profundizar en la importancia actual del uso de extractos y tés de compost para el control de enfermedades de plantas.

1.3. Aplicación del compost y sus derivados para el control de patógenos vegetales

La calidad del compost va a depender tanto del sustrato de partida como de las condiciones a las que se lleve a cabo el proceso de compostaje. Cuando un compost es utilizado como una enmienda húmica orgánica en el suelo, lo ideal es que posea una serie de características de calidad, entre las que

destacan ser biológicamente estable, que no provoque la inmovilización de nitrógeno, que esté libre de fitotoxinas y patógenos, y que posea baja concentración de sales solubles (Ansorena J., 2014).

Existen tres estrategias bien distintas a la hora de estimar la calidad de un compost y de sus derivados desde un punto de vista agronómico (Ansorena J., 2014):

- Mediante la medición de una serie de propiedades organolépticas (olor, tamaño de partícula, presencia de elementos extraños como plásticos y vidrios, color, etc.) y propiedades físicas, químicas y biológicas (humedad, materia orgánica, relación C/N, densidad, pH, conductividad eléctrica, humificación, presencia de metales pesados, contaminación por patógenos de humanos y plantas, etc.), las cuales se determinan a nivel de laboratorio.
- Mediante bioensayos en semilla o en plántula, que permiten evaluar a pequeña escala, las propiedades de un determinado compost o de sus derivados.
- Mediante ensayos experimentales en campo, donde se evalúa la respuesta de las plantas en condiciones reales a distintas dosis de compost con respecto a producción de biomasa vegetal fresca, crecimiento radicular, número de hojas o inflorescencias, etc.

Es bien conocido que, hoy día, la horticultura se ha vuelto altamente restrictiva en relación a los plaguicidas químicos, ya que poseen efectos drásticos para sobre la microbiota del suelo (Pascual y col., 2002), así como problemas asociados con daños ambientales y riesgos para la salud (Siddiqui y col., 2008). Por esta razón, la imposibilidad de ser eficientes en el control de enfermedades es más común en campo que *en vitro*, debido a la naturaleza dinámica del entorno. Otro factor que afectaría al carácter supresivo sería el grado de madurez del compost, ya que este parámetro determina la extensión de la colonización microbiana del residuo orgánico, la comunidad microbiana y la capacidad de sostenimiento de la misma. De esta forma, los composts inmaduros están poco colonizados y no sólo sirven como fuente de nutrientes para los agentes asociados al control biológico sino también a los fitopatógenos, lo que provoca un aumento de la enfermedad. Por otro lado, los compost maduros están completamente colonizados por microorganismos, por lo que son muy poco accesibles a los fitopatógenos debido a que se producen diferentes fenómenos relacionados con la antibiosis y competición, que inducen la resistencia sistémica (Trillas-Gay M.I. y col., 2014).

1.3.1. Factores abióticos implicados en la supresión de patógenos:

A pesar de que los mecanismos de supresión de patógenos en compost y extractos derivados, tienen un origen biótico, otros factores abióticos como la relación C/N del sustrato, el pH, la conductividad eléctrica, la disponibilidad de nutrientes, o la concentración de compuestos fenólicos, son clave para promover o limitar el desarrollo de enfermedades de plantas.

- **Relación C/N:** Se trata de una variable asociada al grado de descomposición de la materia orgánica, que se relaciona estrechamente con la capacidad de un compost o de sus derivados para suprimir enfermedades. Por lo general, la mayoría de los compost, una vez que han sido estabilizados, suelen presentar una relación C/N de entre 10 y 20 (Brady y Weil, 2008). De este modo, se ha demostrado que el empleo de compost con una relación C/N alta, ayuda a controlar eficazmente las enfermedades

desarrolladas por cepas patógenas de *Fusarium oxysporum*, mientras que valores bajos de este parámetro provocarían un agravamiento de la sintomatología causada por este organismo. (Orr, 2018).

- **pH:** El pH del compost se caracteriza por ser capaz de influir en la disponibilidad de ciertos nutrientes como el hierro, el zinc o el cobre, por lo que juega un papel importante en los mecanismos de competencia por nutrientes. Una gran proporción de los patógenos vegetales presentes en el suelo, predominan en suelos ácidos y son menos competitivos en condiciones alcalinas (Brady y Weil, 2008). Por lo tanto, un pH más alto en compost o en extractos derivados, puede limitar, en mayor o menor grado, el establecimiento de poblaciones de patógenos (Griffin, 2012).

- **Conductividad eléctrica:** Esta variable permite determinar la salinidad o concentración de sales solubles en la solución del sustrato y su valor está determinado por la naturaleza y composición del sustrato de partida. Por tanto, una mayor conductividad eléctrica reduce la esporulación y la virulencia de los patógenos, al reducir las probabilidades de supervivencia del patógeno (Griffin, 2012). No obstante, hay que actuar con cautela, en este sentido, teniendo en cuenta que una alta concentración de sales en el suelo dificulta la absorción de agua por las raíces de las plantas.

- **Compuestos fenólicos:** Se caracterizan por estar presentes prácticamente en todos los materiales vegetales. Muestran un importante efecto antimicrobiano, y juegan un papel fundamental en la inhibición de la germinación de semillas y en la inmovilización del nitrógeno del suelo. Merece especial atención controlar la presencia de altas concentraciones de fenólicos en compost y derivados, ya este hecho podría relacionarse con problemas de fitotoxicidad. No obstante, la presencia de cantidades adecuadas de compuestos fenólicos en el entorno vegetal podría facilitar la activación de los mecanismos de defensa en la planta, favoreciendo la inhibición de los síntomas provocados por determinados fitopatógenos (Priya y col., 2015).

1.3.2. Factores bióticos implicados en la supresión de patógenos:

Los informes sobre el uso de compost para suprimir las enfermedades de las plantas transmitidas por el suelo se remontan a casi medio siglo atrás. Se han sugerido varios mecanismos para explicar la supresión de enfermedades por parte del compost y su microbiota. Entre ellos, la competencia por los nutrientes y el espacio entre las poblaciones microbianas (Vestberg y col., 2014), la inhibición del crecimiento de los patógenos por los antibióticos producidos por la microbiota (Mehta y col., 2014) y el hiperparasitismo, en el que un microorganismo ataca “físicamente” a otro patógeno (de Bertoldi, 2010).

1.3.2.1. Microbiota presente en el compost

En el compost se puede encontrar una gran variedad de microorganismos con una elevada capacidad para suprimir patógenos. El grupo predominante de microorganismos en el producto final depende de las condiciones ambientales y nutricionales existentes durante todo el proceso de compostaje. Teniendo esto en cuenta, se pueden encontrar en el compost una serie de poblaciones microbianas en diferentes proporciones:

• **Bacterias:** Son los microorganismos más numerosos presentes en el compost, llegando a constituir entre un 80-90% del total. Se encuentran presentes durante todo el proceso de compostaje, compitiendo por los nutrientes y el espacio con los fitopatógenos. Por lo general, entre los géneros más comunes que se encuentran en compost destacan *Bacillus* y *Pseudomonas*, descritos como bacterias asociadas a procesos de biocontrol de patógenos de plantas (Laich, 2011). Entre sus capacidades, cabe destacar la utilización de un amplio rango de enzimas que degradan diferentes compuestos orgánicos y residuos vegetales, dando lugar a agregados estructurales del suelo (Mac Donnell, 2018). Además, son más efectivas utilizando los recursos disponibles que de otra manera consumirían las bacterias patógenas, y retienen nutrientes esenciales en su biomasa.

• **Hongos:** Se trata de un grupo de microorganismos muy amplio que constituyen un componente importante de la microbiota del compost. Producen enzimas extracelulares capaces de degradar polímeros complejos en moléculas más sencillas asimilables por la planta (Neher y col., 2013). Del mismo modo, son capaces de competir con los microorganismos patógenos, consumiendo los exudados vegetales y ocupando espacios que podrían ser utilizados como sitios de infección (Mac Donnell, 2018). Los géneros fúngicos más representativos del compost son *Aspergillus* y *Penicillium* y, en menor proporción, los géneros de *Fusarium*, *Mucor*, *Acremonium* y *Mortierella* (Moreno y Mormeneo, 2011).

• **Actinomicetos:** Tienen un papel importante durante el proceso del compostaje por su capacidad enzimática para degradar compuestos orgánicos complejos como la celulosa y la lignina. Hay que mencionar además, muchos de ellos son capaces de resistir las temperaturas que se alcanzan durante el compostaje, por lo que se mantienen hasta el producto final. Asimismo, los actinomicetos controlan y regulan la microbiota del compost a través de la producción de agentes antimicrobianos (Laich, 2011). Es frecuente encontrar en el compost cepas pertenecientes al género *Arthrobacter* (Moreno y Mormeneo, 2011), con un elevado potencial antifúngico, lo que le permite controlar enfermedades provocadas por una gran variedad de hongos fitopatógenos, como *Botrytis cinerea* y *Alternaria alternata* (Ramlawi y col., 2021).

1.3.2.2. Microorganismos promotores del crecimiento vegetal (PGPMs)

Entre las alternativas más ecológicas y sostenibles destinadas al control de enfermedades vegetales, destaca el empleo de microorganismos que normalmente viven asociados a la rizosfera vegetal (Benjumeda-Muñoz, 2007). Muchos de ellos tienen efectos beneficiosos sobre el desarrollo de las plantas, promoviendo significativamente su crecimiento de forma directa o indirecta. Esta población microbiana recibe el nombre de PGPM (Plant Growth-Promoting Microorganism), y ejerce efectos positivos mediante numerosos mecanismos, entre otros, la fijación de nitrógeno, la producción de ácidos orgánicos (ácido oxálico y cítrico), la producción de fitohormonas, o la producción de fosfatasa que promueven la solubilización del fósforo y de otros nutrientes (Djebaili y col., 2020). También consiguen, muchas de ellas, controlar las enfermedades causadas por bacterias y hongos fitopatógenos gracias a mecanismos que implican principalmente la producción de enzimas, antimicrobianos o sustancias volátiles. (Gouda y col., 2018)

Dentro de este grupo es destacable el papel de las actinobacterias, bacterias productoras de un gran número de biomoléculas de interés y que, debido a su actividad biofertilizante y biopesticida, en los últimos años se han convertido en un grupo microbiano de especial interés agrícola (Evangelista-Martínez y col., 2017)

1.3.3. Extractos de compost para el control de patógenos vegetales

El uso de extractos acuosos y tés de compost con capacidad biopesticida, conecta estrechamente con el concepto actual de economía sostenible o bioeconomía. Estos derivados del compost se producen a base de mezclas de compost con agua en proporciones muy heterogéneas, y bajo distintas condiciones de incubación, durante períodos definidos, ya sea con aireación activa o no, así como añadiendo o no, uno o más aditivos, hecho que se destina a aumentar la densidad de la población microbiana durante la producción (Al-Dahmani y col., 2003; Scheuerell y Mahaffee, 2004). Su uso en agricultura está recomendado según Reeve y col. (2010), por su enorme potencial para complementar otros tipos de fertilizantes, por la facilidad de su aplicación, así como por su capacidad para suprimir una amplia gama de patógenos del suelo y del aire (Martin, 2014; Carrillo, 2015). En este sentido, los extractos y tés de compost se consideran productos alternativos al uso de fungicidas sintéticos, que responden a la creciente necesidad de mitigar los daños ambientales y que sobre la salud ejerce el uso abusivo de agroquímicos (Pane y col., 2012). La eficacia de estos productos puede variar en función de la procedencia del compost y de los procedimientos utilizados para su preparación. Hay que mencionar, además, que los residuos verdes compostados se consideran ventajosos en comparación con otros residuos orgánicos, ya que presentan un menor riesgo de toxicidad (Benito y col., 2005; Moretti y col., 2015) y por la interesante actividad biológica que presentan estos materiales (Ros y col., 2005).

Numerosos estudios sugieren que la reducción del componente microbiano de los tés de compost mediante filtración o esterilización por calor, resultan en la pérdida de la supresión de algunas enfermedades foliares de plantas. Al mismo tiempo, se ha demostrado que la supresión está relacionada con los efectos positivos del té de compost sobre las comunidades microbianas beneficiosas en la superficie foliar, y a la activación de las vías de defensa de las plantas infectadas (St Martin, 2015). Entre todos los estudios realizados, aquellos realizados por Cayuela y col. (2008) y Naidu y col. (2012) destacan por describir diversos tipos de tés capaces de reducir significativamente el crecimiento de los hongos *Botrytis cinerea* (moho gris) y *Golovinomyces cichoracearum* (agente causal del oidio), mediante fenómenos biológicos.

A continuación, se enumeran los beneficios más destacables derivados del uso de extractos y tés de compost:

- **Promoción del crecimiento en plantas:** algunos compuestos producidos por los microorganismos beneficiosos presentes en los extractos o tés, como aminoácidos, ácidos húmicos y hormonas actúan positivamente sobre el crecimiento y el estado fisiológico de las plantas. Los nutrientes aportados son, por otra parte, retenidos en la superficie foliar o radicular para que estén disponibles cuando las plantas lo necesiten.

- **Mejora de la estructura del suelo:** los extractos de compost promueven la porosidad del suelo, la densidad y la incorporación de nutrientes por las plantas. La mejora de la estructura permite la llegada de una mayor concentración de oxígeno a las raíces favoreciendo la salud de las plantas, la retención de agua y la descomposición de toxinas.

- **Beneficios sobre la salud y el medio ambiente:** estos productos son más respetuosos con el ambiente y la salud animal, a diferencia de lo que ocurre con los productos de síntesis química. Asimismo, la obtención de este tipo de productos está en consonancia con el concepto de revalorización de residuos orgánicos, transformándolos en productos beneficiosos para las plantas (Mac Donnell, 2018).

- **Efectos sobre patógenos foliares y vasculares:** la interacción entre los microorganismos beneficiosos del té de compost y los patógenos es dinámica y tiene lugar mediante la activación de mecanismos de resistencia inducida, antibiosis o producción de sideróforos (St Martin, 2015).

A continuación, se describen algunos de los mecanismos implicados en el control de patógenos por parte de los microorganismos beneficiosos presentes en extractos y tés de compost:

- **Antibiosis:** la producción de antibióticos es considerada como uno de los mecanismos de biocontrol más potentes contra fitopatógenos y consiste en la liberación de moléculas de amplio espectro y de bajo peso molecular, con capacidad para eliminar o reducir en gran medida, el crecimiento de los patógenos (Molina-Romero, 2015). Estos metabolitos secundarios llevan a cabo una serie de mecanismos de acción, entre los que se encuentran la inhibición de la pared celular y del complejo de iniciación de la traducción de los fitopatógenos. La única desventaja de la producción de antibióticos se basa en que los fitopatógenos desarrollen resistencia a antibióticos específicos al entrar en contacto con ellos, por lo que es conveniente en estos casos, utilizar cepas capaces de sintetizar más de un antibiótico (Djebaili y col., 2020).

- **Enzimas líticas:** uno de los principales mecanismos de biocontrol que poseen las bacterias promotoras del crecimiento, se basa en la producción de enzimas líticas capaces de proteger a la planta de factores abióticos y bióticos, por medio de la degradación de la pared celular de los patógenos como *Botrytis cinerea* y *Fusarium oxysporum*. Entre las enzimas líticas que muestran mayor interés, destacan quitinasas y glucanasas, con una función fisiológica y ecológica importante (Djebaili y col., 2020).

- **Producción de sideróforos:** este mecanismo es utilizado por los PGPMs para secuestrar hierro disponible en el medio, formando un complejo Fe^{3+} -sideróforo, lo cual ocasiona que este metal no se encuentre disponible para los microorganismos fitopatógenos del suelo. Por lo tanto, constituye un mecanismo de defensa frente a los estreses bióticos. Sin embargo, la eficacia de este mecanismo depende de la composición del suelo, el tipo de microorganismo y la afinidad del sideróforo por el hierro (Aguado-Santacruz y col., 2012).

- **Competición:** las relaciones de competencia entre microorganismos patógenos y antagonistas producen una disminución en la severidad y aparición de síntomas en las plantas. Uno de los casos más comunes de competición se produce por la escasez de nutrientes, llegando a causar la muerte de los microorganismos debido a que muchos fitopatógenos necesitan del aporte externo de carbono, hierro y nitrógeno, para llevar a cabo su ciclo infeccioso.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo general

El principal objetivo de este Trabajo Fin de Grado consistió en la caracterización y selección de un protocolo de obtención de extractos acuosos de compost procedentes de residuos agroalimentarios, en relación con su perfil físico-químico y enzimático, así como por su carácter fitotóxico y su capacidad para controlar enfermedades de plantas.

2.2. Objetivos específicos

Para lograr este objetivo general, se plantearon los siguientes objetivos específicos:

- 1) Caracterización físico-química de los extractos de compost obtenidos a partir de distintos protocolos de extracción.
- 2) Evaluación cualitativa del perfil enzimático de los extractos
- 3) Estudio del carácter fitotóxico de los extractos de compost mediante la realización de bioensayos de germinación con semillas de berro.
- 4) Determinación de la capacidad supresiva *in vitro* de los extractos de compost frente a un grupo de agentes fitopatógenos seleccionados por su importancia en el entorno agrícola Almeriense.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. Material de partida

Para alcanzar los objetivos establecidos en este trabajo, se hizo uso de dos muestras de compost maduros, elaborados a partir de restos orgánicos procedentes de la industria agroalimentaria. Las muestras denominadas RAA-1 y RAA-3 fueron proporcionadas por dos empresas del sector agroalimentario, siendo las materias primas y condiciones de compostaje las que se indican a continuación:

- **RAA-1:** lodo de cítricos y restos de poda de palmera (1:3 v/v) compostados en un sistema de pilas abiertas y aireadas
- **RAA-3:** lodo de cítricos, purines de cerdo y restos de poda de palmera (3:1:1.5 v/v) compostados en un sistema de pilas abiertas y aireadas

3.2. Protocolos de obtención de los extractos acuosos del compost

Para la obtención de los extractos líquidos de compost, y una vez ajustada la humedad de las muestras en torno al 50%, se llevó a cabo la obtención de los extractos acuosos en una proporción 1:5 (ps/v) de compost en agua, respectivamente, en botes ISO de 250 mL y fueron sometidas a cuatro protocolos de extracción, variables respecto a temperatura y tiempo de incubación. Todas las muestras fueron extraídas por triplicado. Las diferencias entre protocolos se indican a continuación:

- **Protocolo 1 (CEP-1):** Incubación a temperatura ambiente durante 48h, con agitación suave a 100 rpm (Bernal-Vicente et al., 2008).
- **Protocolo 2 (CEP-2):** Incubación a 40 °C durante 24 horas, con agitación suave a 100 rpm (Oka y Yermiyahu, 2002).
- **Protocolo 3 (CEP-3):** Incubación a 70 °C durante 12 horas, con agitación suave a 100 rpm.
- **Protocolo 4 (CEP-4):** Incubación a 18 °C durante 14 días, en oscuridad y sin agitación (Koné et al., 2010).

Una vez transcurrido el tiempo de incubación en cada caso, se procedió a centrifugar las muestras a 4000 rpm durante 20 minutos en una centrífuga modelo Eppendorf™ 5810R. A continuación, se filtraron los sobrenadantes de cada protocolo, a través de dos capas de papel de filtro dispuestas sobre un embudo de filtración (ver Figura 1A), para permitir la separación de los sólidos presentes en el sobrenadante. Posteriormente, se llevó a cabo un segundo filtrado con un filtro de microfibra de vidrio de 47 mm de diámetro, tal y como se observa en la Figura 1B. Finalmente, una vez obtenidos los extractos acuosos, estos fueron repartidos en submuestras de volúmenes distintos y conservados a -20 °C hasta su utilización.

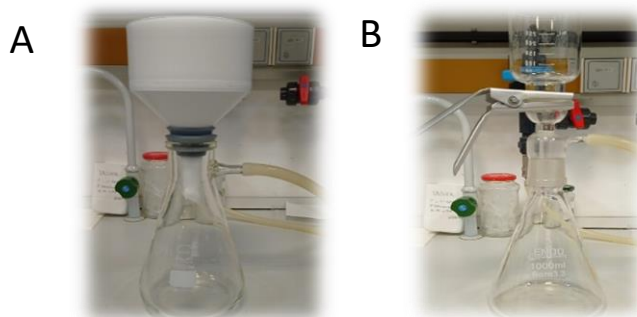


Figura 1. Sistemas de filtración empleados para la obtención de los extractos de compost

3.3. Hongos y oomicetos fitopatógenos

Las cepas de hongos y oomicetos fitopatógenos utilizadas en los ensayos de enfrentamientos *in vitro* fueron proporcionadas por la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT), a excepción de una de ellas

que pertenecía a la colección privada del grupo de investigación BIO-175. Los patógenos seleccionados se indican a continuación:

- *Fusarium oxysporum f.sp. melonis* CECT 20474 (Fom)
- *Phytophthora capsici* CECT 20433 (Pcap)
- *Rhizoctonia solani* CECT 2824 (Rs)
- *Pythium ultimum* CECT 2365 (Pu)
- *Botrytis cinerea* CECT 20973 (Bc)
- *Alternaria sp.*-BIO175 (Alt)

Los hongos fitopatógenos se mantuvieron en cultivo activo en placas de medio de cultivo agar Patata Dextrosado (PDA), conservadas en cámara fría a 4 °C, o bien se conservaron a más largo plazo en crioviales estériles (DELTALAB, Ref. 409103), que fueron mantenidos a -80 °C. En el caso de los oomicetos *P. ultimum* y *P. capsici*, la conservación a largo plazo se llevó a cabo resuspendiendo un bloque de agar-PDA crecido con el oomiceto en agua estéril, y mantenido en condiciones de refrigeración a 4-8 °C.

La preparación de cultivos frescos de forma previa a su utilización en los ensayos de enfrentamiento en placa, implicó la resiembra de los cultivos conservados en cámara fría a nuevas placas de PDA, y posterior incubación a temperaturas en torno a 29-30 °C. Excepcionalmente, las placas con las nuevas resiembras de los oomicetos *P. ultimum* y *P. capsici* se incubaron a una temperatura de 25-26 °C.

3.4. Medios de cultivo y reactivos

Los medios de cultivo utilizados para llevar a cabo la caracterización enzimática de los extractos, así como aquellos empleados para la evaluación del carácter biopesticida son los siguientes:

Agar Patata Dextrosa (PDA)

Este medio de cultivo se empleó para el cultivo de hongos y oomicetos, así como para la realización de los enfrentamientos *in vitro* entre los hongos patógenos y los extractos acuosos de compost. Su preparación consistió en pesar 39 g del preparado comercial deshidratado (AppliChem Panreac, Ref. 413758), y se transfirió a un matraz con 1 litro de agua destilada. Después, la mezcla fue esterilizada en autoclave durante 20 minutos, a 121 °C y a 1 atmósfera de sobrepresión. Tras su enfriamiento, el medio se repartió en placas de Petri estériles, las cuales se conservaron en cámara fría a 4 °C y en oscuridad, hasta el momento de su empleo. Los componentes de este medio se muestran en la Tabla 1:

Componentes	Cantidad (g/L)
Extracto de patata	4
Dextrosa	20
Agar bacteriológico	15
Agua destilada	1 L

Tabla 1. Componentes del medio PDA

Agar Agua 2% (AA)

Para la elaboración del medio agar agua, se pesó 20 g de agar bacteriológico (PanReac AppliChem, 413758.1210) y se transfirió a un matraz con 1 litro de agua destilada. Se autoclavó durante 20 minutos a 121 °C y a 1 atmósfera de sobrepresión y se repartió en placas de Petri estériles, en capas finas. La composición de este medio de cultivo se muestra en la Tabla 2:

Componentes	Cantidad (g/L)
Agar bacteriológico	20
Agua destilada	1 L

Tabla 2. Componentes del medio Agar agua

Medio para detección de actividad Celulasa (según método modificado de Kasana y col., 2008)

En la Tabla 3 se muestran los componentes que conforman el medio para la detección de microorganismos productores de celulasa. El medio se preparó pesando cada uno de los elementos de forma independiente, en las cantidades requeridas para 1L y posteriormente, fue esterilizado en autoclave a 121 °C, durante 20 minutos y a 1 atmósfera de sobrepresión. Tras enfriar, el medio se repartió en placas de Petri estériles.

Componentes	Cantidad (g/L)
Celulosa microcristalina	2
NaNO ₃	2
K ₂ HPO ₄	1
MgSO ₄	0,5
KCl	0,5
Peptona bacteriológica	0,2
Agar	17
Agua destilada	1 L

Tabla 3. Componentes del medio para detección de actividad Celulasa

Medio para detección de actividad Proteasa (según método modificado de Geok y col., 2003)

El medio para detección de actividad proteasa se preparó a partir de los componentes indicados en la Tabla 4. Se mezclaron todos los componentes en un matraz con 1L con agua destilada y se autoclavó en las mismas condiciones descritas previamente. Una vez enfriado, se agitó para evitar la

precipitación de los componentes, y se repartió en placas de Petri estériles. Finalmente, las placas se conservaron en cámara fría a 4 °C y en oscuridad hasta el momento de su utilización.

Componentes	Cantidad (g/L)
Peptona	5
Extracto de Malta	3
Extracto de levadura	3
Leche descremada	10
Agar bacteriológico	20
Agua destilada	1 L

Tabla 4. Componentes del medio para detección de actividad Proteasa

Medio para detección de actividad Ligninasa-Peroxidasa (según método modificado de Rayner y Boddy 1988, en Falcón y col., 1995)

Este medio tiene como finalidad la detección de la actividad lignina-peroxidasa. Su preparación consistió en pesar 23,5 g de APHA de un preparado comercial deshidratado (Oxoid, Ref. CM0463), el cual se disolvió en un matraz con 1 litro de agua destilada. Después, la mezcla fue esterilizada en las mismas condiciones descritas previamente, y posteriormente se repartió en placas de Petri estériles. Finalmente, las placas se conservaron en cámara fría a 4 °C y en oscuridad hasta el momento de su empleo. Como reactivo de revelado, se preparó una solución acuosa de pirogalol al 1% (p/v) y una solución de peróxido de hidrógeno de 10 v al 13,3% (v/v). Los componentes de este medio se muestran en la Tabla 5:

Componentes	Cantidad (g/L)
Extracto de levadura	2,5
Glucosa	1
Agar bacteriológico	15
Enzima digestiva Caseína	5
Agua destilada	1 L

Tabla 5. Componentes del medio para detección de actividad lignina-peroxidasa

Medio para detección de actividad Amilasa (según método modificado de Hankin y Anagnostakis, 1975)

Este medio tiene como función la detección de la actividad amilolítica. Para su preparación se incorporaron todos los componentes en 1L de agua destilada (Tabla 6). Posteriormente, el medio se autoclavó en las mismas condiciones descritas previamente, y se repartió en placas de Petri estériles. Como reactivo revelador se preparó una solución de Lugol compuesta por I₂ al 1% y KI al 2% en agua.

Componentes	Cantidad (g/L)
Peptona	10
Extracto de carne	4
Cloruro sódico	5
Almidón	10
Agar	20
Agua destilada	1 L

Tabla 6. Componentes del medio para detección de actividad Amilasa

Medio para detección de actividad Quitinasa (según método descrito en García-Espejo y col., 2016)

Para su preparación se disolvieron todos los componentes en agua destilada, y se autoclavó a 121 °C durante 20 minutos a 1 atmósfera de presión. Por último, se dejó enfriar y se repartió en placas de Petri estériles. A continuación, en la Tabla 7, se muestran los componentes del medio de cultivo:

Componentes	Cantidad (g/L)
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,3
(NH ₄) ₂ SO ₄	3
KH ₂ PO ₄	2
Ácido cítrico	0,4
Agar	15
Tween 80	200 µL
Quitina coloidal	4,5
Púrpura de bromocresol	0,15
Agua destilada	1 L

Tabla 7. Componentes del medio para detección de actividad Quitinasa

Medio para detección de actividad Lipasa (según método modificado de Carrasco y col., 2012).

Para su preparación se disolvieron todos los componentes en 1L de agua destilada (Tabla 8). Durante la preparación del medio de cultivo, para mantener el medio bien emulsionado se incorporó Tween 80 y se mantuvo en constante agitación. Posteriormente se procedió a su autoclavado en las mismas condiciones descritas previamente. Por último, se dejó enfriar y se distribuyó en placas de Petri estériles, las cuales se mantuvieron en oscuridad a 4 °C hasta su utilización. En la siguiente tabla se muestran los elementos que componen este medio:

Componentes	Cantidad (g/L)
Peptona	5
Extracto de levadura	3
Tributirina	10
Tween 80	200 μ L
Agar bacteriológico	20
Agua destilada	1 L

Tabla 8. Componentes del medio para detección de actividad Lipasa

3.5. Diseño experimental

A continuación, se describe de forma esquemática el Diseño Experimental del trabajo realizado (Figura 2).

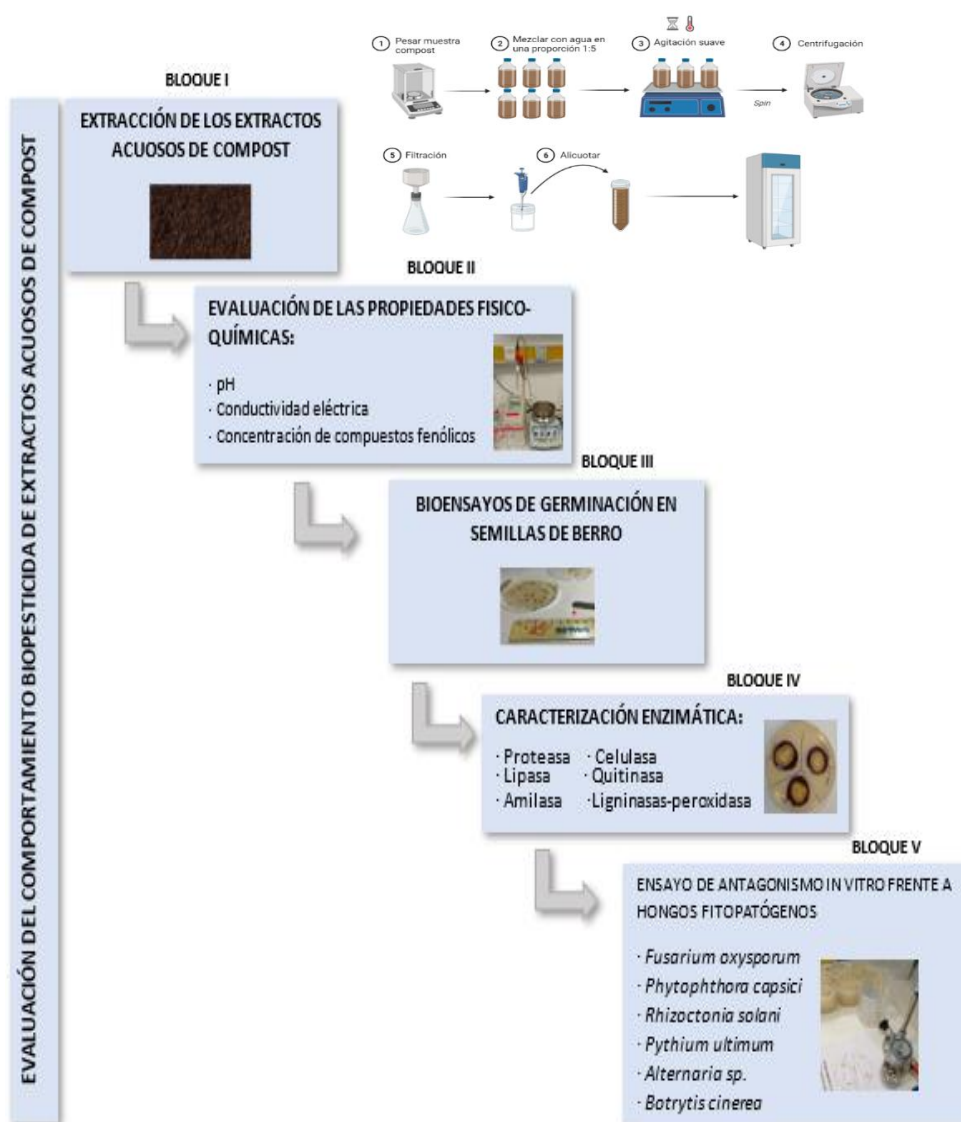


Figura 2. Diseño experimental

Dicho diseño pone de manifiesto la organización del trabajo en 5 Bloques experimentales, que pasan en primer lugar por la obtención de los extractos acuosos (Bloque I), seguido de la caracterización físico-química de los extractos (Bloque II), así como biológica (Bloques III y IV) y finalmente, la evaluación *in vitro* del carácter supresivo de los extractos frente agentes fitopatógenos de interés (Bloque V).

3.6. Caracterización Físico-Química de los extractos de compost

3.6.1. Determinación del pH de las muestras

La medida de pH se llevó a cabo a partir de un volumen de 10 mL de extracto en un pH-metro Crison Basic 20 (Figura 3) después de mantener la muestra en constante agitación durante 5 minutos.



Figura 3. Fotografía del pH-metro

3.6.2. Determinación de la conductividad eléctrica de las muestras

Las medidas de conductividad eléctrica se llevaron a cabo a partir de 10 mL de extracto en un conductímetro HI 2315 (Figura 4) y los resultados obtenidos fueron expresados en mS/cm a 25 °C. Durante la medición la muestra se mantuvo en agitación constante.



Figura 4. Fotografía del conductímetro

3.6.3. Determinación de la concentración de compuestos fenólicos

El contenido de fenólicos de las muestras de compost se evaluó mediante el método colorimétrico de Folin Ciocalteu descrito por Marambe y Ando (1991). Para ello, se preparó una solución inicial formada por 0,5 mL de extracto de compost, 7 mL de agua y 0,5 mL del reactivo Folin comercial (F9252- 500ML; Sigma-Aldrich). A continuación, se utilizó el vórtex para homogeneizar la mezcla y se mantuvo durante 3 minutos en reposo a temperatura ambiente. Transcurrido ese tiempo, se le añadió 1 mL de Na_2CO_3 al 20% (S/2880/60; 1 kg; Fisher Scientific) y 3 mL de agua destilada, y se volvió a agitar la mezcla para que quedase homogénea. Transcurrida 1 hora en oscuridad, se rellenó una placa de 96 pocillos con las distintas reacciones para su lectura en un espectrofotómetro de microplacas EON (Biotek, EE.UU.) a una absorbancia de 725 nm. La concentración total de los compuestos fenólicos se calculó a partir de una recta patrón. El contenido de fenólicos fue expresado en términos de mg/L.

El esquema representado en la Figura 5 muestra de forma resumida el protocolo básico aplicado para la determinación de la concentración de compuestos fenólicos.

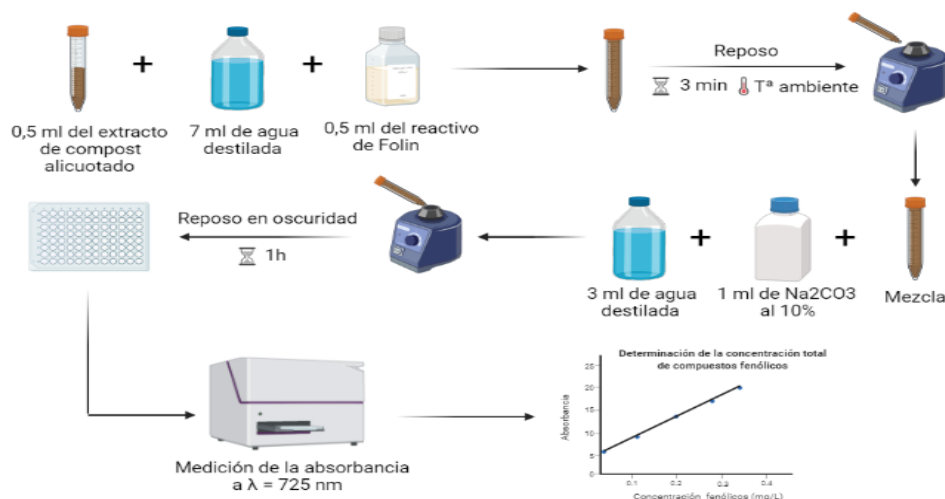


Figura 5. Representación del procedimiento realizado en la determinación de la concentración de fenólicos.

3.7. Caracterización biológica de los extractos de compost

3.7.1. Índice de germinación (Test de Zucconi)

Para evaluar el efecto fitoestimulante de los extractos acuosos de compost, se llevó a cabo un bioensayo de germinación en semillas de berro (*Lepidium sativum*) mediante la técnica propuesta por Zucconi y col. (1981). Mediante esta metodología se puede evaluar el efecto fitotóxico de compuestos puros o de mezclas complejas a través del crecimiento diferencial del sistema radicular de las plantas en respuesta a muestras de diversa naturaleza. De forma que, la evaluación del efecto fitotóxico incluye determinar el efecto sobre la germinación y la sobre la elongación de la radícula y del hipocotilo (Esteban, 2018).

Para abordar este bioensayo, se prepararon placas Petri de 9 cm de diámetro y en cada una de ellas, se dispuso un papel de filtro estéril, al cual se le añadió 2 mL de cada uno de los extractos de compost diluidos 1/10. Posteriormente, sobre el papel humectado, se colocaron 25 semillas de berro por placa, de forma equidistante, con ayuda de unas pinzas de acero estériles. Se evaluaron un total de 50 semillas por extracto (2 grupos de 25 semillas). Todas las placas se incubaron protegidas de la luz a 25 °C durante 48 h.

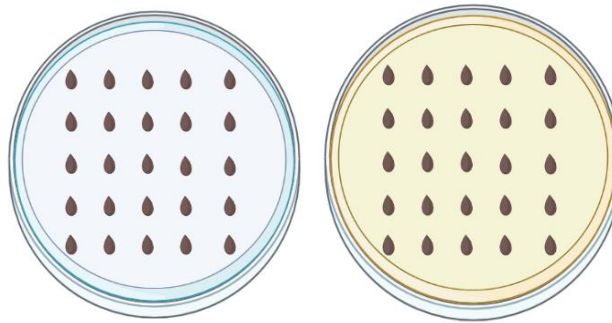


Figura 6. Diseño de placa con semillas para el Test de Zucchini. Placa control con agua destilada estéril (izquierda) y placa con extracto de compost diluido (derecha)

Una vez transcurrido el tiempo de incubación, se realizó la medición de la longitud de las radículas. Para calcular el Índice de Germinación (IG) respecto a las placas control, se empleó la siguiente fórmula:

$$IG = \left(\frac{\%G \times L}{\%Gc \times Lc} \right) \times 100$$

Donde:

%G: Porcentaje de semillas germinadas en presencia del extracto.

L: Promedio de longitud de la radícula (mm) en presencia del extracto.

%Gc: Porcentaje de semillas germinadas en las placas control.

Lc: Promedio de longitud de la radícula (mm) en placas control.

Los valores del índice de germinación se pueden clasificar en función del grado de fitotoxicidad, tal y como se recoge en la Tabla 9:

Valor IG	Grado de Fitotoxicidad
< 50	Alto
50 < IG < 80	Moderado
80 < IG < 100	Fitotoxicidad no confirmada
> 100	Fitoestimulante

Tabla 9. Clasificación del grado de fitotoxicidad según valores de Índice de Germinación (Hitzl, Mendez y Renz, 2018).

3.7.2. Caracterización enzimática: Ensayos cualitativos

Los extractos de compost fueron caracterizados enzimáticamente mediante un catálogo de pruebas cualitativas dirigidas a predecir el potencial biopesticida de los extractos (Figura 7).

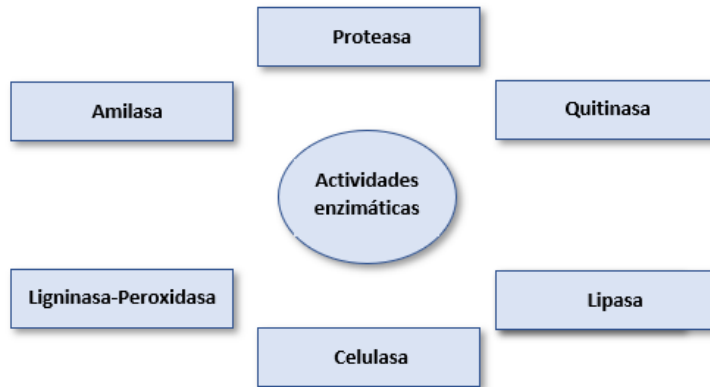


Figura 7. Actividades enzimáticas evaluadas en este trabajo.

Todas las pruebas enzimáticas se llevaron a cabo en placas de Petri estériles con medios de cultivo específicos para cada actividad enzimática a evaluar (ver apartado 3.4.). Para cada determinación enzimática, se consideraron 3 repeticiones por extracto. Con tal propósito, se colocó una gota de 20 μL de cada extracto sobre la superficie de la placa con el medio de cultivo específico y, tras esperar el tiempo necesario para la absorción de la gota, las placas se incubaron a 30 °C en oscuridad. El tiempo de incubación para los medios para determinar las actividades proteasa, amilasa, lipasa y ligninasa-peroxidasa fue de 48 h, mientras que en el caso de los medios para evaluar actividades celulasa y quitinasa fue de 7 días. En la Figura 8 se ilustra la ejecución del bioensayo.

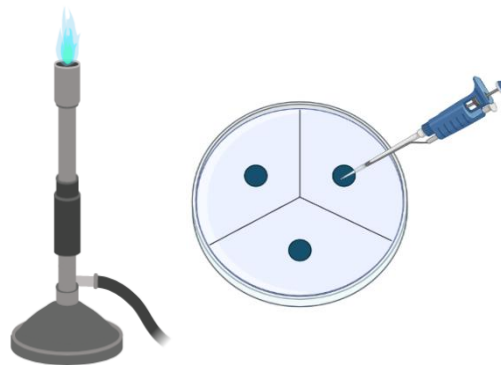
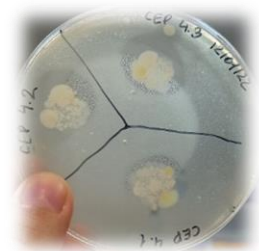


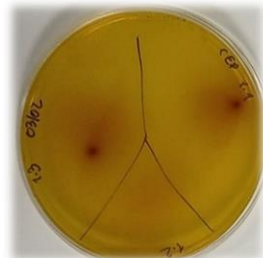
Figura 8. Representación del bioensayo de caracterización enzimática

Tras el periodo de incubación, en cada caso, se procedió a realizar la lectura de las diferentes actividades para cada extracto:

- **Actividad Proteasa:** Esta actividad se determinó siguiendo el método descrito por Geok y col. (2003). Aquellos extractos con actividad proteolítica, dieron lugar a la formación de halos de aclaramiento en el medio, debido a la hidrólisis de la caseína presente en la leche descremada.



- **Actividad Amilasa:** Se evaluó a partir del método descrito por Hankin y Anagnostakis (1975). En este caso, tras la adición del reactivo de revelado, solución de lugol (I_2 al 1% mezclado con KI al 2% en agua), una lectura positiva se obtenía mediante la visualización de un halo de aclaramiento en torno al extracto.
- **Actividad Celulasa:** Se evaluó atendiendo al método descrito por Kasana y col. (2008). Los extractos con esta actividad provocaron el aclaramiento del medio de cultivo en la zona de inoculación de la gota, debido a la hidrólisis de la celulosa, a diferencia del control negativo que mostraba un color marrón más intenso.
- **Actividad lipasa:** Se evaluó mediante la aplicación del método descrito por Carrasco y col. (2012). En este caso, la lectura positiva para la hidrólisis de la tributirina (componente del medio de cultivo), se confirmó gracias a la presencia de halos de aclaramiento en el medio.
- **Actividad ligninasas-peroxidasa:** Esta actividad se determinó a través del método propuesto por Falcon et al. (1995) y Rayner et al. (1988). Para realizar su lectura, se incorporó el reactivo de revelado consistente en una mezcla de una solución acuosa de pirogalol al 1% (p/v) con una solución de peróxido de hidrógeno al 13,3%. De este modo, los extractos con actividad ligninolítica-peroxidasa mostraron una coloración marrón intensa en torno a la gota.
- **Actividad quitinasa:** Por último, esta actividad se evaluó a partir del método descrito por García-Espejo y col. (2016), utilizando como indicador de pH el púrpura de bromocresol, como componente del medio de cultivo. La actividad quitinasa se confirmó con un cambio de color amarillo a púrpura alrededor del extracto sembrado debido a la degradación de quitina en N-acetil glucosamina.



3.7.3. Espectro antagónico de los extractos frente al crecimiento de hongos y oomicetos fitopatógenos

De acuerdo a los objetivos planteados, la evaluación de la actividad biopesticida de los extractos frente al crecimiento de los hongos y oomicetos fitopatógenos indicados en el apartado 3.3., se llevó a cabo mediante el protocolo de cultivo dual descrito por Suárez-Estrella y col. (2014). Habida cuenta de las

características específicas de los cuatro protocolos de extracción utilizados, resultaba lógico encontrar diferencias en cuanto al potencial inhibidor de los extractos. Con tal propósito, se prepararon placas de Petri estériles con doble capa de medio de cultivo, una primera de agar agua al 2% (AA), dispuesta en una fina capa que sirvió como medio base. Una vez solidificada esta primera capa, se colocaron de forma equidistante cuatro cilindros estériles de acero inoxidable (Torrecillas de Oxford) con un diámetro de 8 mm, con ayuda de pinzas estériles (Figura 9). Posteriormente, se adicionó una segunda capa de medio PDA a sobrefusión y, una vez solidificado, se procedió a retirar los cilindros formándose como resultado, cuatro pocillos en cada una de las placas.

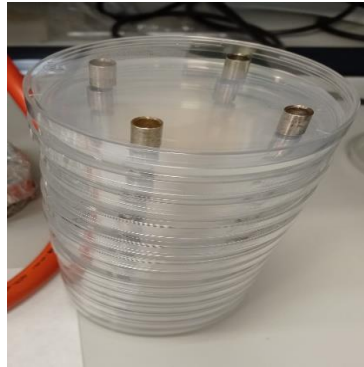


Figura 9. Preparación de las placas para la realización de los ensayos en cultivo dual.

Una vez preparadas las placas con pocillos, y con ayuda de un sacabocados estéril de 5 mm de diámetro, se dispuso un bloque de cultivo del agente patógeno previamente crecido en medio PDA, en el centro de la placa, quedando en una posición equidistante a los pocillos (Figura 10). En el interior de los cuatro pocillos de cada placa, se vertieron 60 μ l del extracto. Cada enfrentamiento se llevó a cabo por triplicado. De forma paralela, se sembraron placas control con los agentes patógenos en ausencia de extracto. Para finalizar, las placas sembradas se incubaron a diferentes temperaturas, de manera que en el caso de *Fusarium oxysporum*, *Rhizoctonia solani* y *Alternaria sp.* se incubaron a 30 °C, mientras que *Phytophthora capsici* y *Pythium ultimum* se incubaron a 25 °C.

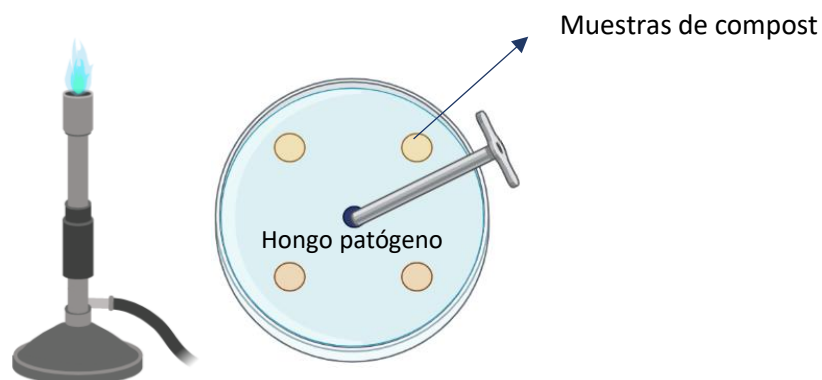


Figura 10. Enfrentamiento entre agente fitopatógeno y extracto de compost.

La medida del crecimiento de los hongos fitopatógenos, se evaluó después de 48 horas en el caso de *Pythium ultimum* y *Botrytis cinerea*, a los 3 días en el caso de *Rhizoctonia solani*, a los 5 días *Alternaria sp.* y a los 7 días en el caso de *Fusarium oxysporum* y *Phytophthora capsici*. El grado de inhibición se calculó teniendo en cuenta los diámetros de crecimiento de los agentes fitopatógenos tanto en presencia como en ausencia de los extractos, atendiendo a la siguiente fórmula (Figura 11):

$$I\% = \left(100 - \frac{D1 + D2}{Dc} \right) \times 100$$

Donde:

I%: Índice de inhibición de crecimiento del agente patógeno en presencia del extracto

D1/D2: Diámetro de crecimiento (mm) del agente patógeno en presencia del extracto

Dc: Diámetro promedio de crecimiento (mm) del agente patógeno en ausencia de extracto (control)

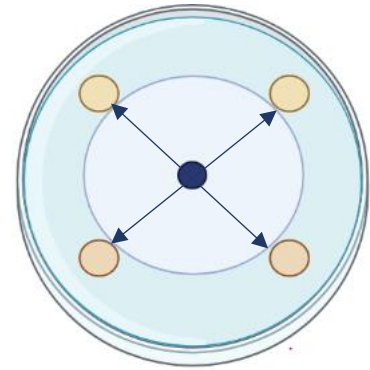


Figura 11. Determinación del Índice de inhibición en el ensayo de antagonismo *in vitro*.

3.8. Análisis estadístico

El análisis estadístico de los resultados obtenidos en los diferentes ensayos fue evaluado mediante el paquete estadístico Statgraphics Centurion 18 (Statistical Technologies, Inc.). Para ello se llevó a cabo un análisis de la varianza (ANOVA) multifactorial con los datos obtenidos teniendo en cuenta los distintos factores de variabilidad (Material de partida y Protocolo de extracción). En paralelo se llevó a cabo un Test de Mínima Diferencia de Fisher (LSD) a un intervalo de confianza del 95% ($p < 0,05$), con el objetivo de establecer diferencias significativas entre los distintos niveles de cada factor.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos en las diferentes etapas del trabajo se detallan a continuación. El primer bloque de resultados está relacionado con las propiedades físico-químicas de los extractos de compost, concretamente el pH, la conductividad eléctrica y la concentración de compuestos fenólicos. En segundo lugar, se mostrarán los resultados relacionados con la caracterización enzimática cualitativa de los extractos. Para finalizar, se mostrarán y discutirán los resultados relativos tanto a los bioensayos de germinación de semillas de berro, como a los bioensayos de antagonismo frente a hongos y oomicetos fitopatógenos.

4.1. Caracterización físico-química de los extractos de compost

A continuación, se describen los resultados relacionados con la caracterización físico-química de los extractos: pH, conductividad y compuestos fenólicos.

4.1.1. Determinación del pH de las muestras

En primer lugar, se evaluó el pH de los extractos de compost obtenidos a partir de los cuatro protocolos de extracción descritos en el apartado 3.2. de Material y Métodos. De forma general, el pH de los extractos osciló entre 7,9 y 8,4 (Figura 12A).

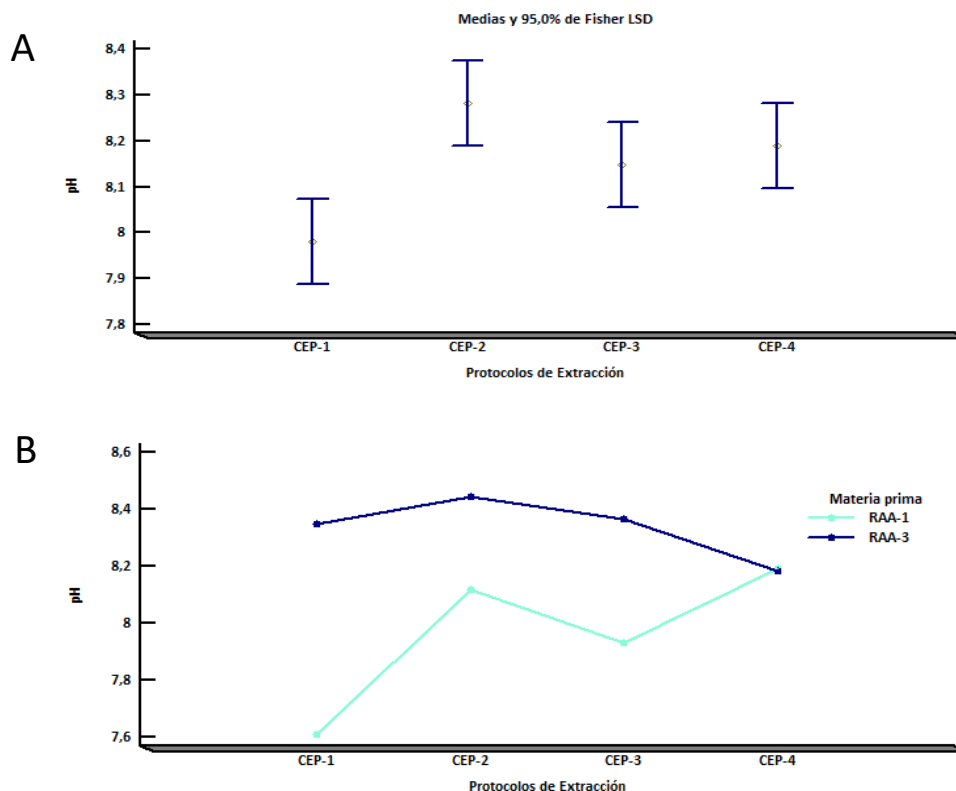


Figura 12. (A) Test de Mínima Diferencia Significativa de Fisher (LSD) al 95% de confianza en relación a la variable pH de las muestras; (B) Representación gráfica de la variable pH respecto a la interacción entre los factores "Protocolo de Extracción x Materia prima".

El carácter alcalino de estos extractos fue el típicamente mostrado en compost maduros y, en cualquier caso, puede considerarse del todo compatible con la presencia de grupos microbianos de distinta naturaleza (Moreno y Mormeneo, 2008). Algunos autores destacan que un proceso de compostaje con la aireación apropiada genera productos finales con un valor de pH entre 7 y 8, en cambio, valores por debajo de ese intervalo, podrían ser indicativos de problemas de anaerobiosis, dando como resultado

un compost inmaduro y de baja calidad agronómica (Silva y col., 2014; Millán y col., 2018). En este trabajo, los extractos procedentes de los protocolos CEP-2, CEP-3 y CEP-4 fueron en general más alcalinos, entre 8,1 y 8,4, mientras que los extractos procedentes del protocolo CEP-1 mostraron valores de pH ligeramente más bajos, aunque también muy cercanos a 8.

Otro hecho a considerar es cómo influye el tipo de compost utilizado, sobre los valores de pH de los distintos extractos. En la Figura 12B, se puede observar que los valores de pH de los extractos, fueron muy diferentes en función de la procedencia de los compost. Los valores de pH a partir de los extractos RAA-1 fueron muy variables y dependientes del protocolo de extracción, oscilando entre valores de 7,6 y 8,2. Sin embargo, los valores de pH fueron más similares, entre 8,2 y 8,4, y menos dependientes de los protocolos de extracción, en el caso del compost RAA-3. Es posible que las diferencias observadas respecto al pH se deban, no sólo a las características de los protocolos de extracción, sino también a las peculiaridades intrínsecas de cada materia prima, las cuales, aún siendo similares, pudieron ser muy distintas en cuanto a composición, y condiciones operacionales aplicadas durante el proceso de compostaje.

4.1.2. Determinación de la conductividad eléctrica de las muestras

Cabe destacar que la conductividad eléctrica de los extractos osciló entre 6,8 y 9,2 mS/cm (Figura 13A), en función del protocolo de extracción aplicado. Teniendo en cuenta que, valores de conductividad por encima de 4 mS/cm, podrían ser indicativos de un alto contenido de sales en los extractos, cabría esperar que estos provocaran efectos negativos sobre la germinación de las semillas, ya que en todos los casos se supera dicho valor (Lasaridi y col., 2006). Respecto a las diferencias observadas entre protocolos, en términos generales los extractos CEP-1, CEP-3 y CEP-4 oscilaron en un rango de conductividad en torno a 6,8 y 8,4, seguidos de los extractos CEP-2, que mostraron valores de salinidad significativamente superiores llegando incluso a superar conductividades de 9,2 mS/cm.

Por otro lado, teniendo en consideración la influencia del tipo de compost respecto a los resultados de conductividad eléctrica (Figura 13B), se pudo observar una menor variabilidad de los datos a partir de los extractos procedentes de RAA-1, oscilando estos entre 7,6 y 9,0 mS/cm. En este caso concreto, no se detectaron claras diferencias significativas para la conductividad a partir de los extractos RAA-1. Sin embargo, los extractos derivados del compost RAA-3, si mostraron valores de conductividad muy variables y diferentes, en función de los protocolos aplicados. Así, los datos más bajos de conductividad se recogieron a partir de los extractos CEP-1 y CEP-3. No obstante, en este último caso, se esperaba obtener una conductividad superior, ya que el protocolo alcanza los 70 °C y podría favorecer la presencia de sales solubles en el extracto (Visconti y de Paz, 2016).

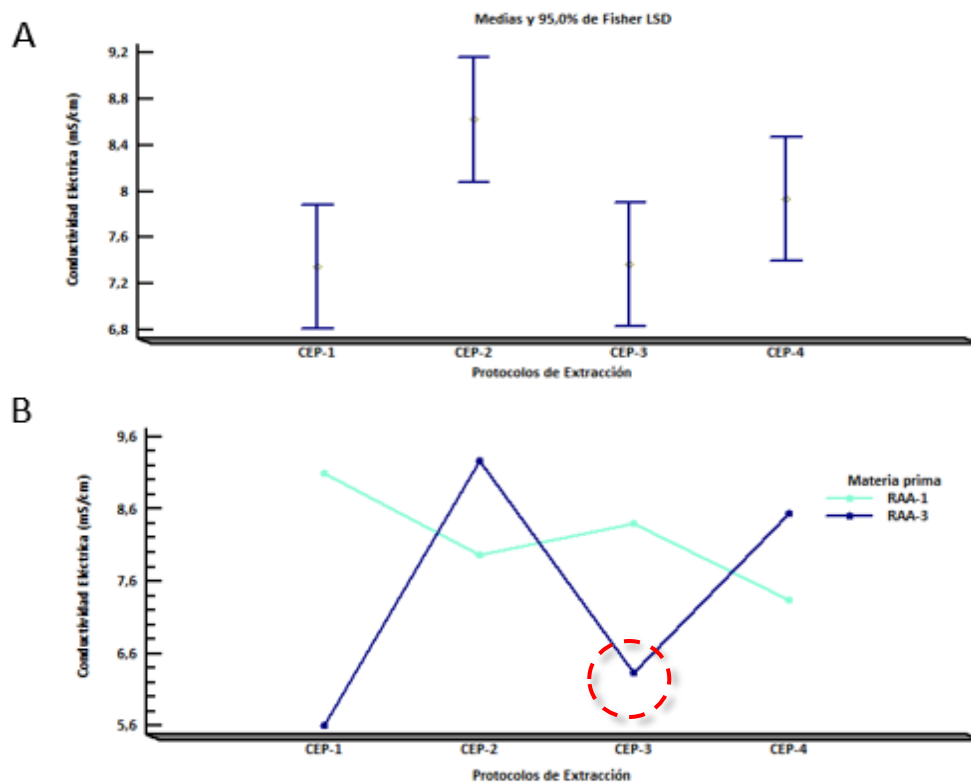


Figura 13. (A) Test de Mínima Diferencia Significativa de Fisher (LSD) al 95% de confianza para la variable conductividad eléctrica (mS/cm); (B) Representación gráfica de la variable Conductividad Eléctrica (mS/cm) respecto a la interacción “Protocolo de Extracción x Materia prima”.

4.1.3. Determinación de la concentración de compuestos fenólicos

La presencia de compuestos fenólicos en los extractos merece especial atención, ya que pueden afectar negativamente al índice de germinación de semillas (Morthup y col., 1998).

En líneas generales, fue tras la aplicación del protocolo CEP-3 cuando se obtuvieron las mayores concentraciones de compuestos fenólicos, en torno a 240-270 mg/L (Figura 14A). Este resultado podría explicarse en función de las características intrínsecas al protocolo CEP-3, siendo este en el que se aplicaron las temperaturas más elevadas de extracción (70 °C). En relación al resto de protocolos que utilizaron temperaturas de extracción más suaves, la concentración de fenólicos en los extractos fue significativamente menor, no superando en general, los 100 mg/L.

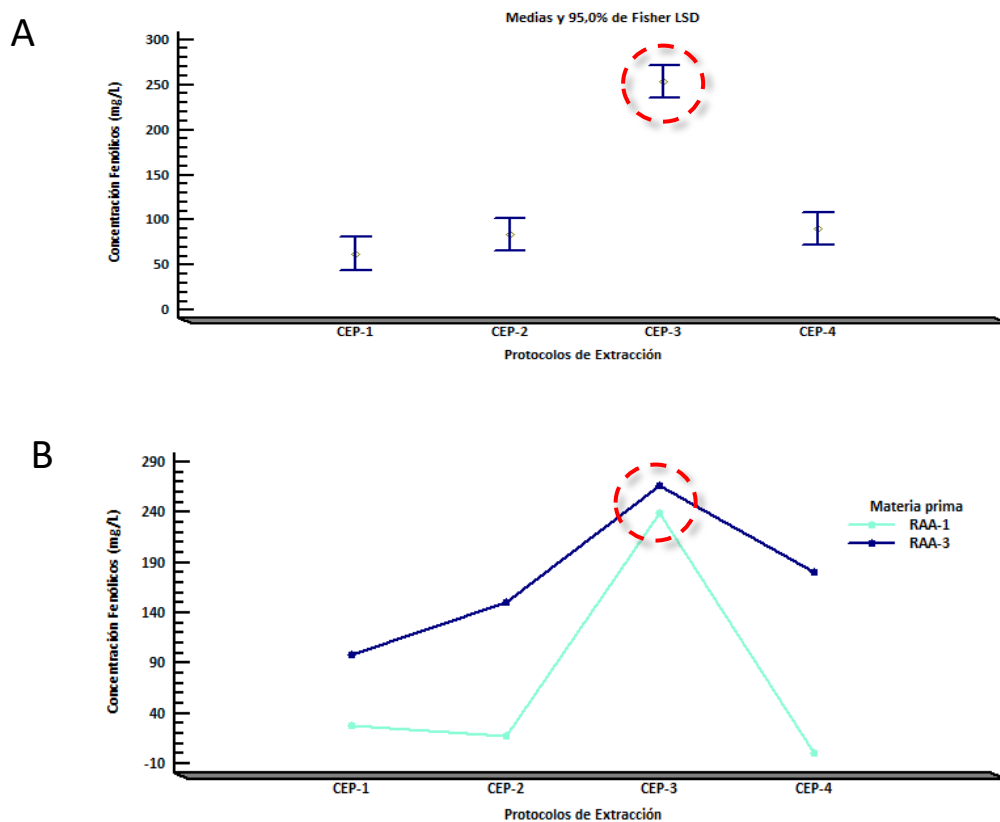


Figura 14. (A) Test de Mínima Diferencia Significativa de Fisher (LSD) al 95% de confianza respecto a la variable concentración de compuestos fenólicos (mg/L); (B) Representación gráfica de la concentración de fenólicos (mg/L) respecto a la interacción “Protocolo de Extracción x Materia prima”.

La composición de las muestras de compost utilizadas para la obtención de extractos, fue determinante a la hora de extraer distintas cantidades de compuestos fenólicos. De este modo, en líneas generales, la concentración de fenólicos fue siempre superior a partir de los extractos derivados del compost RAA-1. En cualquier caso, la aplicación del protocolo CEP-3 dio lugar a la extracción de cantidades similares de fenólicos a partir de ambas muestras (Figura 14B).

4.2. Caracterización biológica de los extractos de compost

4.2.1. Índice de germinación (Test de Zucchini)

El cálculo del Índice de Germinación (IG) resulta de gran utilidad a la hora de determinar la posible fitotoxicidad de extractos de compost sobre los estados más tempranos de desarrollo vegetal (Zucchini y col., 1981). Para ello se tiene en cuenta el porcentaje de germinación de semillas indicadoras, como es el caso del berro (*Lepidium sativum*), y la longitud de la radícula. En términos generales, el carácter fitotóxico de una muestra de compost va a estar determinado por la idoneidad del proceso llevado a cabo, de forma que si el compostaje se realiza correctamente, dando lugar a un compost estabilizado y maduro, se elimina el riesgo de fitotoxicidad y, en contrapartida, se potencia el carácter biofertilizante y fitoestimulante del producto final (Selim y col., 2012).

En la Figura 15A se representan los valores globales de IG en función del protocolo de extracción. En ella se establecen 3 grupos de homogeneidad claramente diferenciados. Por un lado, el grupo formado por los protocolos CEP-1 y CEP-2, en los que se detectaron valores de IG no fitotóxicos (80-100%); en segundo lugar, el grupo formado exclusivamente por los extractos derivados del protocolo CEP-3, que mostró un efecto claramente fitotóxico; y por último, el grupo formado por los extractos derivados del protocolo CEP-4, los cuales mostraron un ligero efecto fitoestimulante.

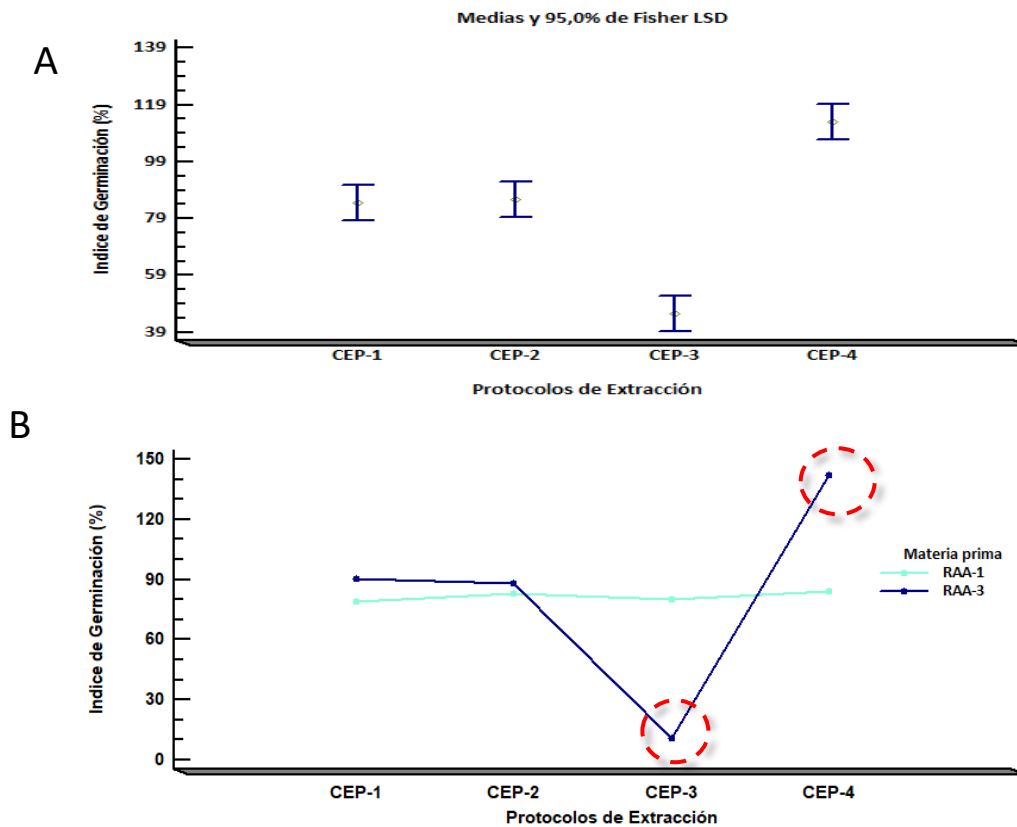


Figura 15. (A) Test de Mínima Diferencia Significativa de Fisher (LSD) al 95% de confianza para el Índice de Germinación (%); (B) Representación gráfica del Índice de Germinación (%) respecto a la interacción “Protocolo de Extracción x Materia prima”.

Por otra parte, tal y como se observa en la Figura 15B, el valor del Índice de Germinación (IG) en semillas de berro no se vio afectado por el protocolo de extracción en el caso de los extractos derivados de RAA-1, alcanzándose valores de IG neutros, en torno al 80%. Sin embargo, en el caso de los extractos derivados de RAA-3, se observaron grandes diferencias en función del protocolo aplicado. Así, los extractos CEP-1 y CEP-2 mostraron porcentajes de germinación en torno al 90%, mientras que los extractos CEP-3 fueron extremadamente fitotóxicos (IG < 20%).

Varios autores han relacionado negativamente la inmadurez y fitotoxicidad de un compost con la salinidad, la relación C/N y los fenoles solubles totales (Barral y Paradelo, 2011; Luo y col., 2018; Mohamed y col., 2020). A la vista de los resultados obtenidos, es evidente que el carácter fitotóxico de un determinado extracto de compost no está determinado por un único factor, sino que puede ser debido a una combinación de factores, que en conjunto afectan al desarrollo temprano de la planta. De forma sorprendente, se detectaron valores de IG superiores al 130% con la aplicación de extractos

derivados del protocolo CEP-4 a partir de la muestra RAA-3, lo que se interpretó como un efecto fitoestimulante muy relevante, en comparación a lo observado para el resto de extractos.

4.2.2. Caracterización enzimática: Ensayos cualitativos

La caracterización enzimática cualitativa de los extractos de compost obtenidos a partir de los diferentes protocolos de extracción, se llevó a cabo mediante la siembra en medios de cultivo selectivos para la determinación de las proteasa, peroxidasa, lipasa, amilasa, celulasa y quitinasa (apartado 3.4.). Dichas actividades se encuentran relacionadas directa o indirectamente con el efecto biopesticida de los extractos (Jurado y col., 2014; Chaibub y col., 2016; Philip y col., 2020).

En términos generales, se puso de manifiesto que los extractos procedentes del compost RAA-1 mostraron una mayor diversidad enzimática, en contraste con los resultados obtenidos a partir de los extractos RAA-3 (Figura 16). Cabe destacar que no se detectó actividad quitinasa, a partir de ninguno de los extractos evaluados. Por otra parte, en los extractos procedentes del compost RAA-3, además de la ausencia de actividad quitinasa, se pudo detectar un descenso de la biodiversidad enzimática sobre todo a partir de los extractos CEP-3 y CEP-4, a partir de los cuales tampoco fue posible detectar actividad amilasa.

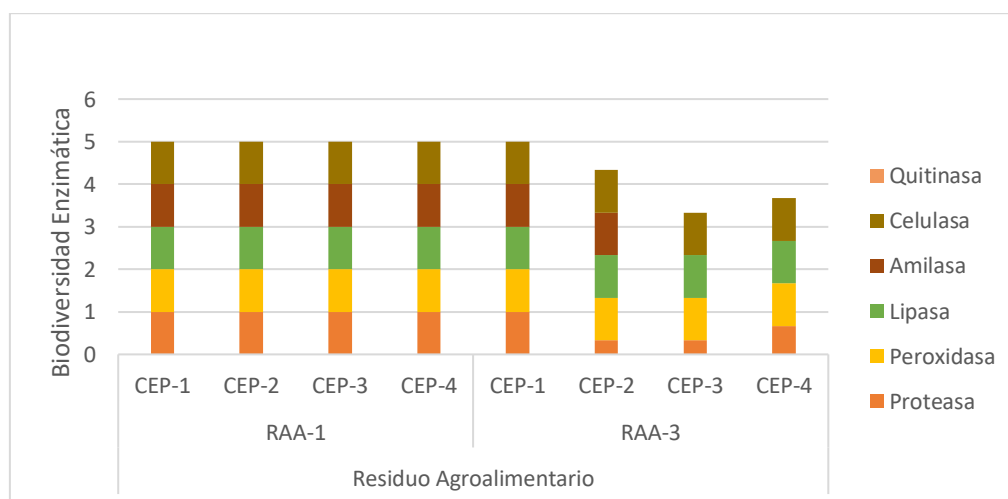


Figura 16. Caracterización de los perfiles de Biodiversidad enzimática cualitativa a partir de los extractos de compost obtenidos mediante los distintos protocolos de extracción.

En la Figura 17, se muestran las fotografías que ponen de manifiesto algunas de las actividades enzimáticas detectadas a partir de los extractos.

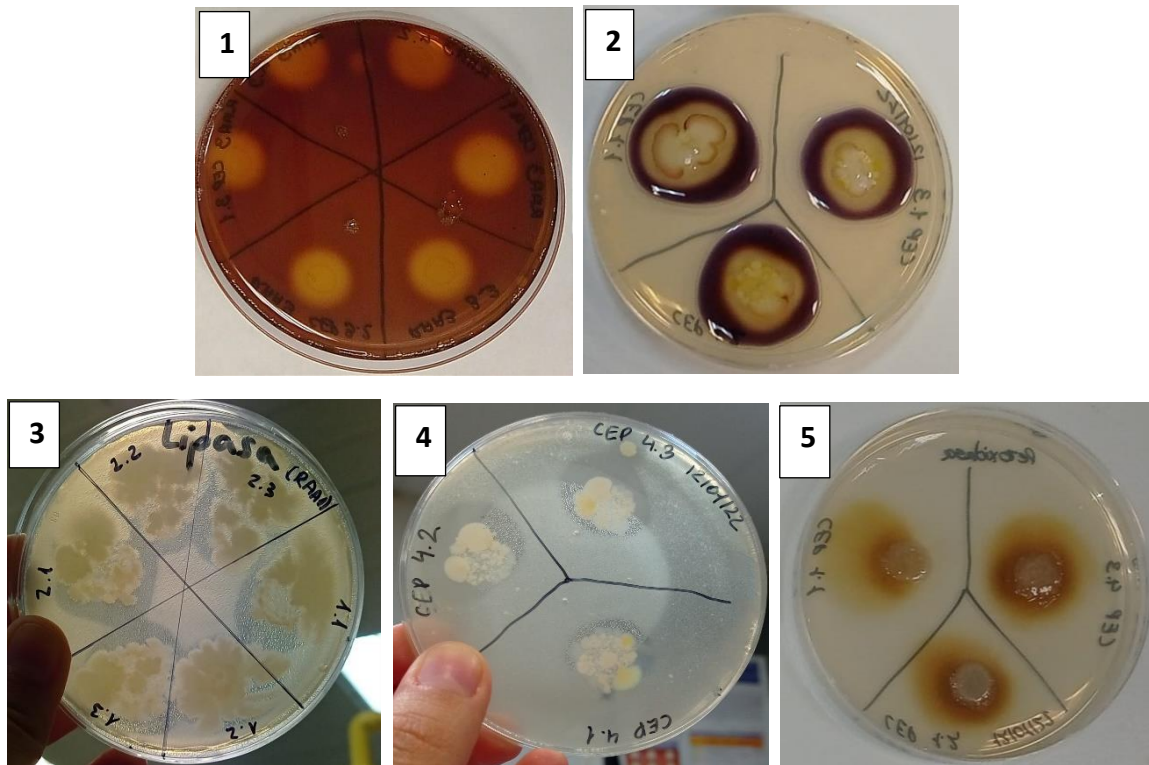


Figura 17. Lectura de las pruebas realizadas para la evaluación de la biodiversidad enzimática. 1: Actividad celulolítica; 2: Actividad amilolítica; 3: Actividad lipolítica; 4: Actividad proteolítica; 5: Actividad ligninolítica-peroxidasa.

4.2.3. Espectro antagonico de los extractos frente al crecimiento de hongos y oomicetos fitopatogénos

Hoy día, el compost y sus extractos acuosos son considerados una fuente importante de microorganismos beneficiosos, que muestran múltiples capacidades. Destaca la capacidad para actuar como biopesticidas frente a otros agentes fitopatogénos productores de enfermedades tan relevantes como el *damping-off* o la podredumbre gris (Bernal-Vicente y col., 2008; Koné y col., 2010; Pane y col., 2014; Mengesha y col., 2017). Así, el último objetivo de este Trabajo Fin de Grado consistió en evaluar la actividad antagonista *in vitro* de los extractos de compost frente al crecimiento de diferentes hongos y oomicetos fitopatogénos. Los agentes fitopatogénos evaluados se agruparon en función del tipo de transmisión y del daño provocado en la planta:

- **Hongos vasculares:** *Rhizoctonia solani*, *Fusarium oxysporum* f.sp. *melonis*
- **Oomicetos vasculares:** *Pythium ultimum* y *Phytophthora capsici*
- **Hongos foliares:** *Botrytis cinerea* y *Alternaria alternata*

En la Figura 18, se muestra el Índice de Inhibición (%) del crecimiento de hongos y oomicetos fitopatogénos tras ser enfrentados a los distintos extractos de compost. En términos generales, los extractos procedentes del compost RAA-1 presentaron un espectro antagonista más amplio que los procedentes del compost RAA-3 (Figura 18A). Cabe destacar, además, que la inhibición del crecimiento del oomiceto *Pythium ultimum* fue mínima o incluso indetectable (Figura 18A y 18B), hecho que puso

de manifiesto la baja susceptibilidad de este agente fitopatógeno a los extractos de compost ensayados. Por otra parte, mientras que los extractos CEP-2 y CEP-4 procedentes de la muestra RAA-1, fueron especialmente efectivos frente a *R. solani* (Figura 18A), los extractos CEP-2, CEP-3 y CEP-4 procedentes de RAA-3, lo fueron frente al oomiceto *P. capsici*. Este hecho reveló que la susceptibilidad de los agentes fitopatógenos a los distintos extractos de compost tiene un carácter altamente específico, y viene determinada por las propiedades físico-químicas y biológicas de dicho extracto.

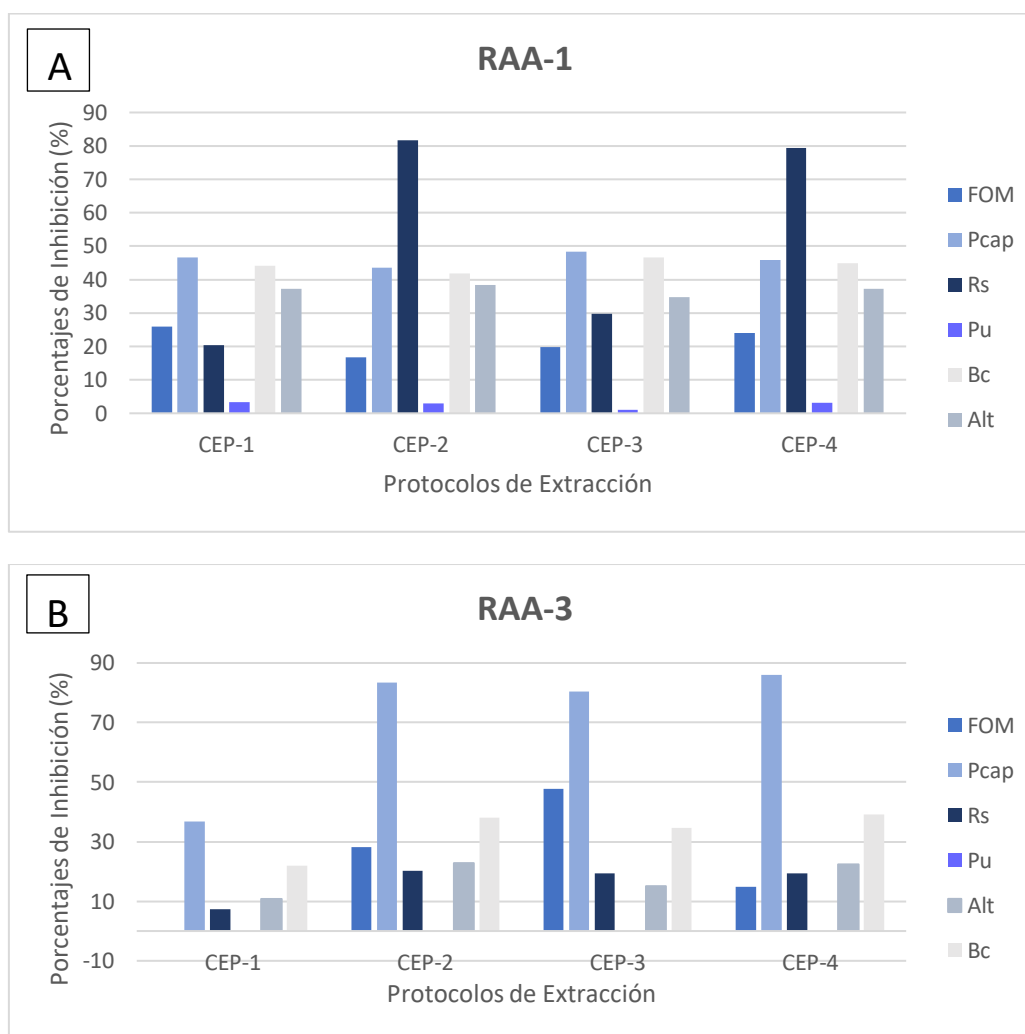


Figura 18. Representación gráfica de los porcentajes de inhibición del micelio de los hongos causados por los extractos acuosos de compost correspondientes a los residuos RAA-1 (A) y RAA-3 (B).

Los resultados obtenidos en este trabajo con respecto a *P. ultimum*, discrepan de aquellos observados en otros trabajos similares en los que se han llegado a detectar porcentajes de inhibición entre 30 y 60% (Sánchez San Fulgencio y col., 2018). Estos resultados revelan que el control de *P. ultimum* puede ser extremadamente dependiente de las características del compost y de sus extractos.

A continuación, se representa el efecto inhibitorio global respecto a los protocolos de extracción, sin tener en cuenta la procedencia de los compost. En la Figura 19 se muestran los resultados de inhibición (%) relativos a los hongos productores de daños foliares (*B. cinerea* y *A. alternata*) y en la Figura 20

aquellos que corresponden a hongos y oomicetos vasculares (*F. oxysporum* f.sp. *melonis*, *P. capsici* y *P. ultimum*).

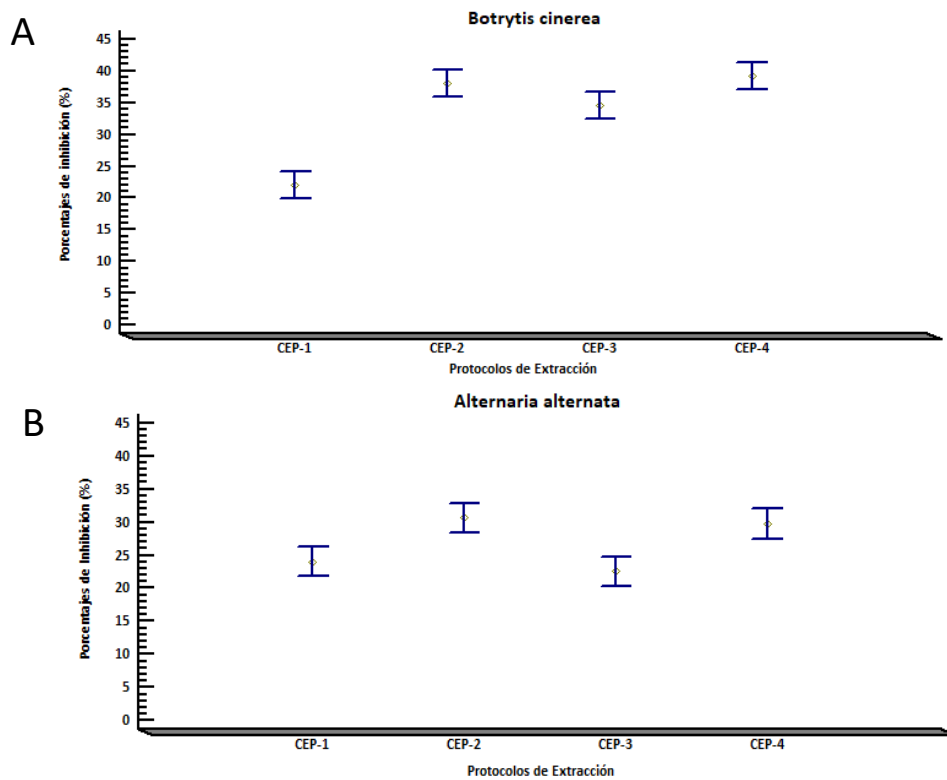


Figura 19. Test de Mínima Diferencia Significativa de Fisher (LSD) al 95% de confianza para los hongos foliares *Botrytis cinerea* (A) y *Alternaria alternata* (B).

Globalmente, los extractos derivados del protocolo CEP-1 dieron lugar a los valores más bajos de inhibición frente a los seis patógenos ensayados (Figuras 19 y 20). Sólo en el caso de *A. alternata* los resultados de inhibición provocados por los extractos CEP-3 fueron similares a los observados en CEP-1 (Figura 19A). A la vista de los resultados observados en ambas figuras, salta a la vista que la respuesta de los distintos hongos y oomicetos a la presencia de los extractos de compost es muy variable. El índice de inhibición para el crecimiento de hongos foliares osciló en un rango de 20-40% (Figura 19), aproximadamente, mientras que en el caso de *F. oxysporum* f.sp. *melonis* el intervalo un poco más amplio, aunque se detectaron valores más bajos (11-36%) (Figura 20A). Fueron más notables, sin embargo, los valores de inhibición mostrados por parte de *R. solani* y *P. capsici*, ya que en algunos casos se alcanzaron valores de inhibición superiores al 50% o 65%, respectivamente (Figuras 20B y C). Las determinaciones realizadas en este trabajo tienen solo un carácter preliminar a la hora de explicar de forma objetiva la respuesta de los patógenos a la presencia de los extractos de compost ya que, la capacidad antagonista de un extracto de compost puede ser de muy diverso origen e implicar la presencia de grupos microbianos específicos, o la presencia de enzimas, antimicrobianos o compuestos bioactivos como el ácido salicílico o el cianuro de hidrógeno, entre otros (Wu y col., 2008).

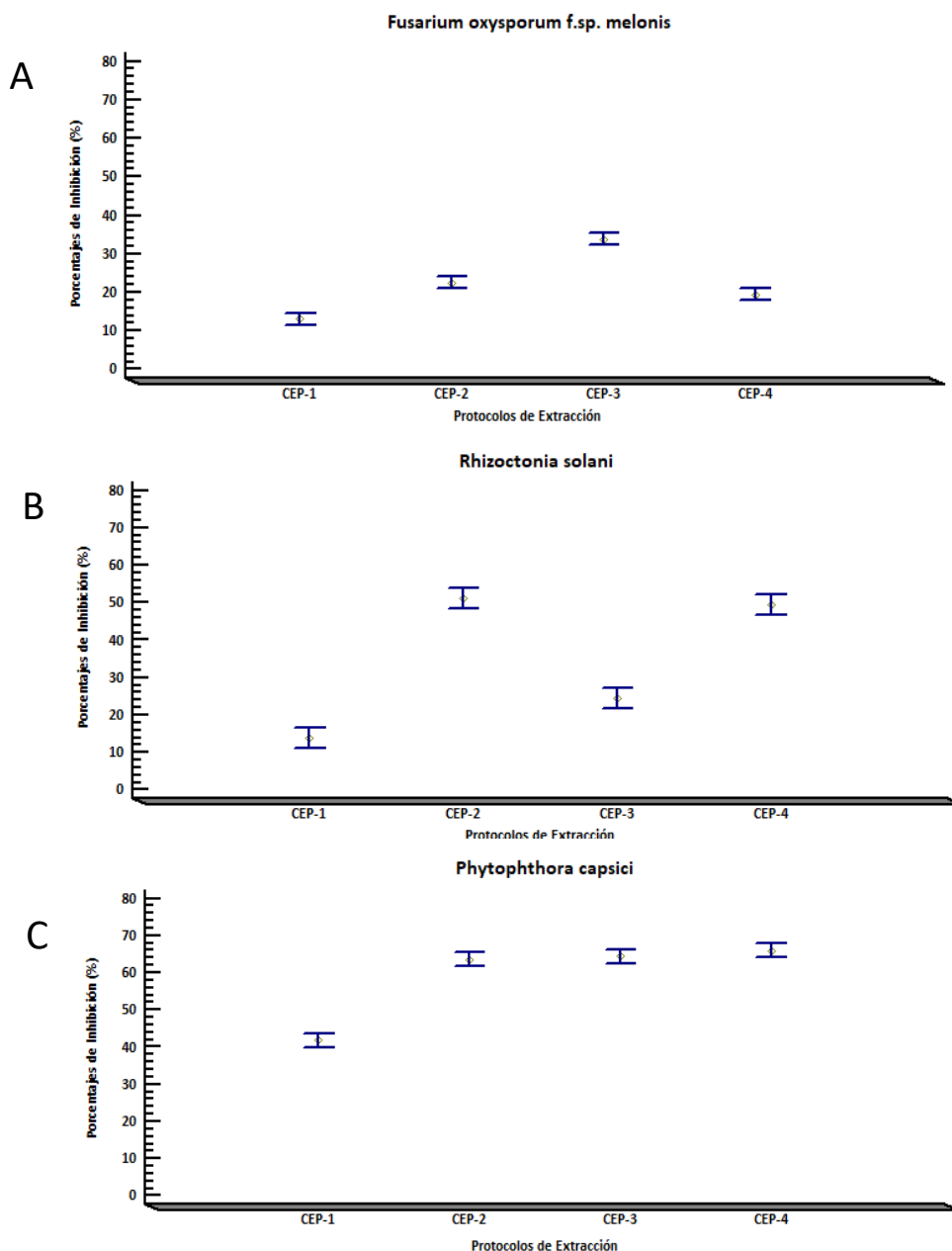


Figura 20. Test de Mínima Diferencia Significativa de Fisher (LSD) al 95% de confianza para los hongos vasculares *Fusarium oxysporum* (A), *Rhizoctonia solani* (B) y *Phytophthora capsici* (C).

El-Masry y col. (2002) pudieron confirmar que determinados extractos acuosos de compost eran supresores de patógenos transmitidos por el suelo y que esta supresión difería según el tipo de extracto. En términos generales el efecto supresor podría deberse principalmente a la presencia de hongos y bacterias autóctonas, tales como *Trichoderma* spp., *Pseudomonas putida*, *Xanthomonas* sp. y *Bacillus* sp. (Mehta y col., 2014). Estos microorganismos antagonistas pueden actuar mediante antibiosis (Jing y col. 2007) o mediante competencia nutricional y espacial (Bloemberg y Lugtenberg, 2001). Sin embargo, sólo algunas bacterias son capaces de producir estos metabolitos antifúngicos, lo que podría explicar la diferencia observada en los Índices de Inhibición generados tras la aplicación de los distintos extractos. Por otro lado, diversos estudios ponen de manifiesto, que la capacidad

inhibitoria de los compost y sus extractos podría además estar asociada, con las características abióticas de los compost, en lo que respecta a contenido en moléculas húmicas, fenólicas o antifúngicas termolábiles y de bajo peso molecular, así como al pH, la relación C/N y la madurez del compost original. (Marambe y Ando, 1990; Bernal-Vicente y col., 2008; Koné y col., 2010; Mengesha y col., 2017; Martínez-Gallardo y col., 2019; Pané y col., 2019).

Los resultados obtenidos permitieron evaluar globalmente la eficacia de los protocolos de extracción sobre los índices de inhibición. De este modo, se puede intuir una mayor efectividad de los extractos obtenidos a partir de los protocolos CEP-2 y CEP-4, seguidos por CEP-3 y por último, CEP-1. Sólo frente a *F. oxysporum* f.sp. *melonis* los extractos CEP-3 resultaron ser más antagonistas que el resto (Figura 20A), lo que pudo estar determinado por las características específicas del extracto y por la susceptibilidad de este hongo a la composición del mismo.

No se obtuvieron resultados satisfactorios en lo que se refiere a la inhibición de *P. ultimum* por parte de los extractos de compost, ni se observaron diferencias significativas entre extractos. Como ya se indicado anteriormente, este hecho pone de manifiesto la baja susceptibilidad de este oomiceto al efecto supresor de los extractos.

Por otro lado, la relación entre todas las variables estudiadas en este trabajo fue estudiada mediante un análisis de correlación de Pearson. En la Figura 21, el valor R oscila entre -1 y +1, de manera que las relaciones negativas entre los parámetros se representan en azul oscuro, mientras que las relaciones positivas se muestran en rojo. Las casillas marcadas con una X, muestran aquellas correlaciones entre variables que no fueron significativas.

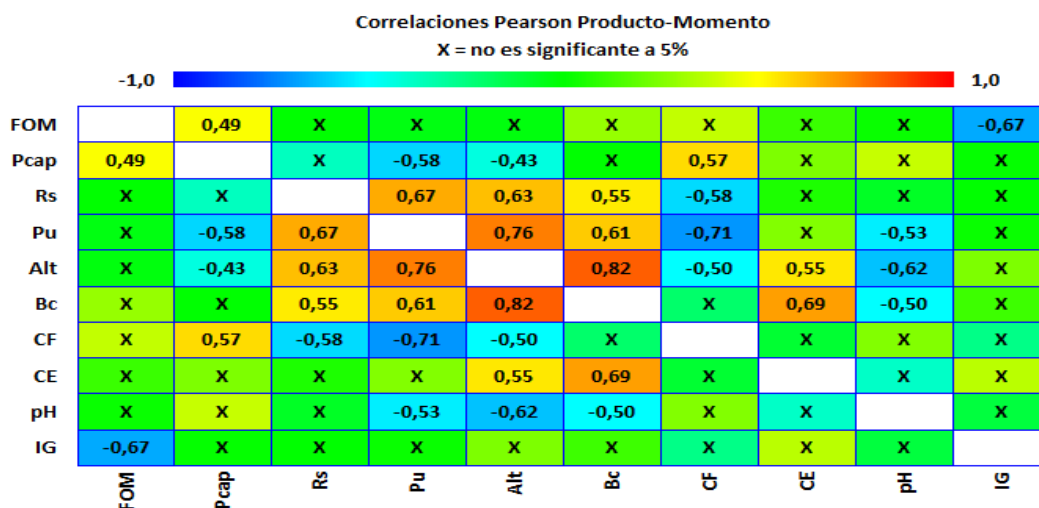


Figura 21. Representación del análisis de correlación Pearson donde el valor de R oscila entre -1 (azul oscuro) y +1 (rojo). FOM: *Fusarium oxysporum* f.sp. *melonis*; Pcap: *Phytophthora capsici*; Rs: *Rhizoctonia solani*; Pu: *Pythium ultimum*; Alt: *Alternaria alternata*; Bc: *Botrytis cinerea*; CF: Compuestos Fenólicos; CE: Conductividad Eléctrica; IG: Índice de Germinación.

A partir de los resultados derivados del análisis de correlación, destaca la relación negativa entre la concentración de compuestos fenólicos (CF) y el grado de inhibición frente a *Alternaria alternata* (Alt), *Pythium ultimum* (Pu) y *Rhizoctonia solani* (Rs). Sin embargo, dicha variable afectó de forma contraria

al crecimiento de *P. capsici* ya que, a mayor contenido en fenólicos, mayor susceptibilidad muestra este oomiceto.

En cuanto al parámetro conductividad eléctrica (CE) correlacionó positivamente con el grado de inhibición frente a los dos hongos foliares, *Alternaria alternata* (Alt) y *Botrytis cinerea* (Bc), mientras que el pH correlacionó negativamente con la inhibición frente a ambos hongos, además, de con la inhibición frente a *P. ultimum* (Pu).

Se estableció, por otra parte, una estrecha relación negativa entre el Índice de Germinación y la inhibición frente a FOM, lo cual podría estar relacionado con uno o más componentes del extracto de compost que provocan fitotoxicidad y además, ejercen un notable efecto de control sobre el crecimiento de FOM. En términos prácticos, esto podría ser un inconveniente, ya que difícilmente se podrán aplicar extractos efectivos frente a FOM, que resultan altamente tóxicos para la plántula.

Finalmente, según revela el análisis de correlación mostrado en la Figura 21, la respuesta de los hongos Rs, Bc, Alt y del oomiceto Pu frente a los extractos correlacionó positivamente, lo que puede ser de enorme interés a la hora de diseñar tratamientos comunes, de amplio espectro, a partir de extractos de compost efectivos. Por el contrario, la respuesta de FOM y Pcap fue más independiente del resto, lo que da pie a pensar en tratamientos de control diseñados *ad hoc* para el control exclusivo de ambos agentes patógenos.

5. CONCLUSIONES

A continuación, se describen las conclusiones más relevantes derivadas del trabajo desarrollado:

- i. Los extractos acuosos derivados de compost elaborados a partir de restos agroalimentarios muestran un importante potencial biopesticida frente a hongos y oomicetos fitopatógenos causantes de graves enfermedades en el entorno agrícola Almeriense.
- ii. La aplicación de distintos protocolos de extracción, así como la procedencia de las muestras, repercuten de forma significativa en las características físico-químicas y biológicas de los extractos. Así, cabe destacar que la aplicación de protocolos más agresivos desde el punto de vista térmico, deriva en la obtención de extractos con una concentración mayor de compuestos fenólicos, lo que puede afectar directamente al carácter biopesticida de los mismos.
- iii. La susceptibilidad de los agentes fitopatógenos es muy variable, así como también el grado de inhibición provocado a partir de los extractos aplicados. En general, el hongo *Botrytis cinerea* y el oomiceto *Phytophthora capsici* resultaron ser más susceptibles que el resto, mientras que ninguno de los extractos destacó por su eficacia frente a *Pythium ultimum*.
- iv. A la hora de aplicar un determinado extracto de compost con fines biopesticidas, hay que tener en cuenta no sólo el espectro de actuación antagonista que presenta, sino también su carácter fitotóxico, ya que la aplicación de protocolos de extracción más agresivos, podría derivar en el

incremento de compuestos tóxicos que afectarían a la planta en estados tempranos de desarrollo.

6. FINANCIACIÓN

Trabajo financiado gracias a la Ayuda Puente del Plan Propio de Investigación y Transferencia 2022 de la Universidad de Almería (PID2020-118402RB-I00).

7. BIBLIOGRAFÍA

Aguado-Santacruz, G.A., Moreno-Gómez, B., Jiménez-Francisco, B., García-Moya, E., Preciado-Ortiz, R.E. (2012). Impacto de los sideróforos microbianos y fitosideróforos en la asimilación de hierro por las plantas: una síntesis. *Revista Fitotecnia Mexicana* 35(1), 9-21.

Ahmad, R., Arshad, A., Zahir, A. (2008). Effectiveness of organic-/bio-fertilizer supplemented with chemical fertilizers for improving soil water retention, aggregate stability, growth and nutrient uptake of Maize (*Zea mays L.*). *Journal of Sustainable Agriculture*, 31(4), 57-77.

Ansorena, J., Batalla, E., Merino, D. (2014). Evaluación de la calidad y usos del compost como componente de sustratos, enmiendas y abonos orgánicos. *Escuela Agraria Frisoro*, 75.

Bargués-Ribera, M., Gokhale, C.S. (2020). Eco-evolutionary agriculture: Host-pathogen dynamics in crop rotations. *PLoS Computational Biology*, 16(1), e1007546.

Barral, M.T., Paradelo, R. (2011). A review on the use of phytotoxicity as a compost quality indicator. *Dynamic Soil, Dynamic Plant*, 5(2), 36-44.

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 nutritive and biocontrol effects. *Bioresource Technology*, 99(18), 8722-8728.

Bloemberg, G.V., Lugtenberg, B.J. (2001). Molecular basis of plant growth promotion and biocontrol by rhizobacteria. *Current Opinion in Plant Biology*, 4(4), 343-350.

Brady, N.C., Weil, R.R., Weil R.R. (2008). The nature and properties of soils. *Upper Saddle River, NJ: Prentice Hall*, 13, 662-710.

Carrasco, M., Rozas, J.A., Barahona, S., Alcaíno, J., Cifuentes, V., Baeza, M. (2012). Diversity and extracellular enzymatic activities of yeasts isolated from King George Island, the sub-Antarctic region. *BMC microbiology*, 12(1), 1-9.

Carvalho, F.P. (2017). Pesticides, environment, and food safety. *Food and Energy Security*, 6(2), 48-60.

- Chaibub, A.A., de Carvalho, J.C.B., de Sousa Silva, C., Collevatti, R.G., Gonçalves, F.J., de Carvalho Barros Cortes, M.V., de Araújo, L.G. (2016). Defence responses in rice plants in prior and simultaneous applications of *Cladosporium sp.* during leaf blast suppression. *Environmental Science and Pollution Research*, 23(21), 21554-21564.
- De Bertoldi, M. (2010). Production and utilization of suppressive compost: environmental, food and health benefits. H. Insam, I. Franke-Whittle, M. Goberna (Eds.), *Microbes at Work - From Wastes to Resources*, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, 153-170.
- Djebaili, R., Pellegrini, M., Smati, M., Del Gallo, M., Kitouni, M. (2020). Actinomycete strains isolated from saline soils: Plant-growth promoting traits and inoculation effects on *Solanum lycopersicum*. *Sustainability*, 12(11), 4617.
- El-Masry, M.H., Khalil, A.I., Hassouna, M.S., Ibrahim, H.A.H. (2002). In situ and in vitro suppressive effect of agricultural composts and their water extracts on some phytopathogenic fungi. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 18(6), 551-558.
- Evangelista-Martínez, Z., Quiñones-Aguilar, E.V., Rincón-Enríquez, G. (2017). Potencial biotecnológico de las actinobacterias aisladas de suelos de México como fuente natural de moléculas bioactivas: compuestos antimicrobianos y enzimas hidrolíticas. *Temas de Ciencia y Tecnología*, 21(63), 39-51.
- Falcon, M.A., Rodriguez, A., Carnicero, A., Regalado, V., Perestelo, F., Milstein, O., De La Fuente, G. (1995). Isolation of microorganisms with lignin transformation potential from soil of Tenerife Island. *Soil Biology and Biochemistry*, 27(2), 121-126.
- García-Espejo, C.N., Mamani-Mamani, M.M., Chávez-Lizárraga, G.A., Álvarez-Aliaga M.T. (2016). Evaluación de la actividad enzimática del *Trichoderma inhamatum* (BOL-12 QD) como posible biocontrolador. *Journal of the Selva Andina Research Society*, 7(1), 20-32.
- Gasic, S., Tanovic, B. (2013). Role of biopesticides in crop protection: Present status and future prospect. *Pesticidi i Fitomedicina*, 28(2), 97-102.
- Geok, L.P., Razak, C.N.A., Abd Rahman, R.N.Z., Basri, M., Salleh, A.B. (2003). Isolation and screening of an extracellular organic solvent-tolerant protease producer. *Biochemical Engineering Journal*, 13(1), 73-77.
- Gouda, S., Kerry, R.G., Das, G., Paramithiotis, S., Shin, H.S., Patra, J.K. (2018). Revitalization of plant growth promoting rhizobacteria for sustainable development in agriculture. *Microbiological Research*, 206, 131-140.
- Griffin, D.E. (2012). Managing abiotic factors of compost to increase soilborne disease suppression. *Journal of Natural Resources and Life Sciences Education*, 41(1), 31-34.
- Gupta, G., Parihar, S.S., AHIRWAR, N.K., SNEHI, S.K., SINGH, V. (2015). Plant growth promoting rhizobacteria (PGPR): current and future prospects for development of sustainable agriculture. *Journal of Microbial and Biochemical Technology*, 7(2), 96-102.

- Hankin, L., Anagnostakis, S.L. (1975). The use of solid media for detection of enzyme production by fungi. *Mycologia*, 67(3), 597-607.
- Hitzl, M., Mendez, A., Renz, M. (2018). Making hydrochar suitable for agricultural soil: a thermal treatment to remove organic phytotoxic compounds. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 6(6), 7029-7034.
- Jara-Samaniego, J. (2016). Tesis Doctoral. Oportunidades de valorización mediante compostaje de los residuos orgánicos de origen urbano y afines en Ecuador: Propuesta de gestión para la provincia de Chimborazo. Universidad Miguel Hernández de Elche.
- Jing, Y.D., He, Z.L., Yang, X.E. (2007). Role of soil rhizobacteria in phytoremediation of heavy metal contaminated soils. *Journal of Zhejiang University Science B*, 8(3), 192-207.
- Jurado, M., López, M.J., Suárez-Estrella, F., Vargas-García, M.C., López-González, J.A., Moreno, J. (2014). Exploiting composting biodiversity: study of the persistent and biotechnologically relevant microorganisms from lignocellulose-based composting. *Bioresource Technology*, 162, 283-293.
- Kasana, R.C., Salwan, R., Dhar, H., Dutt, S., Gulati, A. (2008). A rapid and easy method for the detection of microbial cellulases on agar plates using Gram's iodine. *Current Microbiology*, 57(5), 503-507.
- Koné, S.B., Dionne, A., Tweddell, R.J., Antoun, H., Avis, T.J. (2010). Suppressive effect of non-aerated compost teas on foliar fungal pathogens of tomato. *Biological Control*, 52(2), 167-173.
- Laich, F. (2011). El papel de los microorganismos en el proceso de compostaje. *Instituto Canario de Investigaciones Agrarias. ICIA*, 1-7.
- Lasaridi, K., Protopapa, I., Kotsou, M., Pilidis, G., Manios, T., Kyriacou, A. (2006). Quality assessment of composts in the Greek market: the need for standards and quality assurance. *Journal of Environmental Management*, 80(1), 58-65.
- Leteinturier, B., Herman, J., Longueville, F.D., Quintin, L., Oger, R. (2006). Adaptation of a crop sequence indicator based on a land parcel management system. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 112(4), 324-334
- Litterick, A.M., Harrier, L., Wallace, P., Watson, C. (2004). The role of uncomposted materials, composts, manures, and compost extracts in reducing pest and disease incidence and severity in sustainable temperate agricultural and horticultural crop production - A Review. *Critical Reviews in Plant Sciences*. 23(6), 453-479.
- López-González, J.A., del Carmen Vargas-García, M., López, M.J., Suárez-Estrella, F., Jurado, M., Moreno, J. (2014). Enzymatic characterization of microbial isolates from lignocellulose waste composting: chronological evolution. *Journal of Environmental Management*, 145, 137-146.
- Luo, Y., Liang, J., Zeng, G., Chen, M., Mo, D., Li, G., Zhang, D. (2018). Seed germination test for toxicity evaluation of compost: Its roles, problems and prospects. *Waste Management*, 71, 109-114.

Mac Donnell, M.T. (2018). Tesis Doctoral. Producción, aplicación y beneficios de los extractos acuosos del compostaje ("té de compost").

Marambe, B., Ando, T. (1992). Phenolic acids as potential seed germination-inhibitors in animal-waste composts. *Soil Science and Plant Nutrition*, 38(4), 727-733.

Martínez-Gallardo, M.R., López, M.J., Jurado, M.M., Suárez-Estrella, F., López-González, J.A., Sáez, J.A., Moreno, J. (2020). Bioremediation of Olive Mill Wastewater sediments in evaporation ponds through in situ composting assisted by bioaugmentation. *Science of the Total Environment*, 703, 135537.

Mehta, C.M., Palni, U., Franke-Whittle, I.H., Sharma, A.K. (2014). Compost: its role, mechanism and impact on reducing soil-borne plant diseases. *Waste Management*, 34(3), 607-622.

Mengesha, W.K., Gill, W.M., Powell, S.M., Evans, K.J., Barry, K.M. (2017). A study of selected factors affecting efficacy of compost tea against several fungal pathogens of potato. *Journal of Applied Microbiology*, 123(3), 732-747.

Millán, F., Prato, J.G., La Cruz, Y., Sánchez, A. (2018). Estudio metodológico sobre la medición de pH y conductividad eléctrica en muestras de compost. *Revista Colombiana de Química*, 47(2), 21-27.

Mohamed, O.Z., Yassine, B., El Hassan, A., Abdellatif, H., Rachid, B. (2020). Evaluation of compost quality and bioprotection potential against *Fusarium* wilt of date palm. *Waste Management*, 113, 12-19.

Molina-Romero, D., Bustillos-Cristales, M.D.R., Rodríguez-Andrade, O., Morales-García, Y.E., Santiago-Saenz, Y., Castañeda-Lucio, M., Muñoz-Rojas, J. (2015). Mecanismos de fitoestimulación por rizobacterias, aislamientos en América y potencial biotecnológico. *Biológicas*, 17(2), 24-34.

Moreno, J., Mormeneo, S. (2011). Microbiología y bioquímica del proceso de compostaje. Moreno J., Moral R., (Eds.). *Compostaje*, Ed. Mundiprensa.

Neher, D.A., Weicht, T.R., Bates, S.T., Leff, J.W., Fierer, N. (2013). Changes in bacterial and fungal communities across compost recipes, preparation methods, and composting times. *PLoS ONE*, 8(11), e79512.

Oka, Y., Yermiyahu, U. (2002). Suppressive effects of composts against the root-knot nematode *Meloidogyne javanica* on tomato. *Nematology*, 4(8), 891-898.

Orr, H.A., Unckless, R.L. (2008). Population extinction and the genetics of adaptation. *The American Naturalist*, 172(2), 160-169.

Orr, R., Nelson, P.N. (2018). Impacts of soil abiotic attributes on *Fusarium* wilt, focusing on bananas. *Applied Soil Ecology*, 132, 20-33.

- Pane, C., Celano, G., Zaccardelli, M. (2014). Metabolic patterns of bacterial communities in aerobic compost teas associated with potential biocontrol of soilborne plant diseases. *Phytopathologia Mediterranea*, 53(2), 277-286.
- Pane, C., Spaccini, R., Piccolo, A., Celano, G., Zaccardelli, M. (2019). Disease suppressiveness of agricultural greenwaste composts as related to chemical and bio-based properties shaped by different on-farm composting methods. *Biological Control*, 137, 104026.
- Philip, N.V., Koteswara, A., Kiran, G.A., Raja, S., Subrahmanyam, V.M., Chandrashekar, H.R. (2020). Statistical optimization for coproduction of chitinase and beta 1, 4-endoglucanase by chitinolytic *Paenibacillus elgii* PB1 having antifungal activity. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 191(1), 135-150.
- Pilet-Nayel, M.L., Moury, B., Caffier, V., Montarry, J., Kerlan, M.C., Fournet, S., Durel, C.E., Delourme, R. (2017). Quantitative resistance to plant pathogens in pyramiding strategies for durable crop protection. *Frontiers in Plant Science*, 8(2), 1838.
- Priya, H., Prasanna, R., Ramakrishnan, B., Bidyarani, N., Babu, S., Thapa, S., Renuka, N. (2015). Influence of cyanobacterial inoculation on the culturable microbiome and growth of rice. *Microbiological Research*, 171, 78-89.
- Ramlawi, S., Abusharkh, S., Carroll, A., McMullin, D.R., Avis, T.J. (2021). Biological and chemical characterization of antimicrobial activity in *Arthrobacter spp.* isolated from disease-suppressive compost. *Journal of Basic Microbiology*, 61(8), pp. 745-756.
- Rayner, A.D.M., Boddy, L. (1988). *Fungal Decomposition of Wood: Its Biology and Ecology*. Wiley and Sons, New York, 132-134.
- Sánchez, Ó.J., Ospina, D.A., Montoya, S. (2017). Compost supplementation with nutrients and microorganisms in composting process. *Waste Management*, 69, 136-153.
- San Fulgencio, N.S., Suárez-Estrella, F., López, M.J., Jurado, M.M., López-González, J.A., Moreno, J.J.B.C. (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.
- Scheuerell, S.J., Mahaffee, W.F. (2004). Compost tea as a container medium drench for suppressing seedling damping-off caused by *Pythium ultimum*. *Phytopathology*, 94(11), 1156-1163.
- Scheuerell, S.J., Mahaffee, W.F. (2013). Compost Tea: Principles and Prospects For Plant Disease Control. *Compost Science and Utilization*, 10(4), 313-338.
- Siles-Castellano, A.B., López-González, J.A., Jurado, M.M., Estrella-González, M.J., Suárez-Estrella, F., López, M.J. (2021). Compost quality and sanitation on industrial scale composting of municipal solid waste and sewage sludge. *Applied Sciences*, 11(16), 7525.

Silva, M.E.F., de Lemos, L.T., Nunes, O.C., Cunha-Queda, A.C. (2014). Influence of the composition of the initial mixtures on the chemical composition, physicochemical properties and humic-like substances content of composts. *Waste Management*, 34(1), 21-27.

St Martin, C.C. (2015). Enhancing soil suppressiveness using compost and compost tea. In *Organic Amendments and Soil Suppressiveness in Plant Disease Management*, 25-49.

Suárez-Estrella, F., Vargas-García, M.C., López, M.J., Moreno, J. (2008). Effect of humic substances from compost to plant growth and soil microorganisms. *Dynamic Soil, Dynamic Plant*, 2(1), 96-102.

Visconti, F., de Paz, J.M. (2016). Electrical conductivity measurements in agriculture: The assessment of soil salinity. *New trends and developments in metrology*, 1(1), 99-126.

Trillas-Gay, M.I., Suárez-Estrella, F., Avilés-Guerrero, M., Moreno, J. (2014). Compost y control biológico de las enfermedades de las plantas. Moreno, J., Moral, R., García-Morales, J.L., Bernal, M.P. (Eds.). *De Residuos a Recurso*. Ed. Mundiprensa, 6, 124 pp.

Vestberg, M., Kukkonen, S., Parikka, P., Yu, D., Romantschuk, M. (2014). Reproducibility of suppression of *Pythium* wilt of cucumber by compost. *Agricultural and Food Science*, 23(3), 236-245.

Wu, H.S., Raza, W., Fan, J.Q., Sun, Y.G., Bao, W., Liu, D.Y., Miao, W.G. (2008). Antibiotic effect of exogenously applied salicylic acid on in vitro soilborne pathogen, *Fusarium oxysporum f. sp. niveum*. *Chemosphere*, 74(1), 45-50.