



UNIVERSIDAD DE ALMERÍA



Caracterización de extractos acuosos de compost de alperujo y su uso potencial en biofertilización y bioestimulación

TRABAJO FIN DE GRADO

GRADO EN BIOTECNOLOGÍA

CURSO 2021-2022

Departamento de Biología y Geología. Área de Microbiología

Autora: Marina Pérez Rueda

Directora: Francisca Suárez Estrella

Codirectora: María Rosa Martínez Gallardo

Fecha de defensa: junio de 2022



AGRADECIMIENTOS

Hace cuatro años comenzó esta dura etapa, pues no ha sido un camino fácil. Desafortunadamente, a contra pronóstico, una pandemia mundial nos paralizó y surgió la necesidad de reinventarse o simplemente improvisar e intentar dar lo mejor de uno mismo. En esos momentos en los que hacía tanta falta sentir el afecto de las personas, ya que no podíamos compartir momentos presenciales con nadie, cualquier clase correspondiente al área de Microbiología se convertía en un momento ansiado. Y es que todos y cada uno de sus docentes se preocupaban por ti, o simplemente intentaban amenizar la situación cuando todo se complicaba.

Por todo ello, además de por esa inquietud que la Microbiología despertó en mí, decidí emprender esta “microaventura”. El principal responsable de esta decisión fue el magnífico catedrático en Microbiología, Joaquín Moreno Casco. Me siento afortunada por haber podido presenciar su docencia, lo que suponía un inmenso placer por esa inigualable capacidad para transmitir los conocimientos. Solo tengo palabras de gratitud por todo lo bueno que me aportaron todas y cada una de sus clases, tutorías o conversaciones que mantuvimos. Así que, tal y como él siempre decía, yo aspiro a ser una buena profesional, pero ante todo una buena persona. Querido Joaquín, aunque por desgracia no estés ya con nosotros, tu huella siempre nos acompañará. Muchas gracias allí donde estés.

A María José López López, responsable del grupo de Microbiología, gracias por permitirme realizar este trabajo en tu maravilloso grupo de investigación. Es admirable la energía y el ánimo que pones siempre en tus clases para intentar llegar a cada uno de nosotros y que salgamos de allí sintiéndonos un poquito más “microbiólogos”.

Gracias a mi tutora Paqui Suárez Estrella, por estar ahí siempre con una sonrisa, por ser tan cercana, por haberme enseñado tanto durante todo este tiempo y por sacar el tiempo que hiciera falta para resolverme una duda o lo que fuese necesario. A mi cotutora María Rosa Martínez Gallardo, aunque no te conocía, te has portado de maravilla conmigo, me has animado, apoyado y siempre has estado para todo lo que pudiera hacerme falta.

En definitiva, gracias a Macarena, Juan, María José Estrella, Ana T, Jesús, Rosario, Víctor y a todos los miembros del Área de Microbiología de la Universidad de Almería. Gracias por recibirme siempre con una sonrisa y permitirme aprender lo máximo de esta experiencia.

También me gustaría agradecer al resto de profesores que imparten clase en el grado en Biotecnología y que han formado parte de este recorrido.

Quisiera terminar agradeciendo también a algunas de las personas más importantes de mi vida. A mis padres, que siempre han estado ahí apoyándome, confiando en mí, animándome o simplemente cuidándome incondicionalmente. Gracias a ellos, soy la persona que actualmente soy, y nunca será suficiente para poder agradecerles todo. A mis abuelas y al resto de mis seres queridos. En especial a mi tito Nono, que siempre me cuidará y me protegerá desde el cielo, espero que te sientas

muy orgulloso de tu ahijada. Y a mis primillos, que os quiero con locura. También a esas personas especiales que aparecen de la nada y se convierten en los mejores compañeros de aventuras, de agobios o de lo que haga falta, porque están ahí para todo.

En definitiva, si algo me han enseñado estos cuatro años, además de infinitos conocimientos sobre Biotecnología, es que los mejores siempre son los que se van, que siempre hay que seguir y que nada te puede frenar.

A los que están y a los que se han ido, muchas gracias a todos.

ÍNDICE

RESUMEN	6
ABSTRACT	7
I. INTRODUCCIÓN	8
I.1. Antecedentes y contextualización: gestión de recursos y residuos	8
I.2. Bioeconomía circular: el nuevo modelo de agricultura sostenible	8
I.3. Valorización de residuos: compostaje	9
<i>I.3.1. Fases del proceso de compostaje</i>	<i>10</i>
I.4. Residuos de la extracción del aceite de oliva: alperujo	12
I.5. Biofertilizantes y bioestimulantes	14
<i>I.5.1. Antecedentes: fertilizantes químicos y problemática asociada</i>	<i>14</i>
<i>I.5.2. Conceptos de biofertilización y bioestimulación</i>	<i>15</i>
<i>I.5.3. Microorganismos: biofertilización y bioestimulación</i>	<i>16</i>
<i>I.5.4. Empleo de téis o extractos de compost como estrategia para la biofertilización y bioestimulación</i>	<i>17</i>
II. OBJETIVOS.....	19
III. MATERIAL Y MÉTODOS	19
III.1. Muestras de compost.....	19
III.2. Diseño Experimental	19
III.3. Obtención de los extractos de compost	20
III.4. Caracterización físico-química y biológica.....	21
<i>III.4.1. Medida de pH y conductividad eléctrica</i>	<i>21</i>
<i>III.4.2. Determinación de la demanda biológica de oxígeno a 5 días (DBO₅)</i>	<i>22</i>
III.5. Análisis de toxicidad.....	22
<i>III.5.1. Bioensayo de fitotoxicidad</i>	<i>23</i>
<i>III.5.2. Bioensayo de ecotoxicidad</i>	<i>24</i>
III.4. Estudio de la biodiversidad funcional.....	25
III.5. Análisis de datos.....	27
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	27
IV.1. Caracterización físico-química y biológica.....	28
IV.2. Análisis de toxicidad.....	31
<i>IV.2.1. Bioensayo de fitotoxicidad</i>	<i>31</i>
<i>IV.2.2. Bioensayo de ecotoxicidad</i>	<i>33</i>
IV.3. Estudio de la biodiversidad funcional	35

IV.4. Análisis comparativo	39
V. CONCLUSIONES	42
VI. FINANCIACIÓN	42
VII. BIBLIOGRAFÍA	42

RESUMEN

Uno de los principales problemas a los que se enfrenta la sociedad actual es la inminente escasez de alimentos debido al incesante crecimiento de la población. El enfoque erróneo de la gestión de los residuos hace que se desperdicie una fuente potencial de recursos agrícolas. Por otra parte, el uso excesivo de productos de síntesis química en la agricultura está provocando una considerable contaminación ambiental. Por lo tanto, con el fin de establecer un sistema económico capaz de generar productos suficientes para alimentar a toda la población, la atención se está centrando en la transformación de estos residuos en productos y servicios adecuados para su aplicación en prácticas agrícolas respetuosas con el medio ambiente. El compostaje de residuos es una alternativa sostenible para promover su valorización, permitiendo la producción de bioproductos que aseguren mayores rendimientos agrícolas y reduzcan la contaminación ambiental. Una forma de optimizar el uso del compost, producto del compostaje, es la obtención de tés o extractos de compost.

El objetivo principal del presente Trabajo Fin de Grado fue la selección de un protocolo de extracción que permitiera la obtención de un extracto de compost que, por su carácter bioestimulante y biofertilizante, presente un alto valor agronómico y pueda ser aplicado como alternativa a los productos de síntesis química. Para ello, se aplicaron cuatro protocolos de extracción (CEP1, CEP2, CEP3 y CEP4) en dos muestras de compost maduro e industrial de alperujo (ALP1 y ALP2). Los extractos acuosos obtenidos se caracterizaron físico-química y biológicamente y se sometieron a una evaluación de la toxicidad presente, así como de la biodiversidad funcional.

Los resultados mostraron que los extractos acuosos presentaban distintas características dependiendo de la naturaleza del compost y del protocolo de extracción aplicado. Los extractos acuosos del compost ALP2 mostraron valores de pH, conductividad y DBO superiores que los extractos de ALP1, además de una considerable biodiversidad funcional. Sin embargo, los extractos del compost ALP1 presentaron menor ecotoxicidad. Por otro lado, destacaron los protocolos que establecían la extracción acuosa de compost a temperatura ambiente, CEP1 y CEP4, ya que ofrecieron extractos de compost con capacidad fitoestimulante.

Por tanto, teniendo en cuenta estos resultados, la aplicación de extractos acuosos de compost en agricultura se plantea como una alternativa prometedora por sus capacidades fitoestimulante y biofertilizante. Además, dichas capacidades dependen de la naturaleza del compost y del protocolo de extracción.

Palabras clave: Extracto acuoso de compost, Alperujo, Biodiversidad funcional, Fitoestimulante, Biofertilizante, DBO₅.

ABSTRACT

One of the major problems facing society is the impending food shortage due to incessant population growth. The wrong approach to waste management is wasting a potential source of agricultural resources. Moreover, the excessive use of chemical synthesis products in agriculture is causing considerable environmental pollution. Therefore, in order to establish an economic system capable of generating sufficient products to feed the entire population, attention is being focused on transforming these wastes into products and services suitable for application in environmentally friendly agricultural practices. Waste composting is a sustainable alternative to promote its valorization, allowing the production of bioproducts that ensure higher agricultural yields and reduce environmental pollution. One way to optimize the use of compost from composting is to obtain compost teas or extracts.

The main objective of this work was the selection of an extraction protocol to obtain a compost extract that, due to its biostimulant and biofertilizing character, has a high agronomic value and can be applied as an alternative to chemical synthesis products. For this purpose, four extraction protocols (CEP1, CEP2, CEP3 and CEP4) were applied on two samples of mature and industrial semisolid olive mill waste compost (ALP1 and ALP2). The aqueous extracts obtained were physicochemically and biologically characterized and subjected to an evaluation of the toxicity present, as well as the functional biodiversity.

The results showed that the characteristics of the aqueous extracts depended on the nature of the compost and the extraction protocol applied. Aqueous extracts of ALP2 compost showed higher pH, conductivity and BOD values than ALP1 extracts, as well as considerable functional biodiversity. However, ALP1 compost extracts showed lower ecotoxicity. On the other hand, protocols CEP1 and CEP4, which established the aqueous extraction of compost at room temperature, were the most suitable to provide compost extracts with phytostimulant capacity.

Therefore, considering these results, the application of aqueous compost extracts in agriculture appears as a promising alternative for its phytostimulant and biofertilizing capabilities. Moreover, these capacities depend on the nature of the compost and the extraction protocol.

Key words: aqueous compost extract, semisolid olive mill waste, Functional biodiversity, Phytostimulant, Biofertilizer, BDO₅.

I. INTRODUCCIÓN

I.1. Antecedentes y contextualización: gestión de recursos y residuos

Desde una perspectiva ambiental y humanitaria, la situación mundial actual es compleja debido a los problemas derivados del cambio climático y a una grave crisis alimentaria que está provocando el desabastecimiento de una parte importante de la población. Por ello, la humanidad se enfrenta a una serie de retos de vital importancia que requieren la búsqueda urgente de soluciones que aseguren el mantenimiento y estabilidad de la población. La situación es delicada puesto que compromete la accesibilidad a recursos básicos como los alimentos, el agua y la energía. Por tanto, es necesario promover una gestión sostenible y ecológicamente adecuada de los recursos disponibles, promoviendo de manera eficiente el aprovechamiento moderado y racional de los mismos (Mejía, 2017; López et al., 2018).

Así pues, la agricultura moderna se enfrenta a un dilema con tres pilares fundamentales entre los que se encuentran la carencia de un abastecimiento regular de alimentos, la falta o agotamiento de recursos y el daño al medioambiente (Guzmán y Quintero, 2021). En este contexto, la creciente demanda alimentaria se considera uno de los problemas más preocupantes. Dicha demanda desencadena un incremento de la producción agrícola y con ello, un aumento de la generación de residuos derivados de la propia actividad. Ante esta situación, se genera un conflicto de intereses que exige el desarrollo de métodos que garanticen el abastecimiento de la población, sin comprometer los servicios ecosistémicos que nos brinda el medioambiente (Mejía, 2017; Aznar-Sánchez et al., 2020). De la superficie total del planeta Tierra, aproximadamente dos tercios están ocupados por agua, quedando poco menos de un tercio como superficie terrestre. Sin embargo, únicamente un 13% de esa superficie es empleada para producción agrícola. Además, ciertos estudios revelan que, para el año 2050, será necesario incrementar en un 70% el rendimiento en la producción alimentaria para ser capaces de satisfacer las necesidades de la población mundial (Velasco-Muñoz et al., 2021). Por consiguiente, toda mejora que pueda aplicarse en el ámbito agrícola y que permita un aumento de la productividad, permitirá contrarrestar el desabastecimiento alimentario que se prevé a corto-medio plazo (López et al., 2018).

Por otro lado, es necesario promover las prácticas adecuadas de gestión de residuos generados a partir de las actividades agroalimentarias, ya que los problemas derivados de su incorrecta gestión pueden provocar efectos fatales en la salud global del planeta (Mejía, 2017). De hecho, Las prácticas agrícolas intensivas, son responsables del 21% de las emisiones de gases de efecto invernadero mundiales, generando una huella de carbono equivalente a 6.500 millones de toneladas de CO₂ (Aznar-Sánchez et al., 2020).

I.2. Bioeconomía circular: el nuevo modelo de agricultura sostenible

El modelo agrícola actual es bastante ineficiente y contaminante, en lo que se refiere a la gestión de los residuos generados. Este hecho, provoca efectos colaterales que pueden llegar a ser fatales para el medioambiente (Grageda-Cabrera et al., 2012), ya que se está superando la capacidad

de resiliencia de los ecosistemas (Seghetta et al., 2016). Para hacer frente a este problema, se sugiere un cambio conceptual de la palabra “residuo”, en consonancia con unas prácticas agrícolas más sostenibles. La mayoría de los residuos generados a partir de la agricultura pueden considerarse un recurso potencial por sus características físico-químicas y biológicas. Según esta consideración, surge la idea de valorización de dichos residuos para poder convertirlos en productos de un alto valor añadido, aptos para uso agrícola (Mejía, 2017). Esta reflexión sobre la potencialidad de los residuos permite dejar a un lado el modelo lineal basado en las premisas “extraer-usar-consumir-desechar”, para evolucionar hacia el modelo basado en la “Economía Circular”. Este modelo supone una opción revolucionaria en la tendencia hacia un desarrollo sostenible más efectivo. Dicha tendencia pretende favorecer la revalorización de los residuos para que se conviertan en nuevas oportunidades permitiendo su prevalencia en el sistema económico, de manera continuada, sin tener que recurrir a nuevas materias primas (Seghetta et al., 2016). Este nuevo modelo económico se fundamenta en la generación de productos considerados “residuo cero”, sin ningún tipo de restricción medioambiental y sanitario en lo que se refiere a su aplicación (López et al., 2018). De esta manera se promociona la conservación, aprovechamiento y revalorización de los residuos, de forma que se convierten en recursos. Teniendo en cuenta todo lo anterior, surge el reciente y aún en desarrollo concepto de “Bioeconomía Circular”, que fusiona dos ideas fundamentales: la economía basada en la vida y en la circularización de los procesos (Aznar-Sánchez et al., 2020; Velasco-Muñoz et al., 2021).

Por tanto, en el camino hacia un modelo de economía circular, surge la necesidad de aprovechar los residuos, por su potencial biológico, para obtener sustratos con considerables características nutricionales y preventivas a nivel agrícola. Todas las estrategias aplicadas para dicho fin desembocan en la reducción del consumo de recursos hídricos, fertilizantes y fitosanitarios, siendo el principal objetivo el empleo de productos biológicos. Finalmente, las mejoras derivadas del uso de estos bioproductos, benefician al sistema agrícola favoreciendo el desarrollo de las plantas e incluso, en muchos casos, ofreciendo una protección efectiva frente a patógenos (Suárez-Estrella y Moreno, 2012).

I.3. Valorización de residuos: compostaje

El concepto de valorización, descrito en la ley de residuos y suelos contaminados 22/2011 del 28 de julio, se define como “cualquier operación cuyo resultado principal sea que el residuo sirva a una finalidad útil al sustituir a otros materiales, que de otro modo se habrían utilizado para cumplir una función particular, o que el residuo sea preparado para cumplir esa función en la instalación o en la economía en general”. El Anexo II de la ley 22/2011 recoge las operaciones de valorización de residuos, entre las que cabe destacar el compostaje y otros procesos de transformación biológica a partir de los denominados “Biorresiduos”.

El compostaje suele ser la alternativa preferida ya que implica una eficiente capacidad de gestión del problema y no provoca ningún impacto medioambiental destacable. Se fundamenta en la transformación biológica aeróbica de la materia orgánica, generándose CO₂, calor y otros productos estables resultantes de la descomposición. La pila de compostaje es un entorno idóneo para que los microorganismos lleven a cabo sus actividades metabólicas, las cuáles, junto con el calor generado,

son responsables de la transformación de la materia. Sin embargo, este proceso debe ser controlado para asegurar una eficiente biotransformación y revalorización de los residuos y, en consecuencia, un producto final de calidad (Vargas- García, et al., 2010; Díaz, 2021). Además, este proceso garantiza la reducción de la carga patogénica y de compuestos contaminantes presentes en el material de partida (Paroldi et al., 2019; Díaz, 2021).

El producto final obtenido tras un proceso de compostaje adecuado se denomina compost, y se enmarca dentro de la categoría de enmienda orgánica para uso en agricultura (RD 999/2017) muy útil como alternativa a los productos de síntesis química. En este sentido, además de rebajar la tasa de acumulación de los residuos potencialmente tratables, el compostaje contribuye a reducir el uso de abonos y/o pesticidas químicos, más nocivos desde un punto de vista ambiental y sanitario (Suárez-Estrella y Moreno, 2012). Por otra parte, la comunidad microbiana presente en un compost maduro de calidad presenta una elevada biodiversidad, lo cual lo convierte en un producto multifuncional a nivel agrícola (Díaz, 2021). Tal es así, que se describe su empleo como estimulante del crecimiento vegetal, inhibidor del crecimiento de fitopatógenos, e incluso como biorremediador del suelo (Sánchez San Fulgencio et al., 2018).

1.3.1. Fases del proceso de compostaje

A lo largo del proceso de compostaje suceden una serie de etapas que culminan en la formación de un producto final maduro, que posee los estándares de calidad requeridos para su uso agrícola. Dichas etapas dependen de las diferentes temperaturas que se alcanzan en la degradación de la materia orgánica por acción de las poblaciones microbianas predominantes en cada una de ellas (Jurado, 2015; Mac Donnell, 2018). Las fases del proceso de compostaje se muestran en la Figura 1 y se describen a continuación:

- **Fase mesófila.** Constituye la fase inicial y dura un corto periodo de tiempo. En ella se alcanza temperaturas en torno a los 45 °C y los microorganismos predominantes comienzan a degradar las formas orgánicas más sencillas (Mac Donnell, 2018). Los microorganismos protagonistas en esta fase son bacterias, actinobacterias y hongos mesófilos y termotolerantes (Jurado, 2015).
- **Fase termófila.** Se establece cuando se supera la temperatura máxima de la fase anterior. Durante esta fase son protagonistas las poblaciones microbianas capaces de soportar condiciones más extremas. La duración de esta etapa depende mayoritariamente de las características del material a compostar. El aumento de temperatura permite la degradación de la materia orgánica más compleja (Mac Donnell, 2018). En esta etapa la temperatura alcanza los 65-70 °C, lo que favorece la higienización del material que está siendo compostado, y posibilita la destrucción de patógenos, parásitos o larvas que pudieran estar presentes en los materiales de partida (Jurado, 2015).
- **Fase de enfriamiento.** En esta etapa, también llamada segunda fase mesófila, se produce un descenso de la temperatura que desencadena de nuevo la predominancia los

microorganismos mesófilos (Mac Donnell, 2018). En esta etapa deben realizarse nuevos volteos de la pila, lo que permitirá a las poblaciones microbianas seguir degradando materia orgánica y, en consecuencia, seguir produciendo calor, lo cual se traduce en un nuevo ascenso de la temperatura de la pila. Este comportamiento del perfil térmico en “dientes de sierra” se debe al efecto de los volteos y se repetirá varias veces a lo largo del periodo biooxidativo del proceso, hasta que el producto alcance una mayor estabilidad en la fase de enfriamiento (Jurado, 2015).

- **Fase de maduración.** Esta se considera la fase final del proceso, y transcurre a temperatura ambiente. En esta fase se consigue la estabilización del producto final y se alcanzan los estándares de calidad requeridos para su empleo (Mac Donnell, 2018). Se extiende durante un periodo de tiempo más o menos largo, que puede oscilar entre 2 y 6 meses o incluso más, ya que ocurren multitud de reacciones de polimerización que favorecen la humificación de la materia orgánica estable, dando lugar a un producto estable y maduro (Jurado, 2015).

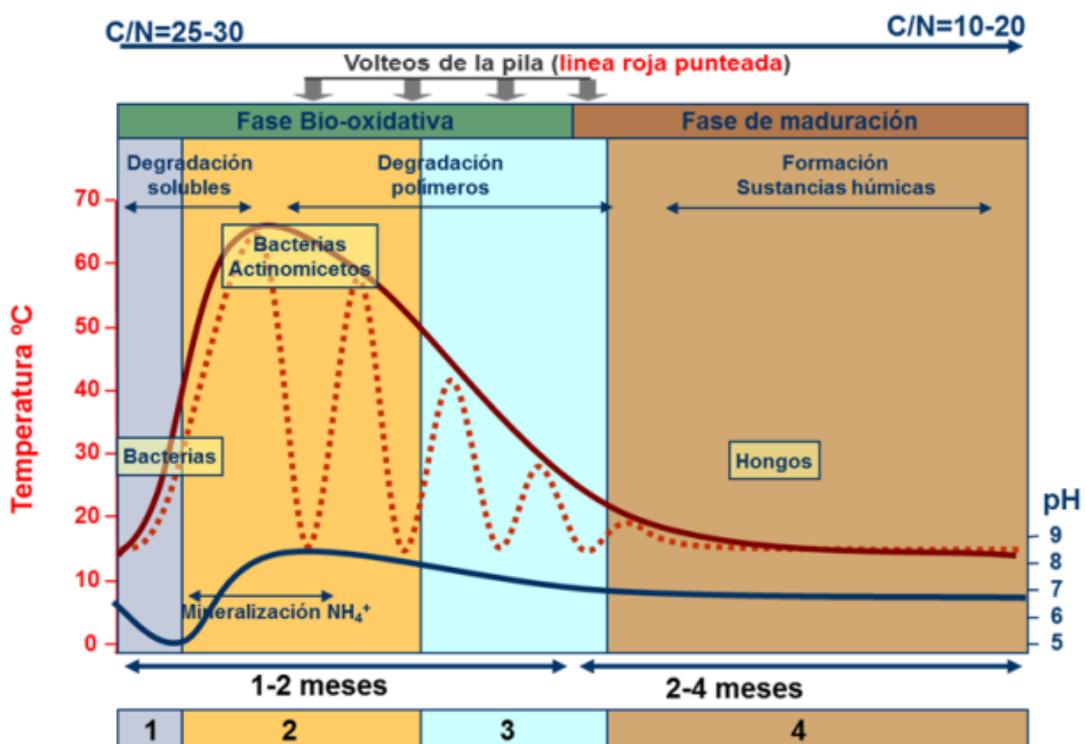


Figura 1. Fases del proceso de compostaje: (1-Mesófila; 2-Termófila; 3-Enfriamiento y 4-Maduración) (Moreno y Mormeneo, 2008).

Estas etapas pueden agruparse, a su vez, de acuerdo con otro criterio, en este caso atendiendo a la disponibilidad de los distintos sustratos y a las actividades microbianas llevadas a cabo. De esta manera, la primera fase correspondería a la fase biooxidativa que comprende las tres primeras etapas anteriormente descritas (fase mesófila, termófila y enfriamiento). Esta etapa se caracteriza por la gran disponibilidad de nutrientes y, por tanto, la elevada diversidad metabólica que implica una considerable generación de calor. Y, por último, la fase de maduración en la que la temperatura permanece prácticamente constante y existe una limitación nutricional por lo que la actividad se reduce (Moreno y Mormeneo, 2008).

El proceso de compostaje se puede realizar con materiales orgánicos muy diversos, que se describen como compostables. Además, dependiendo de las características del material se puede compostar solo o combinado con otras materias primas. Todas estas consideraciones y variaciones deben tenerse en cuenta ya que cada materia prima puede conferir una serie de rasgos distintivos al producto final (Moreno y Mormeneo, 2008).

I.4. Residuos de la extracción del aceite de oliva: alperujo

El aceite de oliva es uno de los principales alimentos de la dieta mediterránea y su demanda es cada vez mayor debido a sus propiedades organolépticas y beneficios sobre la salud (Martínez-Gallardo, 2021.). Los países situados en la cuenca mediterránea son los principales productores de aceite de oliva ya que las condiciones climáticas de esa zona permiten el cultivo óptimo de los olivos (Fig. 2).

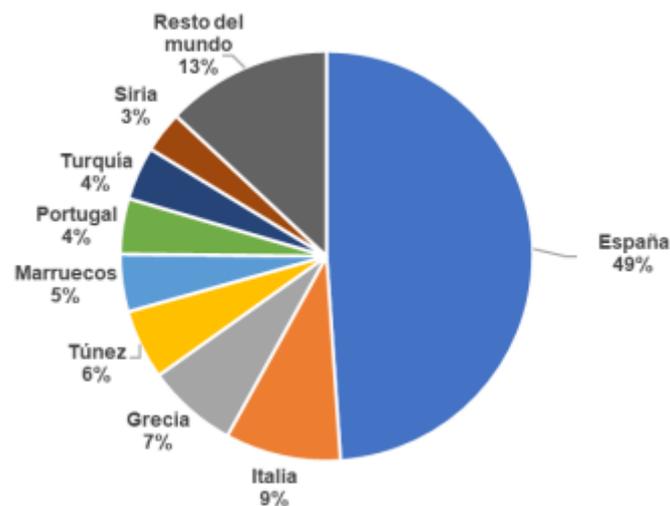


Figura 2. Producción de aceite oliva por países en la campaña 2020/21 (Tello, 2022).

Entre las regiones con cultivo de olivar, Andalucía destaca por presentar la mayor densidad de olivos de gran calidad por superficie de terreno. En la campaña 2019/20, según los datos de la Consejería de Agricultura, Pesca, Ganadería y Desarrollo Sostenible de la Junta de Andalucía, se dedicaron 1.672.489 hectáreas al cultivo de olivos (Fig. 3).

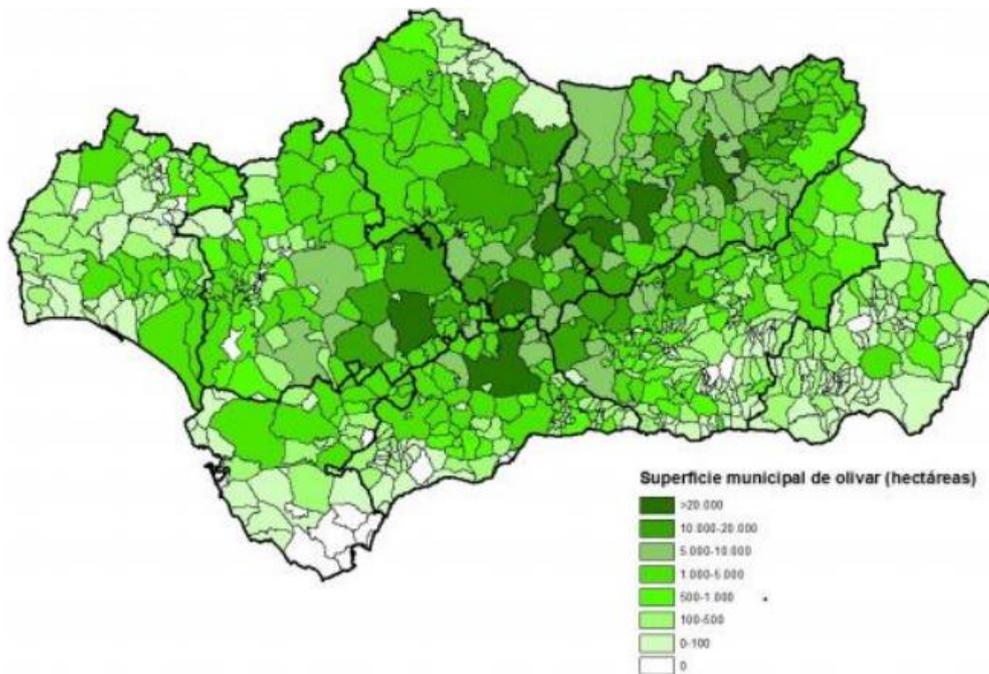


Figura 3. Superficie de Andalucía, expresada en hectáreas, destinada al cultivo de olivos. El rango de colores de mayor a menor intensidad se corresponde con el número de hectáreas y se explica en la leyenda de la figura (Cortés, 2021).

En los países donde la mayor parte de la agricultura se destina al cultivo del olivar, la producción de aceite de oliva tiene una fuerte repercusión en su sistema económico (Roig et al., 2005). España se encuentra en la cumbre de la producción de aceite de oliva, como primera potencia mundial en el sector oleícola, generando en la campaña 2018/2019 alrededor de $1,7 \times 10^6$ Tm (IOC, 2021).

El rendimiento en la producción de aceite de oliva depende de muchos factores, entre los que destacan el método de extracción (Tortosa et al., 2012). Existen dos métodos de extracción de aceite de oliva principales: el prensado tradicional y la centrifugación. La centrifugación constituye un sistema optimizado de extracción en continuo del aceite de oliva. El fundamento de esta operación se basa en una decantación que permite la separación de fases por centrifugación según un gradiente de densidades (Martínez-Gallardo, 2021). Además, es posible distinguir entre:

- **Sistema de extracción continuo de tres fases.** Permite la obtención de 3 fracciones: una fase sólida, conocida como orujo; una fase oleosa, el aceite de oliva; y una fracción líquida constituida por el agua de lavados y la resultante de la molturación de las aceitunas, denominada alpechín. Se trata de un sistema operativo que mejora el rendimiento de la extracción respecto al sistema tradicional. Sin embargo, presenta algunos inconvenientes como la generación de grandes cantidades de alpechín (Martínez-Gallardo, 2021).
- **Sistema de extracción continuo de dos fases.** Este sistema es el más empleado por las almazaras en la actualidad, ya que permite reducir el consumo de agua frente a los sistemas trifásicos, lo que supone un importante ahorro económico. En este caso, se obtiene el aceite de oliva y un residuo semisólido denominado alperujo, que constituye una mezcla entre el orujo y el alpechín obtenidos en el sistema anterior (Martínez-Gallardo, 2021).

España es uno de los países donde predomina el sistema de centrifugación de dos fases, a partir del cual se generan importantes cantidades de alperujo (Tortosa, et al., 2012). Teniendo en cuenta los datos mostrados anteriormente sobre la gran producción de aceite de oliva en España, las cantidades de residuo generado en las almazaras españolas deben ser considerables y la predicción sigue en aumento (Tello, 2022). La gestión y uso del alperujo, el principal residuo de las almazaras que trabajan a dos fases, se centra principalmente en la producción de calor por combustión directa. Aunque también es posible la generación de energía eléctrica mediante el aprovechamiento de los humos de combustión y el empleo de ciclos de vapor (Calvo, 2013). Sin embargo, las características físico-químicas y biológicas del alperujo lo convierten en un sustrato óptimo para ser sometido a un proceso de compostaje y obtener finalmente un producto de elevada calidad agronómica. Muchos autores han planteado la posibilidad de aprovechamiento como biofertilizante orgánico debido a su composición. No obstante, la aplicación directa del alperujo en el suelo no resulta demasiado favorable en algunos casos ya que, debido a ciertas propiedades, no siempre es compatible con los requisitos agrícolas demandados. Del mismo modo, puede resultar tóxico y provocar alteraciones en la salinidad, pH o contenido en polifenoles del suelo (Calvo, 2013). Por lo que, el compostaje del alperujo es la mejor opción ya que permite, por tanto, la revalorización de este residuo, dando como resultado la obtención de un producto con un elevado potencial biotecnológico (Villarán, et al., 2018). De esta manera, el compostaje supone una alternativa idónea de gestión de este residuo para convertirlo en un subproducto de la industria oleícola. Donde cabe destacar que existe una gran ventaja frente a otro tipo de residuos y es que en este caso el producto se encuentra exento de metales pesados y de microorganismos patógenos que puedan poner en compromiso la salud pública (Calvo, 2013). Esta alternativa encaja dentro del modelo anteriormente mencionado de economía circular, mejorando la sostenibilidad del proceso de obtención de aceite de oliva (Moreno y Moral, 2008; Tortosa, et al., 2012). Tal es así, que el compost de alperujo está reconocido en una categoría independiente según el Real Decreto 999/2017 sobre productos fertilizantes.

I.5. Biofertilizantes y bioestimulantes

I.5.1. Antecedentes: fertilizantes químicos y problemática asociada

Desde el descubrimiento y desarrollo del proceso Haber-Bosch, a principio del siglo XX, fue posible la síntesis artificial de amoníaco (NH_3). Gracias a este hallazgo pronto se comenzaron a producir fertilizantes, plaguicidas y todo tipo de productos sintéticos para el ámbito agrícola. Además, en los años 40, se desarrollaron multitud de avances tecnológicos que permitieron el auge de la agricultura, y dieron paso a la denominada “Revolución Verde”. Este fenómeno permitió el incremento de la productividad agrícola, y se relaciona directamente con el paso de una agricultura tradicional a otra de carácter intensivo. Todo ello, aunque positivo en lo que se refiere a solucionar el desabastecimiento mundial de alimentos, provocó a partir de la década de los 70, un incremento notable del uso de fertilizantes y plaguicidas químicos, cuya tendencia sigue en aumento (Soto-Jiménez et al., 2019).

Sin embargo, estos productos químicos presentan diversos inconvenientes entre los cuales destaca el gran impacto ambiental por la contaminación de suelos y masas de agua (Soria, et al., 2001;

Soto-Jimenez, et al., 2019). Actualmente existen importantes extensiones de terreno consideradas como “zonas vulnerables”, debido al vertido de lixiviados nitrogenados agrícolas (Tortosa, 2011). La acumulación de estos productos en el suelo o en aguas provoca fenómenos de eutrofización en los que se producen serias alteraciones en la cadena trófica y se altera el equilibrio natural (Soto-Jiménez et al., 2019; Grageda-Cabrera et al., 2012). Por tanto, el uso indiscriminado de agroquímicos, se traduce en importantes daños y considerables efectos negativos para el medioambiente y para la salud humana (López-Padrón, et al 2020).

La situación en este momento, de acuerdo con lo expuesto anteriormente, pone de manifiesto la necesidad de un cambio del modelo agrícola que promocióne la racionalización de este tipo de productos, e incluso su sustitución por otros de carácter natural, con el fin de mejorar la sostenibilidad ambiental (Tortosa, 2011; López-Padrón, et al 2020).

1.5.2. Conceptos de biofertilización y bioestimulación

Desde hace siglos, de manera inconsciente o rudimentaria, se han puesto en práctica técnicas de biofertilización o bioestimulación. La interpretación de los términos es amplia y poco concisa, en principio, ya que comprende muchas y diversas acciones que provocan multitud de efectos sobre las plantas y el entorno (Grageda-Cabrera, et al., 2012). Por ello, es necesario describir en detalle lo que implican ambos conceptos, ya que son términos que pueden confundirse. Según la RAE, un biofertilizante es un “fertilizante que contiene microorganismos vivos que mejoran el estatus nutricional de las plantas”. Vessey (2003) define un biofertilizante como un producto que contiene microorganismos vivos que, al ser aplicado a semillas, raíces o superficies de plantas o suelo, colonizan la rizosfera o el interior de la planta y promueve su crecimiento, aumentando el suministro o la disponibilidad de nutrientes primarios. Así, el término biofertilizante se refiere a un producto que contiene microorganismos del suelo aplicados a plantas para promover su crecimiento. Otras definiciones, de carácter más impreciso, describen a los biofertilizantes como productos elaborados con mezclas complejas de origen biológico, obtenidos de transformaciones de materia orgánica, que promueven el crecimiento de las plantas y que les proporcionan nutrientes gracias al enriquecimiento del suelo que provocan (López et al., 2018). Por otra parte, el término bioestimulante puede definirse, según la EBIC (European Biostimulants Industry Council), como “un producto que contiene sustancias y/o microorganismos con una función estimulante de los procesos en la propia planta o en el suelo, con el fin de mejorar la captación de nutrientes, la tolerancia a distintos tipos de estrés y la calidad del cultivo” (Castillo et al., 2007; López et al., 2018). Este tipo de productos, aplicados en una dosis adecuada, ejercen una serie de efectos no otorgables a la acción de los nutrientes vegetales (Shekhar et al., 2014). No se regulan dentro del marco legal de los productos fitosanitarios ya que su acción es indirecta, motivo por el que, en ocasiones, su comercialización es más sencilla y rápida (López et al., 2018). En definitiva, los productos bioestimulantes pueden ser considerados como promotores del crecimiento, reductores del estrés o una combinación de ambos (Díaz, 2011).

La utilización de este tipo de productos orgánicos reporta beneficios económicos para los agricultores (Castillo, et al., 2007) y son un factor clave en la transición hacia un modelo agrícola más sostenible. La aplicación de estos productos ha supuesto un mayor aprovechamiento de los terrenos

cultivables ya que incrementan la fertilidad del suelo y disminuyen los periodos de barbecho. Esto implicaría importantes beneficios en aquellas zonas dedicadas al cultivo intensivo (Sayadi-Gmada et al., 2019). Actualmente existe una amplia oferta de estos productos, cuya funcionalidad varía dependiendo del tipo de cultivo para el que vaya destinado (Grageda-Cabrera, et al., 2012). Si bien es cierto que este tipo de productos pueden resultar hasta un 25% más caros que los productos químicos convencionales (López et al., 2018; Vijay et al., 2021), su carácter específico permite satisfacer las demandas individuales de las distintas variedades vegetales. Los estudios de mercado reflejan que, en los próximos años, la venta de bioproductos supondrá más del 40% del volumen de ingresos de las empresas del ámbito agrícola. Además, las previsiones económicas predicen un crecimiento de más del 90% de la demanda de estos productos en los próximos años (Castillo, 2021). En el año 2021 el volumen de mercado oscilaba en torno a 2,6 billones de dólares y los pronósticos reflejan que este valor prácticamente se duplicará en 5 años (Markets and markets, 2022). Esta tendencia al alza se puede observar en la Figura 4, en la que se muestra el consumo mundial de fertilizantes en millones de toneladas a finales de los años 90, así como el valor esperado para el año 2030. De acuerdo con estas predicciones, nos encontramos en la situación más idónea para promover la aplicación de productos biológicos, siendo este el principal reto en el camino hacia una agricultura moderna más eficiente (Espinosa-Antón et al., 2021).

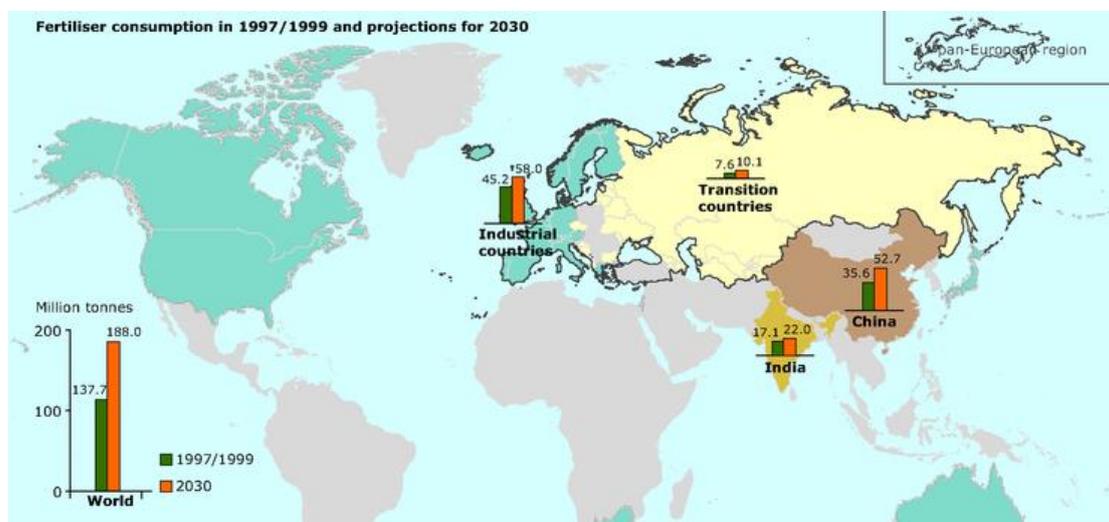


Figura 4. Consumo de fertilizantes entre 1997 y 1999 y las previsiones para 2030. (Obtenido de World Agriculture: Towards 2015/2030. An FAO Perspective. Food and Agriculture Organization, 2003).

1.5.3. Microorganismos: biofertilización y bioestimulación

En la búsqueda actual de alternativas naturales para la biofertilización y bioestimulación, destaca el uso de microorganismos. El empleo de productos de origen microbiano frente al uso de agroquímicos puede aportar multitud de beneficios a nivel de suelo y planta debido a la diversidad y versatilidad metabólica que aportan muchos grupos microbianos (Shekhar et al., 2014; Alcantara et al., 2019; Díaz, 2021). Además, estos seres microscópicos juegan un importante papel en el medioambiente y en los ciclos biogeoquímicos. Entre los beneficios derivados del uso de productos microbianos destacan la estimulación de la germinación, el aporte de nutrientes o la mejora de la disponibilidad de éstos desde el suelo a la planta. Además de la mejora de la estructura del suelo, la

acción como agentes de control biológico, la biorremediación o la mejora ecofisiológica de las plantas. Entre los microorganismos con uso potencial en biofertilización o bioestimulación, se encuentran los microorganismos promotores del crecimiento vegetal o PGPMs (traducido del término inglés, “Plant Growth Promoting Microorganisms”), muy frecuentes en el suelo y en la rizosfera (Grageda-Cabrera et al., 2012). Este grupo de microorganismos, también denominados rizo-microorganismos, comprende mayoritariamente a bacterias, aunque también incluye a hongos. Los PGPMs suelen ser aplicados en agricultura con distinta finalidad, como agentes de control biológico o para la promoción de la bioestimulación y biofertilización (López et al., 2018).

En este ámbito también existen asociaciones beneficiosas naturales como las micorrizas, simbiosis entre micelio fúngico y raíces vegetales. Se trata de un tipo de relación ampliamente extendida por toda la comunidad vegetal y una de las más antiguas, según revelan los registros fósiles. Entre los beneficios que este sistema ofrece a las plantas destacan un mayor desarrollo y activación radicular, la mejora e incremento de la captación de agua y nutrientes, tolerancia a distintos estreses, defensa frente a patógenos y efecto positivo sobre la estructura de los suelos (Grageda-Cabrera et al., 2012).

1.5.4. Empleo de tés o extractos de compost como estrategia para la biofertilización y bioestimulación

Los tés de compost o, en términos generales, extractos líquidos de compost, se pueden obtener a partir de protocolos muy diversos. La aplicación de este tipo de productos derivados del compost ya despertaba un gran interés en la comunidad científica allá por la década de los años 90. De hecho, numerosos trabajos han corroborado el papel beneficioso de estos extractos sobre el control de ciertas patologías vegetales y sobre el aporte nutricional que los vegetales necesitan (Dearborn, 2011; Diáñez et al, 2011; Alurralde et al., 2019). Sin embargo, existe una importante falta de homogeneidad y consistencia en los protocolos aplicados, así como de caracterización físico-química y biológica y catalogación de los productos obtenidos.

Los compost y vermicompost pueden someterse a distintos tratamientos con objeto de aprovechar o potenciar algunas de sus capacidades. De hecho, la simple extracción con agua bajo distintas condiciones puede dar lugar a la obtención de tés o extractos de compost (Diáñez et al, 2011). El fin último de la aplicación de estos productos se dirige a la promoción del crecimiento de la planta y de su estado fitosanitario, así como a la mejora de la estructura del suelo y de su carácter fértil (Mac Donnell, 2018).

Este tipo de extractos se pueden clasificar dependiendo del grado de aireación establecido durante la obtención del producto. De modo que, los extractos pueden obtenerse de forma pasiva, sin aireación, obteniéndose los tradicionalmente denominados tés o extractos de compost no aireados. En este caso sólo se requiere el compost maduro diluido en agua, incubado bajo condiciones de escasa o nula agitación. Normalmente el proceso se prolonga durante 14 días, aunque puede ser variable. Por otra parte, un extracto de compost también puede someterse a protocolos de extracción con aireación, obteniéndose así tés o extractos de compost aireados. Este método de extracción conlleva

un proceso más “activo” que implica la utilización de un aireador para oxigenar el extracto durante el tiempo de preparación. Esto supone una reducción del tiempo de extracción. En ocasiones, este tipo de protocolos se combinan con el uso de aditivos que incrementen las poblaciones microbianas beneficiosas en el producto final. Conocer en detalle cuales son estas poblaciones y el papel que juegan desde un punto de vista edáfico y agronómico es uno de los principales retos derivados de la caracterización de este tipo de productos (Dearborn, 2011; Mac Donnell, 2018).

Tal y como se ha descrito anteriormente, el compostaje supone una de las mejores opciones para la reutilización y revalorización de residuos. Sin embargo, la aplicación de extractos de compost mediante fertirrigación podría suponer un mayor rendimiento económico respecto a la aplicación del producto de forma directa. Esta rentabilidad también podría verse truncada por la menor durabilidad del efecto de los extractos en el tiempo y, por tanto, por la necesidad de ser aplicados de forma reiterada para mantener su acción. Aun así, debido a la facilidad en cuanto a aplicabilidad, su uso hoy en día ya es considerada como la alternativa preferida frente a otras opciones (Milinković et al., 2019). Además de la fertirrigación, existen otras alternativas distintas para su suministro como, por ejemplo, el aporte a los cultivos en forma de aerosoles foliares o su dosificación cercana al suelo para una acción a nivel radicular. Y aunque no tan descrito y empleado en la práctica agrícola convencional sería posible su aplicación en semillas mediante inmersión. O incluso su incorporación dentro de un sistema de cultivo hidropónico (Florez-Jalixto, et al 2021).

En relación a las ventajas derivadas del uso de extractos de compost, estos mejoran el desarrollo de las plantas, ya que favorecen el aporte de nutrientes y microorganismos con potencial agrobiotecnológico (Martin, 2015). Se conoce que parte de la microbiota de los extractos de compost facilitan la absorción, por parte de las plantas, de nutrientes que no se encuentran biodisponibles. Además, algunos microorganismos presentes en los extractos poseen capacidad biopesticida contra fitopatógenos (Mengesha et al., 2017; López et al., 2018), basada en mecanismos de antibiosis, competencia por espacio o sustrato, inducción de resistencia vegetal o parasitismo (Dearborn, 2011). Puesto que la presencia de ciertos microorganismos en los extractos permite el control de algunas enfermedades, mediante la tolerancia o resistencia a las mismas, se produce una mejora sobre la salud vegetal. Por tanto, estos productos pueden ser una alternativa idónea al uso de una gran variedad de plaguicidas de síntesis química (Martin, 2015; Durán et al., 2017).

Ya que se trata de productos derivados del compost, las propiedades físico-químicas y biológicas de los téis o extractos variarán en función de los materiales de procedencia, así como en función de la madurez de los productos utilizados. Adicionalmente, el protocolo de obtención también afectará a la calidad físico-química del producto obtenido, así como a la fitotoxicidad, riqueza y diversidad microbiana de los extractos (Diáñez et al, 2011; Mac Donnell, 2018; Alurralde et al., 2019).

II. OBJETIVOS

El objetivo principal de este trabajo fue la selección de un protocolo de extracción que permitiera la obtención de un extracto de compost que, por su carácter bioestimulante y biofertilizante, presente un alto valor agronómico y pueda ser aplicado como alternativa a los productos de síntesis química. En base a ello, se han planteado los siguientes objetivos específicos:

- I. Caracterización físico-química y biológica de los extractos obtenidos a partir de los diferentes protocolos de extracción.
- II. Evaluación de la toxicidad de los extractos: a nivel de suelo (ecotoxicidad) y planta (fitotoxicidad)
- III. Análisis de la diversidad funcional y metabólica de las poblaciones microbianas presentes en los extractos.

III. MATERIAL Y MÉTODOS

III.1. Muestras de compost

Los extractos acuosos estudiados en este trabajo se obtuvieron a partir de dos muestras de compost de alperujo industrial, de distinta procedencia, catalogadas como ALP1 y ALP2. Por cuestiones de confidencialidad, no se pueden revelar los nombres de las empresas de las que proceden dichas muestras. El compost de alperujo ALP1 estaba constituido por alperujo, gallinaza y paja, en las proporciones 20,2: 3,6: 1 (p/p), respectivamente; mientras que el compost ALP2 se obtuvo a partir de alperujo, poda de olivo y estiércol, en las proporciones 12,5: 3,5: 1 (p/p), respectivamente.

III.2. Diseño Experimental

Con el propósito de alcanzar los objetivos propuestos en este trabajo fin de grado, se planteó el siguiente diseño experimental (Fig. 5). En primer lugar, se llevó a cabo la obtención de los distintos extractos acuosos de compost ALP1 y ALP2 para, posteriormente, someterlos a una serie de análisis que permitió caracterizarlos físico-química y biológicamente, además de aportar información sobre su toxicidad y biodiversidad funcional. Todos estos ensayos, se agruparon en bloques de trabajo claramente diferenciados, en función de las variables objeto de estudio. Así, en primer lugar, se realizó la caracterización físico-química y biológica de los extractos acuosos mediante la determinación del pH, la conductividad eléctrica y la demanda biológica de oxígeno a 5 días (DBO₅). El siguiente bloque se fundamentó en el análisis de la toxicidad de los extractos a dos niveles: a nivel de planta, para lo que se realizó un bioensayo de fitotoxicidad; y a nivel de suelo, para lo que se realizó un ensayo de ecotoxicidad. Finalmente, el trabajo experimental concluyó con el estudio de biodiversidad funcional mediante el empleo de microplacas Biolog Ecoplate™. El último paso consistió en el procesamiento de datos y la realización de un análisis estadístico de los mismos.

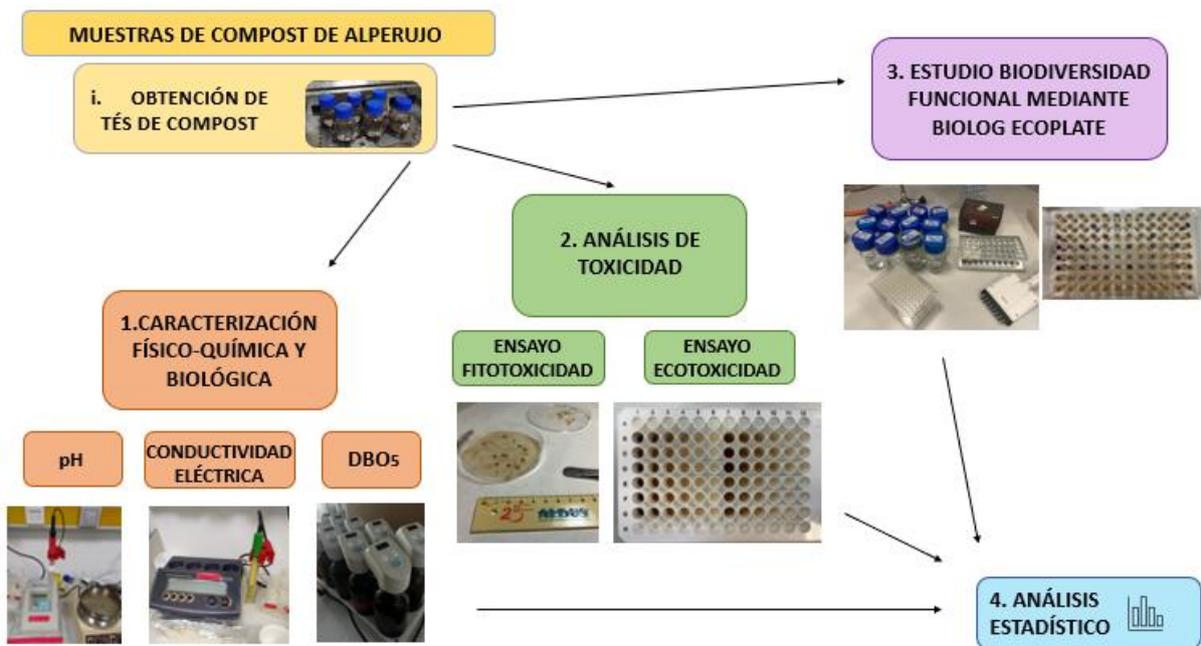


Figura 5. Esquema del diseño experimental.

III.3. Obtención de los extractos de compost

De forma previa a la obtención de los extractos, se determinó la humedad de los compost usando el equipo HE73 Moisture Analyzer (Mettler Toledo, EEUU) (Fig. 6 izqda.). Tras ajustar la humedad de las muestras en torno al 50%, se llevó a cabo la obtención de extractos acuosos en una proporción 1:5 (ps/v) de compost en agua, respectivamente (Fig. 6 dcha.), en botes ISO de 500 mL de capacidad. Los extractos se sometieron a diferentes condiciones de extracción en función de la agitación, la temperatura y tiempo de incubación. Todas las muestras de compost fueron extraídas por triplicado. Las condiciones específicas de cada protocolo de extracción (CEP, del inglés “compost extraction protocol”) se indican a continuación:

- CEP 1. Extracción en agitación a 100 rpm, a temperatura ambiente durante 48 horas (Adaptado de Oka y Yermiyahu, 2002).
- CEP 2. Extracción en agitación a 100 rpm y 40 °C durante 24 horas (Adaptado de Bernal-Vicente et al., 2008).
- CEP 3. Extracción en agitación a 100 rpm a 70 °C durante 12 horas.
- CEP 4. Extracción en estático a temperatura ambiente durante 14 días en oscuridad (Adaptado de Koné et al., 2010).

El extracto obtenido a partir de cada protocolo de extracción se sometió a centrifugación durante 20 minutos a 4.000 rpm para eliminar la fase sólida. Posteriormente, se llevó a cabo un proceso de filtración mediante un sistema filtrante a vacío con Kitasato para eliminar los sólidos en suspensión, utilizando filtros de fibra de vidrio. Finalmente, de todos los extractos obtenidos se

realizaron alícuotas y se conservaron a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta el momento de llevar a cabo la caracterización físico-química y biológica de los mismos.

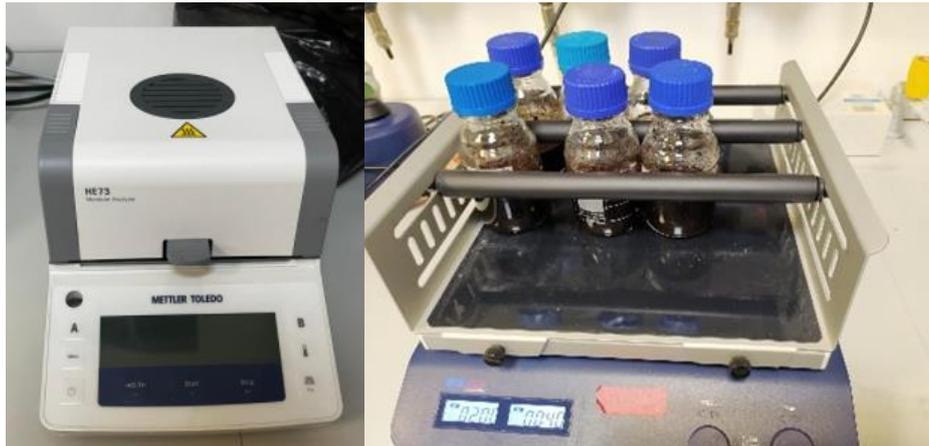


Figura 6. Analizador de humedad (izquierda) y agitador de muestras para protocolos CEP 1, CEP 2 y CEP 3 (derecha).

III.4. Caracterización físico-química y biológica

III.4.1. Medida de pH y conductividad eléctrica

El análisis de la conductividad eléctrica de los extractos se realizó usando el conductímetro modelo HI 2315 Conductivity Meter (Hanna Instruments, USA) (Fig. 7 izqda.). Los resultados se expresaron como milisiemens por centímetro (mS/cm). Para la medida de pH se utilizó un pH-metro Crison BASIC 20 (Crison Instruments, S.A., Barcelona, Spain) (Fig. 7 dcha.). En todos los casos, se realizaron 3 repeticiones de cada medida para cada uno de los extractos obtenidos a partir de cada protocolo. La medida de ambos parámetros se llevó a cabo de forma directa sobre los extractos previamente obtenidos.



Figura 7. PH-metro (izquierda) y conductímetro (derecha).

III.4.2. Determinación de la demanda biológica de oxígeno a 5 días (DBO₅)

La demanda biológica de oxígeno (DBO), expresada como el peso de oxígeno consumido por unidad de volumen (mg/L), durante un periodo y temperatura determinados, es un parámetro que se correlaciona directamente con la cantidad de materia orgánica presente en la muestra objeto de estudio. Se utilizó el sistema DBO sensor análisis DBO (Velp Scientifica Srl, Italia) para la determinación de este parámetro. Dicha determinación se basó en la preparación de la dilución 10⁻² de los extractos y su incubación con agitación constante con mosca magnética a 60 rpm durante 5 días, a una temperatura de 25 °C. La incubación de las muestras bajo las condiciones descritas se llevó a cabo en unos botes especiales topacio (Fig. 8) para disipar calor, en caso de que fuese generado, durante la incubación. El fundamento de esta técnica es la liberación de CO₂, por parte de los microorganismos presentes en la muestra, como producto del consumo de oxígeno para su actividad metabólica. Este CO₂ liberado es captado en cada botella gracias a un absorbente constituido por hidróxido potásico (KOH). Para homogeneizar las condiciones de operación se determinó la misma cantidad de KOH a emplear en todos los botes. Además, a modo de control, en cada tanda de botes se incluyó un bote con agua destilada. La selección de la escala también fue realizada según las instrucciones del fabricante del equipo (Velp Scientifica, BOD Sensor, F102B0133). El equipo realizó medidas cada 24h durante 5 días, por tanto, los valores obtenidos permitieron el cálculo de la DBO₅ real mediante la siguiente fórmula:

$$DBO_{real} \left(\frac{mg}{L} \right) = (DBO_{muestra} - DBO_{control}) \times \text{factor de dilución}$$



Figura 8. Equipo completo de análisis (izquierda), botella individual antes de ser colocada en la plataforma de agitación (derecha).

III.5. Análisis de toxicidad

El análisis de toxicidad de los extractos de compost se llevó a cabo mediante la realización de dos ensayos diferentes: el estudio de germinación sobre semillas de berro y sobre la bioluminiscencia emitida por la bacteria *Allivibrio fischeri*. De este modo, se puede ofrecer una perspectiva más general de cara a la aplicación agronómica de los extractos.

III.5.1. Bioensayo de fitotoxicidad

Zucconi et al. (1985) definieron la fitotoxicidad como “la condición o calidad del compost que influye negativamente en el crecimiento vegetal”. El estudio de este parámetro es importante ya que es indicativo de la estabilidad y del estado de madurez del compost.

El análisis de la fitotoxicidad en los extractos obtenidos a partir de cada compost y mediante los diferentes protocolos de extracción se llevó a cabo mediante un bioensayo de germinación en semillas de berro (*Lepidium sativum*), adaptado del método descrito por Zucconi et al. (1981 a, b). Para ello, 2 mL de una dilución 1/10 de cada extracto, se utilizaron para humectar un papel de filtro de 90 mm de diámetro, en el interior de una placa de Petri en condiciones de esterilidad. A continuación, se colocaron 25 semillas de berro en placas de Petri con el papel de filtro humectado con los extractos, y se incubaron en oscuridad a 25 °C durante 48 horas. Se realizaron 2 réplicas de 25 semillas para cada extracto. Adicionalmente, se dispusieron a modo de control placas con semillas de berro humectadas con agua destilada estéril. Tras el periodo de incubación, se interrumpió la germinación y la elongación de las semillas de berro mediante la adición de etanol al 96%. En la Figura 9 se muestra el esquema del procedimiento descrito anteriormente para este ensayo.

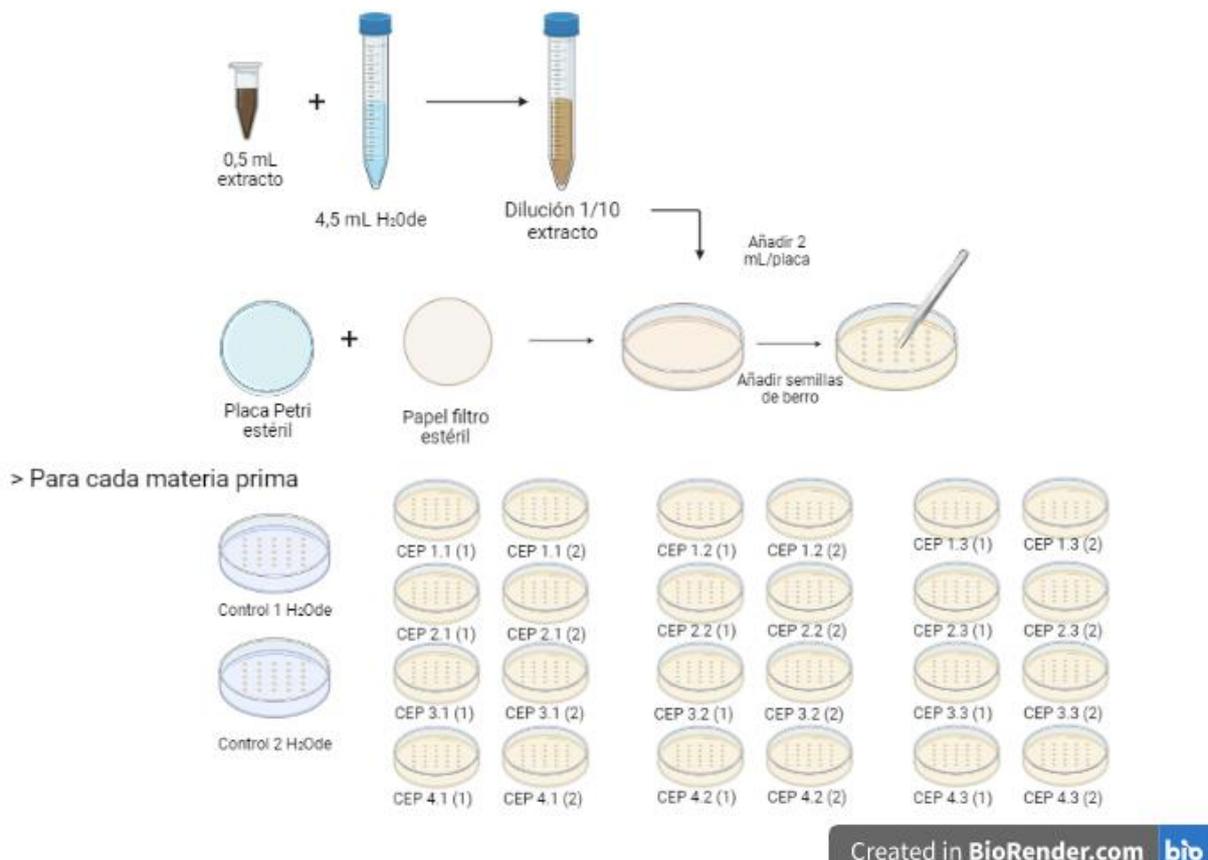


Figura 9. Diseño del ensayo de fitotoxicidad *in vitro* con semillas de berro.

Teniendo en cuenta el número de semillas germinadas, así como la elongación de las radículas en presencia de los extractos, se calculó el Índice de Germinación (IG), en comparación con los

resultados derivados de las semillas control, en ausencia de extracto. La fórmula aplicada para el cálculo del IG fue la siguiente:

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

%G: Porcentaje de semillas germinadas en presencia de los extractos acuosos de compost; L: Longitud media (mm) de la radícula germinada en presencia de los extractos; %Gc: Porcentaje de semillas germinadas en las placas control con agua destilada; Lc: Longitud media (mm) de la radícula de las semillas germinadas en las placas control (mm).

III.5.2. Bioensayo de ecotoxicidad

El ensayo de ecotoxicidad aplicado en este trabajo se basa en la emisión de bioluminiscencia por parte de la bacteria marina *Aliivibrio Fischeri*, de acuerdo con Jarque et al. (2016), tras su contacto directo con los extractos de compost. Esta bacteria emite bioluminiscencia cuando se encuentra en un ambiente óptimo libre de toxicidad. De esta manera, se puede establecer una correlación entre la bioluminiscencia emitida por la bacteria y la carga contaminante o toxicidad de los extractos (Lappalainen et al., 1999, 2001; Castañeda y Celis, 2018). Para la realización de este ensayo se utilizó el kit Aboatox de inhibición de bioluminiscencia de *A. fischeri* (1243-500 BioTox kit). Los bioensayos cinéticos se realizaron en microplacas utilizando el protocolo modificado de Bláha et al. (2010). Atendiendo a las instrucciones aportadas por el fabricante, se llevó a cabo la reconstitución y dilución adecuada de *A. fischeri* (cepa NRRL-B-11177), según la normativa ISO 11348-3 (1998), en una solución de NaCl 2%. Por otro lado, se prepararon diluciones seriadas (1/2), directamente en la microplaca, según el esquema mostrado en la Figura 10. Para ello, se repartieron 160 μL de cada extracto de compost, a una concentración de 100 $\mu\text{L mL}^{-1}$, en los pocillos pertenecientes a la columna 1 y 7 (filas B-H). Se realizaron 3 réplicas de cada extracto de compost. La fila 1 se destinó a los controles positivos, por lo que se colocaron 80 μL de NaCl al 2% (p/v) en cada pocillo. Posteriormente, se realizaron diluciones seriadas (1/2), transfiriendo secuencialmente 80 μL desde los pocillos situados en la columna 1 hasta los de la columna 6, y desde la columna 7 hasta la 12, con el uso de una pipeta multicanal. Finalmente, tanto en las columnas 6 como 12 se retiraron los 80 μL sobrantes de la preparación de las diluciones, garantizando que todos los pocillos tuviesen el mismo volumen de muestra. Las concentraciones finales analizadas fueron 100; 50; 25; 12,5; 6,25 y 3,12 $\mu\text{L mL}^{-1}$ (Fig. 10).

Las medidas se realizaron en el luminómetro Luminoskan Ascent (Thermo Fisher Scientific, EE. UU) mediante el uso de Ascent Software v.2.4.1. El luminómetro se configuró para la adición de 20 μL de la suspensión bacteriana en cada pocillo. Posteriormente, se analizó la luminiscencia emitida por pocillo tras 5 min de interacción bacteria-muestra. La inhibición de la luminiscencia se calculó a partir de la siguiente fórmula:

$$INB(\%) = 100 - \left(\frac{ITP}{ITC} \right) \times 100$$

Donde:

INH% es porcentaje de inhibición de la emisión de luz con respecto al control.

ITP es la luminiscencia analizada en la muestra de ensayo (mV).

ITC es la luminiscencia analizada en el control (mV).

Para el cálculo de la EC50 (concentración de la muestra que provoca una reducción del 50% de la luz emitida por la bacteria), se obtuvieron las líneas de regresión lineal de la concentración frente al INH%. A partir de este factor, se calcularon las unidades de toxicidad (UT) (Sprague y Ramsay, 1965), según la fórmula:

$$UT = \left(\frac{1}{EC50} \right) \times 100$$

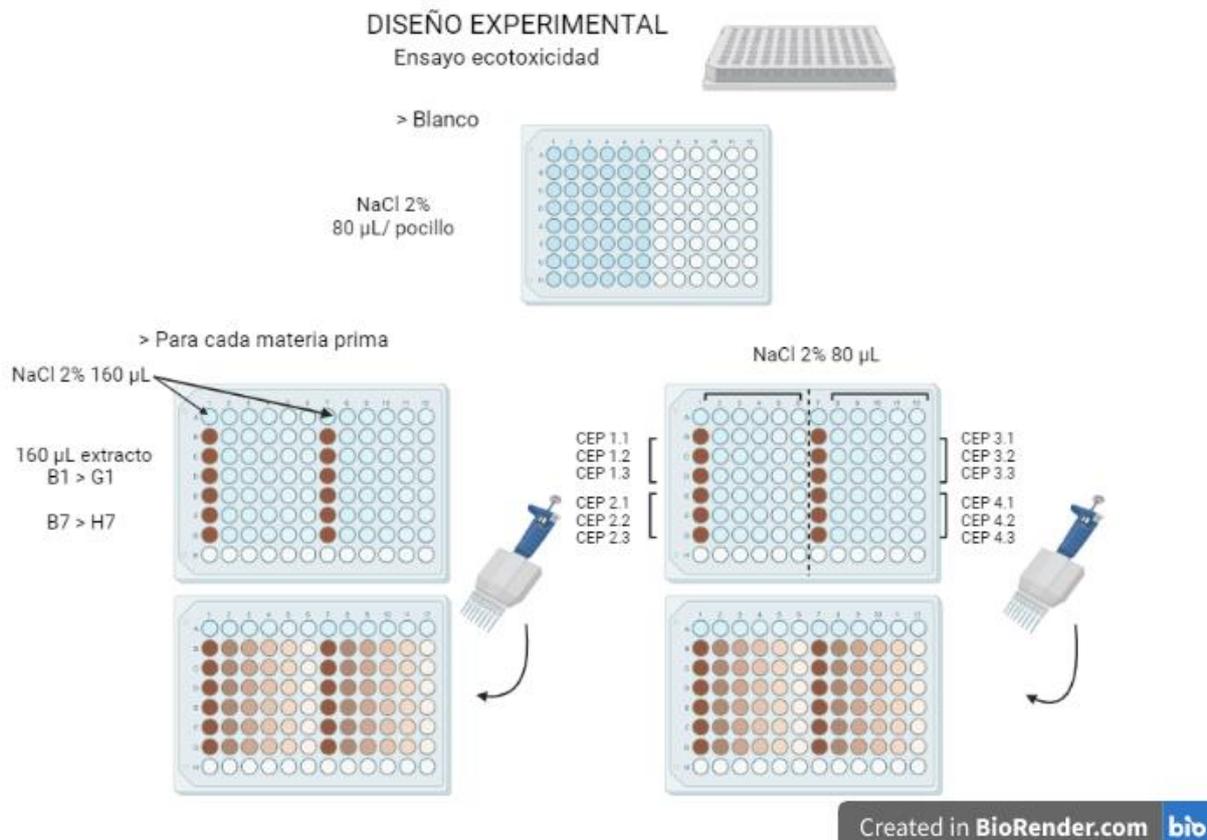


Figura 10. Diseño experimental aplicado para el ensayo de ecotoxicidad con *A. fischeri*.

III.4. Estudio de la biodiversidad funcional

La biodiversidad funcional fue determinada mediante el estudio del perfil fisiológico a nivel de comunidades usando microplacas Biolog Ecoplate™ (Biolog, USA). Gracias a este análisis se pueden analizar diversas interacciones entre microorganismos y el medio ambiente, en función de la utilización de distintos sustratos nutricionales. Estas microplacas poseen 3 bloques de pocillos idénticos con 31

sustratos carbonados liofilizados por bloque, que la comunidad microbiana de un determinado sustrato puede usar como nutrientes (Martínez-Gallardo et al., 2021). El estudio de la biodiversidad funcional se realizó adaptando el protocolo de Feigl et al. (2017). Para ello, se prepararon diluciones 10^{-3} en solución salina estéril al 0,9% (p/v) a partir de los extractos de compost. Posteriormente, con la ayuda de una pipeta multicanal, se transfirieron 150 μ L de la dilución previamente indicada en cada pocillo de la microplaca (Fig. 11).

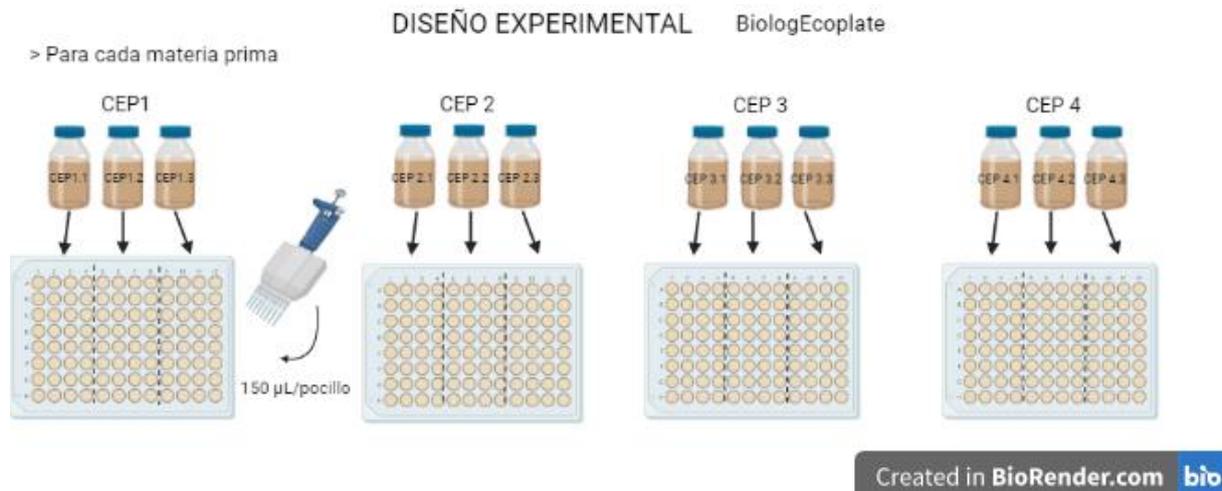


Figura 11. Diseño experimental aplicado para el ensayo de microplacas Biolog Ecoplate TM.

A continuación, las microplacas inoculadas con las muestras se incubaron a 30 °C durante 72h. Pasado este tiempo, se midió la densidad óptica en cada pocillo (DO_i) a una longitud de onda de 590 nm en un espectrofotómetro de microplacas EON (Biotek, EE. UU.) (Fig. 12). La DO_i fue corregida con la DO del control, equivalente a un pocillo que contenía solamente agua. A partir de estas medidas de DO se pudieron calcular los siguientes índices de biodiversidad funcional:

- La **riqueza funcional (R)**, correspondió al sumatorio de pocillos dónde:

$$DO_i \geq 0,15$$

- La **intensidad metabólica (AWCD**, en inglés "average well color development"), correspondiente al desarrollo medio de color por pocillo, calculada mediante la siguiente fórmula:

$$AWCD = \sum \left(\frac{DO_i}{N} \right)$$

Dónde, N corresponde al número total de pocillos.

- La **biodiversidad funcional**, expresada como **índice de Shannon (H')**, combina los parámetros anteriores. Este parámetro aporta una medida de los rasgos funcionales de la comunidad microbiana presente en los extractos basada en la capacidad de metabolizar diferentes sustratos y la intensidad aplicada para cada uno de ellos. El H' revela la heterogeneidad de la microbiota presente en la muestra y se calcula mediante la siguiente fórmula:

$$H' = \sum p_i \ln(p_i), \quad \text{donde } p_i = \left(\frac{DO_i}{\sum DO_i} \right)$$



Figura 12. Lector de microplacas EON.

III.5. Análisis de datos

El procesamiento y agrupación en gráficos de los datos se realizó mediante el programa Microsoft Office Excel 2010 para Windows. En este caso fue necesario tener en cuenta que se trabajó con 3 réplicas y que la representación se realizó de acuerdo con los promedios y las desviaciones estándar. Posteriormente, se realizó un análisis estadístico para evaluar la influencia del tipo de compost (ALP1 y ALP2), así como de los distintos protocolos de extracción (CEP1, CEP2, CEP3 y CEP4) sobre las variables de estudio. Para ello, se aplicó un Análisis de la Varianza (ANOVA) multifactorial a un intervalo de confianza del 95%. También se realizaron Test de Mínima diferencia Significativa de Fischer (LSD) para establecer los distintos grupos de homogeneidad en función de los distintos niveles de cada factor. Finalmente se llevó a cabo un test de Pearson para establecer las posibles correlaciones entre variables, así como un análisis de funciones discriminantes con fines predictivos. El tratamiento estadístico se llevó a cabo mediante el software estadístico Statgraphics XVIII Centurión (Statistical Technologies, Inc).

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A continuación, se mostrarán los resultados obtenidos tras llevar a cabo la caracterización físico-química y biológica de los extractos acuosos procedentes de los compost ALP1 y ALP2, así como el estudio de su toxicidad y funcionalidad. Así, los resultados se agruparán en cuatro apartados bien diferenciados: (i) caracterización físico-química y biológica, (ii) análisis de toxicidad, (iii) estudio de la biodiversidad funcional y, finalmente, (iv) un análisis comparativo global.

IV.1. Caracterización físico-química y biológica

En una primera fase de estudio se llevó a cabo la caracterización físico-química y biológica de los extractos acuosos obtenidos a partir de las muestras de compost de alperujo ALP1 y ALP2. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 13. Los valores de pH derivados de los extractos obtenidos a partir del compost ALP1 fueron generalmente inferiores a los observados para los extractos procedentes de ALP2 (Fig. 13a). A pesar de estas diferencias, todos los extractos obtenidos presentaron pH alcalino, a diferencia de otros autores que han trabajado con este tipo de compost y reportaron valores en torno a 7-7,5 de pH (Alurralde et al., 2019; Milinković et al., 2019), más próximos a la neutralidad. Esta diferencia podría deberse a las características intrínsecas al propio material de partida e incluso a los procesos de extracción.

En la Figura 13b se presentan los valores de conductividad eléctrica, expresados en mS/cm. Los extractos derivados de ALP1 presentaron valores de conductividad que oscilaron entre 4,73 y 6,40 mS/cm, mientras que en el caso de los extractos derivados de ALP2 se incrementaron ligeramente los valores, estando comprendidos en un rango entre 4,83 y 8,23 mS/cm. En este caso, la procedencia de las materias primas, así como el protocolo de extracción influyeron significativamente sobre los resultados obtenidos (Tabla 1, Fig. 14a). Otros estudios descritos previamente sobre el análisis de conductividad eléctrica en extractos de compost han mostrado datos muy similares a los obtenidos en este trabajo. Así, Milinković et al. (2019), obtuvieron datos de conductividad eléctrica en torno a 4,11 mS/cm a partir de extractos de compost elaborado con restos vegetales. Otros téis de compost a base de alperujo mostraron valores de conductividad comprendidos entre 3,21 y 7,31 mS/cm, rango similar al encontrado en este trabajo (Mascareño Varas y de Bustos, 2019).

Finalmente, en la Figura 13c se representan los valores de demanda biológica de oxígeno (DBO₅) evaluados en los distintos extractos de compost e interpretados como consumo de oxígeno (mgO₂/L). De forma general, se puede interpretar que en los extractos obtenidos a partir de ALP2 existía un mayor contenido en materia orgánica, ya que los valores de DBO₅ fueron superiores. Los extractos acuosos obtenidos a partir de las muestras ALP2, mediante los protocolos de extracción CEP3 y CEP4, mostraron valores de DBO₅ muy superiores al resto de los extractos, mientras que los obtenidos a partir del protocolo CEP2 fueron los más bajos. Al igual que en el caso del pH y la conductividad, los valores de DBO₅ se vieron, en general, afectados significativamente por la materia prima, el protocolo de extracción y la interacción entre ambos factores (Tabla 1). Sin embargo, los extractos acuosos derivados de ALP1 fueron más estables y se vieron menos afectados por los protocolos de extracción (Fig. 14b).

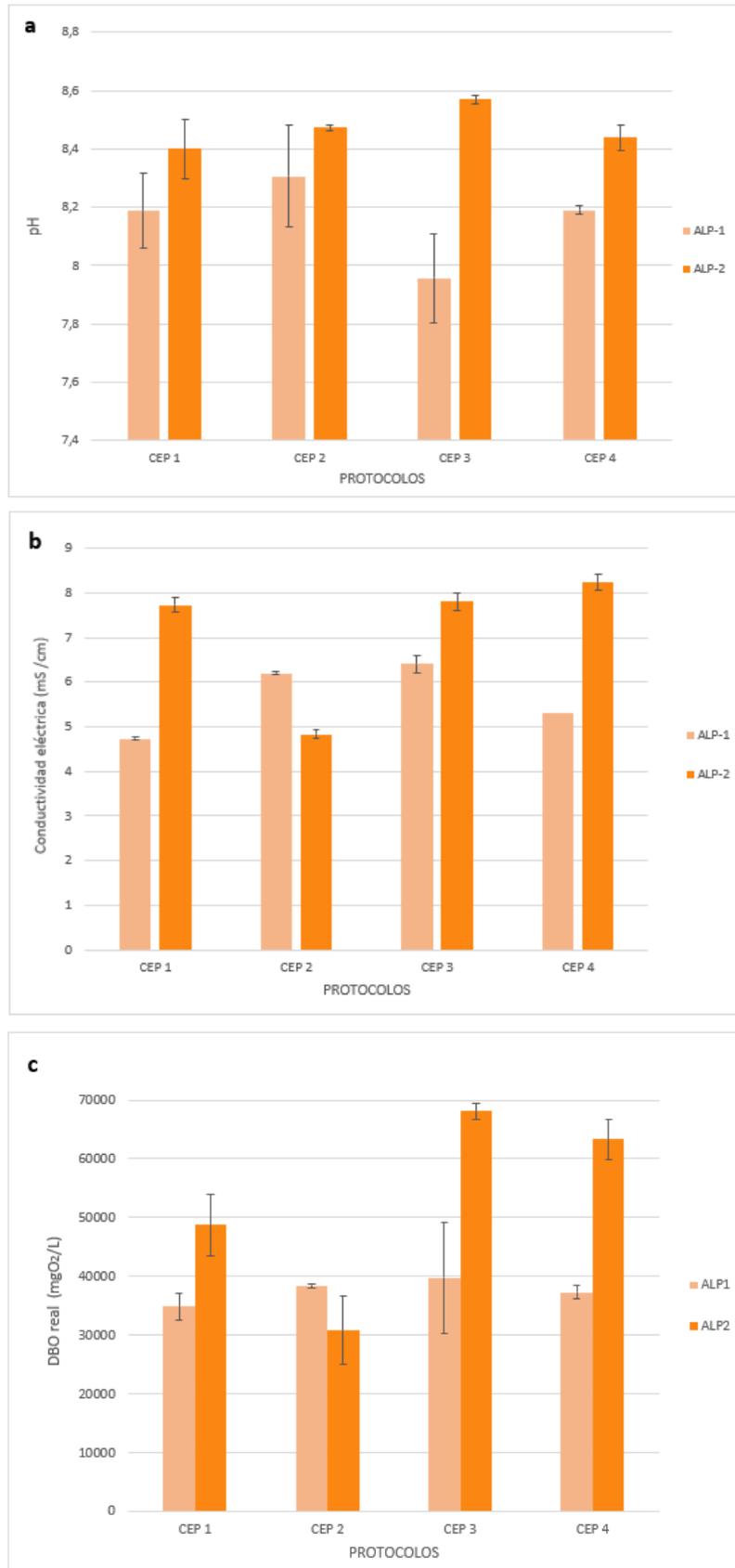


Figura 13. Representación gráfica de los resultados concernientes a la evaluación del pH (a), conductividad eléctrica (b), y demanda biológica de oxígeno (DBO) (c) en los extractos acuosos de compost de ALP1 y ALP2 obtenidos a partir de los diferentes protocolos de extracción. Se muestra la media de tres repeticiones. Las barras de error representan la desviación estándar.

Tabla 1. Tabla ANOVA multifactorial que muestra la influencia de las Materias Primas y el Protocolo de extracción, así como de la interacción entre ambos factores, sobre los parámetros de pH, conductividad eléctrica y DBO₅.

P-valor	pH	Conductividad eléctrica	DBO ₅
Materia Prima	0,3308	0,0093*	0,0003*
Protocolo	0,0002*	0,0052*	0,0035*
Interacción Materia Prima-Protocolo	0,0915	0,0071*	0,0055*

*Los P-valores presentados muestran significancia estadística a un intervalo de confianza del 95%.

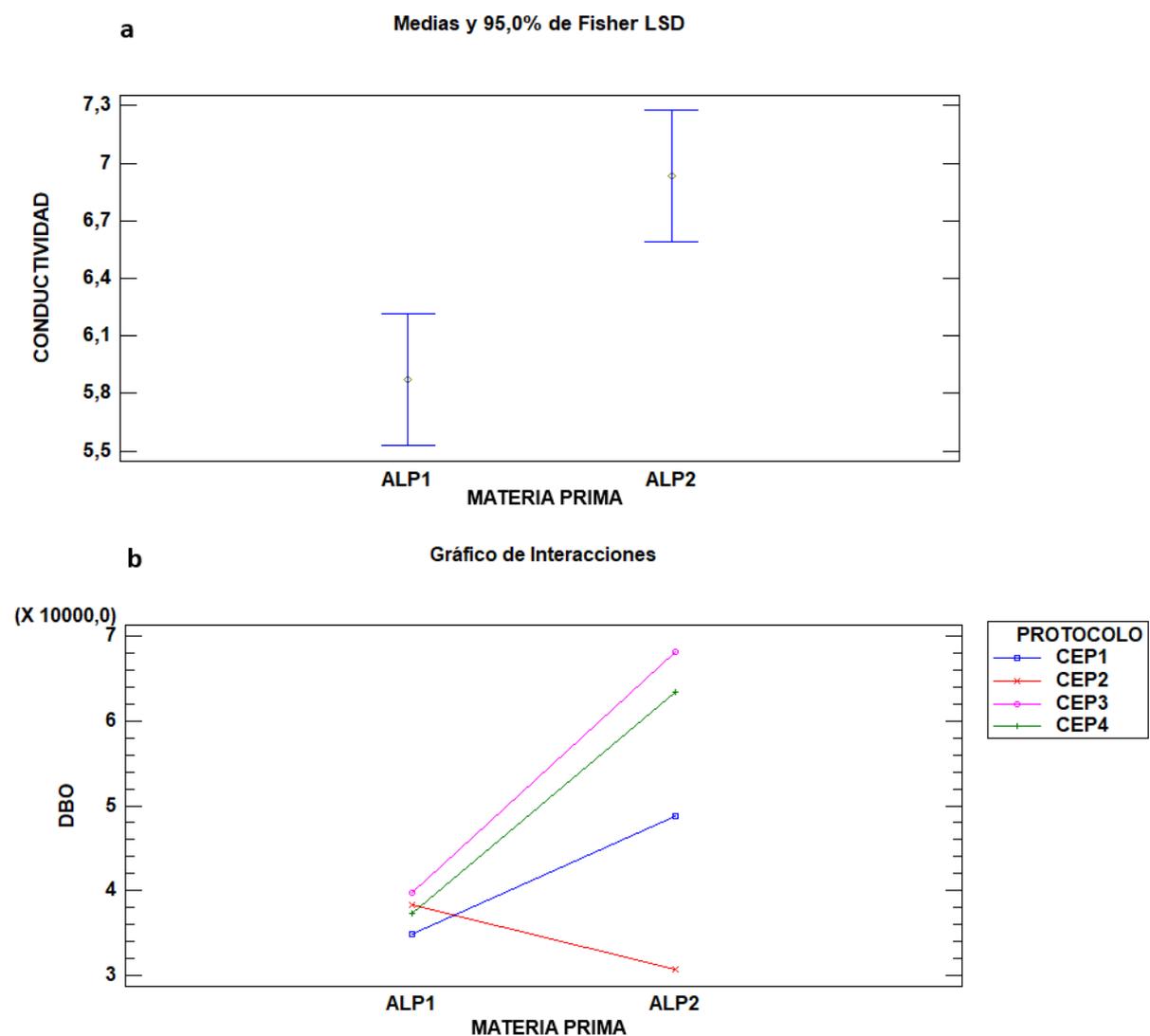


Figura 14. Análisis estadístico de resultados de la caracterización físico-química y biológica. (a) Test de Mínima Diferencia Significativa de Fisher (LSD) al 95% para determinar la influencia de cada una de las materias primas en la conductividad eléctrica y (b) Gráfico de interacciones entre materias primas y protocolos de extracción para la DBO.

Por tanto, a la vista de los resultados, es imposible establecer una relación clara entre el protocolo de extracción y la demanda biológica de oxígeno, ya que los datos son muy dependientes del tipo de material de partida. Por otra parte, comparar este tipo de datos con otros ya publicados es complejo, ya que los protocolos de extracción o las diluciones de extracto pueden ser muy variables y distintas a las aplicadas en este trabajo (Vázquez y Soto, 2011). Los resultados obtenidos son bastante similares a los que se muestran en el estudio realizado por Gueboudji et al. (2021). En él se analizaron extractos líquidos procedentes de la industria oleícola, lo que permite ofrecer una comparativa entre productos con propiedades similares.

A modo de resumen, se puede concluir que los resultados de pH, conductividad y DBO₅ obtenidos a partir de los extractos derivados de ALP2 fueron superiores a los observados para los extractos ALP1, lo que pone de manifiesto la influencia, la enorme influencia de la procedencia en el perfil físico-químico de los extractos.

IV.2. Análisis de toxicidad

IV.2.1. Bioensayo de fitotoxicidad

Para la determinación del efecto fitotóxico, se realizaron bioensayos de germinación *in vitro* siguiendo el protocolo modificado de Zucconi et al. (1981). En la Figura 15 se muestran los resultados relativos a la evaluación de la fitotoxicidad, expresada como índice de germinación (IG, %), tras la aplicación de los extractos acuosos obtenidos a partir de los compost ALP1 y ALP2. Respecto al Índice de germinación, Zucconi et al. (1985) establecieron una clasificación basada en el nivel de fitotoxicidad, de forma que los valores de IG inferiores al 50% eran indicadores de una alta fitotoxicidad; los valores comprendidos entre 50 y 80% indican una fitotoxicidad leve o moderada; valores de IG comprendidos entre 80 y 100% reflejan que el material no es fitotóxico; y, finalmente, los valores de IG superiores al 100% ponen de manifiesto el carácter fitoestimulante del extracto. De acuerdo con esta clasificación, los extractos acuosos de compost obtenidos mediante la aplicación de los protocolos CEP1 y CEP4, podrían considerarse fitoestimulantes. Según Boquete (2021), aquellos extractos de compost no aireados muestran un marcado carácter fitoestimulante. En el caso del trabajo que aquí se describe, sólo podrían considerarse como no aireados los extractos obtenidos mediante el protocolo CEP4. En este caso, el carácter fitoestimulante fue muy dependiente, no sólo del protocolo de extracción, sino de los materiales de partida (Fig. 15).

Aunque, de forma general, se observa que los extractos procedentes de ALP1 son menos fitotóxicos que aquellos que proceden de ALP2, según el test de rangos múltiples no existieron diferencias significativas en función del tipo de compost (Tabla 2, Fig. 16). Sin embargo, si se pudo comprobar la influencia significativa del protocolo de extracción sobre el Índice de Germinación (Tabla 2, $p = 0,0002$), así como de la interacción entre Materia Prima y Protocolo (Tabla 2, $p = 0,0000$). En cualquier caso, el carácter fitotóxico de los extractos procedentes de los protocolos CEP-2 y CEP-3 fue muy variable y dependiente del material de partida.

Así, los extractos acuosos de ALP1 obtenidos mediante los protocolos de CEP2 y CEP3 se consideraron levemente fitotóxicos, mientras que los de ALP2, obtenidos en las mismas condiciones, se consideran fitotóxicos. Otras investigaciones, como la llevada a cabo por Verrillo et al. (2021), muestran que los extractos de compost poseen la capacidad de estimular las actividades fisiológicas tanto a nivel de planta como de semilla. Dichos autores realizaron un ensayo de germinación mediante la aplicación de extractos de compost de cáscara de café, alcachofa y pimienta, en semillas de albahaca (*Ocinum basilicum*), detectándose no sólo ausencia de fitotoxicidad, sino también un cierto efecto fitoestimulante (valores de IG entre 95 y 110%).

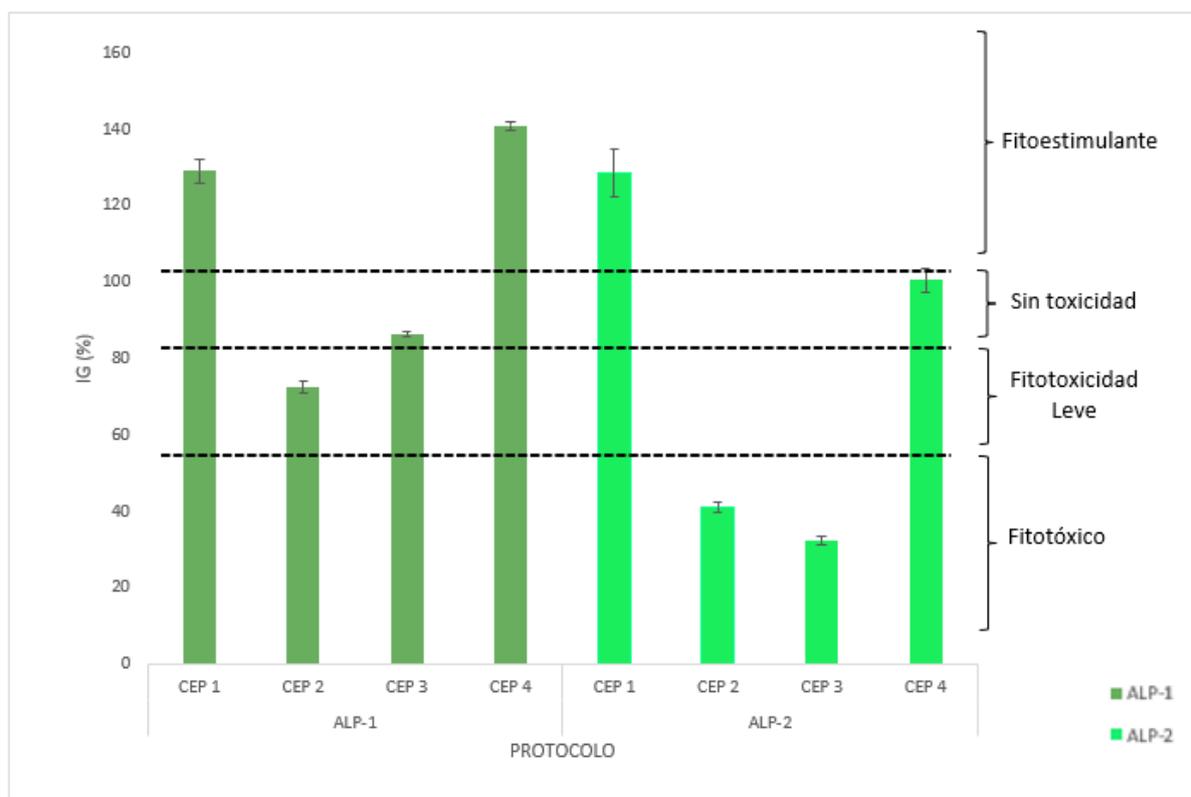


Figura 15. Estudio del Índice de germinación (IG, %) en semillas de berro tras la aplicación de los extractos acuosos de ALP1 y ALP2, obtenidos mediante los cuatro protocolos de extracción (CEP1, CEP2, CEP3 y CEP4). Se muestra la media de tres repeticiones. Las barras de error representan la desviación estándar.

Tabla 2. Tabla ANOVA multifactorial que muestra la influencia de las Materias Primas y el Protocolo de extracción, así como de la interacción entre ambos factores, sobre el Índice de Germinación (%)

P-valor	Índice de germinación (%)
Materia Prima	0,4133
Protocolo	0,0002*
Interacción Materia Prima-Protocolo	0,0000*

*Los P-valores presentados muestran significancia estadística a un intervalo de confianza del 95%.

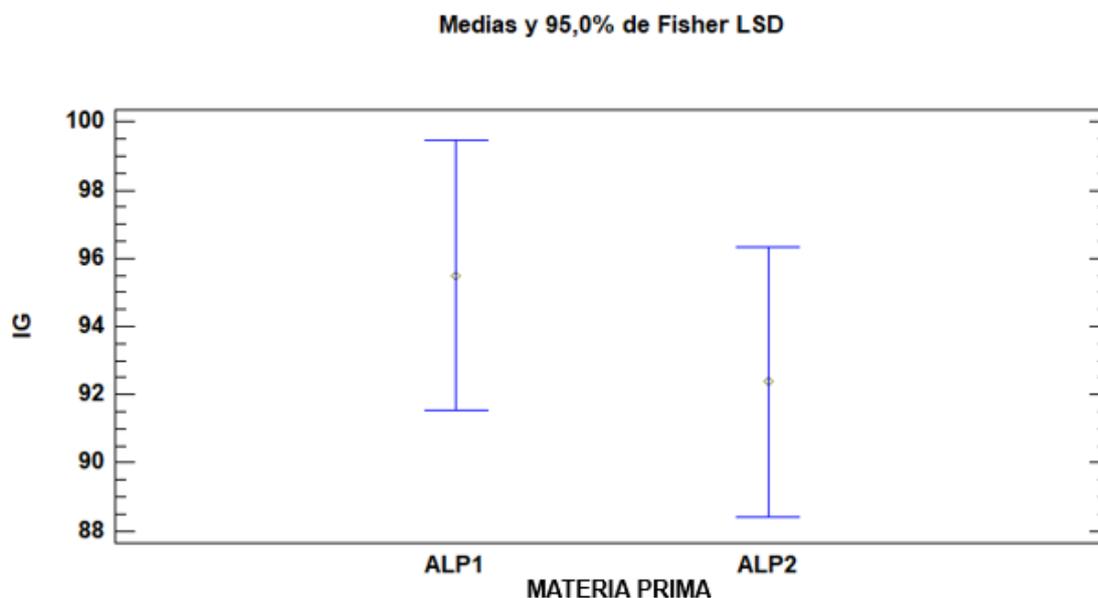


Figura 16. Test de Mínima Diferencia Significativa de Fisher (LSD) al 95% para determinar la influencia de cada una de las materias primas en la fitotoxicidad (IG, %).

IV.2.2. Bioensayo de ecotoxicidad

Para evaluar la ecotoxicidad presente en los extractos acuosos derivados de ALP1 y ALP2 se llevó a cabo un ensayo basado en el estudio de la inhibición de la bioluminiscencia emitida por la bacteria marina *Allivibrio fischeri* tras su contacto con dichos extractos. La Figura 17 muestra los resultados de ecotoxicidad, expresados como unidades de toxicidad (UT). En este caso también se estableció una clasificación del material en función de los valores de ecotoxicidad (Persoone et al., 2003): así, valores de UT superiores a 100 implican ecotoxicidad extrema; valores entre 10 UT y 100 UT suponen una elevada ecotoxicidad; valores entre 1 y 10 UT equivalen a toxicidad moderada; valores comprendidos entre 0,4 y 1 UT representan una leve ecotoxicidad; y, finalmente, valores inferiores a 0,4 UT implican ausencia de ecotoxicidad. Los extractos derivados de ALP1 presentaron valores de ecotoxicidad comprendidos entre 1,77 y 3,45 UT (ecotoxicidad moderada), siendo el mayor valor el obtenido tras la aplicación del protocolo CEP3 (Fig. 17). Sin embargo, en ALP2 la situación fue totalmente distinta, ya que los valores de ecotoxicidad se encontraron entre 24,90 y 54,24 UT, los cuales son indicativos de ecotoxicidad elevada (Fig. 17).

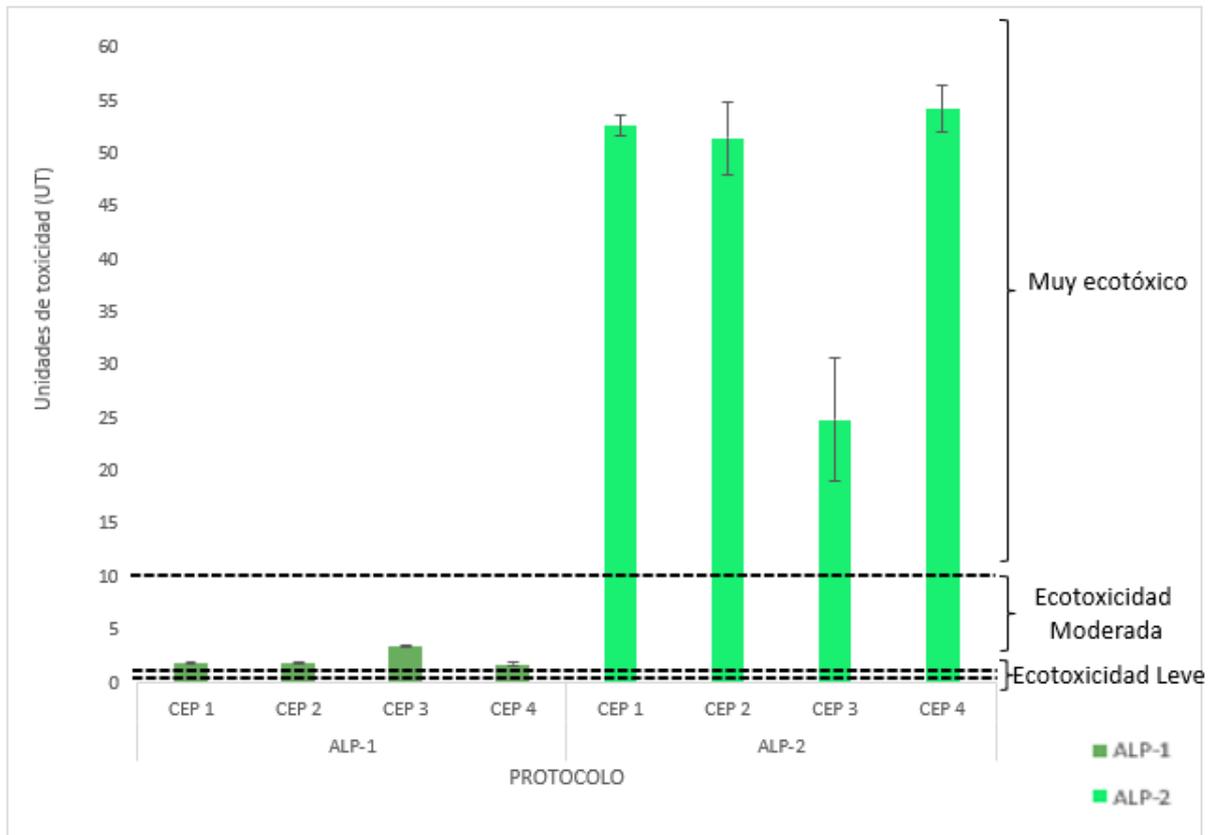


Figura 17. Estudio de ecotoxicidad a partir de los extractos de compost obtenidos a partir de las muestras ALP1 y ALP2, mediante los cuatro protocolos de extracción (CEP1, CEP2, CEP3 y CEP4). Los datos se expresaron en unidades de toxicidad (UT). Se muestra la media de tres repeticiones. Las barras de error representan la desviación estándar.

Las diferencias entre los extractos acuosos de ALP1 y ALP2 fueron muy notables en cuanto a ecotoxicidad (Fig. 17). Independientemente del protocolo de extracción empleado, ALP1 resultó ser mucho menos ecotóxico que ALP2, lo que pudo corroborarse estadísticamente mediante un análisis ANOVA Multifactorial y test de rangos múltiples (datos no mostrados). Así mismo, la Figura 18 representa la influencia de la interacción entre las Materias primas y el Protocolo sobre el nivel de ecotoxicidad de las muestras. En dicha figura se pone de manifiesto que cada uno de los compost utilizados muestra una naturaleza diferente. Mientras que los extractos derivados de ALP1 fueron más uniformes en relación con el protocolo de extracción, mostrando un nivel de ecotoxicidad moderado, no ocurrió lo mismo en el caso de los extractos derivados de ALP2. En este último caso, la aplicación de los protocolos CEP1, CEP2 y CEP4 dio lugar a extractos más ecotóxicos, en comparación con lo observado a partir de los extractos CEP3. Esto hecho se puede explicar por la diferente composición de los compost originales en lo que respecta a sustancias como ácidos húmicos, ácidos fenólicos, o antibióticos, entre otros, que podrían afectar al carácter ecotóxico de los extractos (Acosta et al., 2018; Ezari et al., 2018; Kiss et al., 2021; Martínez-Gallardo et al., 2020, 2021).

El test de bioluminiscencia de *Allivibrio fischeri* pretende conseguir, mediante un rápido y sencillo test, una referencia de lo que podría considerarse no tóxico. Se trata de estimación que permite establecer valores de referencia para determinar la toxicidad en distintos tipos de matrices. No obstante, debe tenerse en cuenta que se trata de una referencia arbitraria y específica de ese organismo (Bláha et al., 2010). Además, aunque ecotoxicidad y fitotoxicidad se espera, *a priori*, que

muestran una misma tendencia, podría darse el caso de que un extracto ecotóxico pudiera contener sustancias fitoestimulantes. Este podría ser el caso de los extractos CEP1 y CEP4, derivados de ALP2, los cuales presentan ecotoxicidad aguda ($UT > 50$) y, sin embargo, estimulan la germinación de semillas ($IG > 110\%$). Este mismo efecto fue descrito por Martínez-Gallardo et al. (2021) en un análisis de los lodos de alpechín almacenados en balsas de evaporación, los cuales presentaban un nivel de ecotoxicidad elevado (26,50 UT) y un carácter fitotóxico leve (70,77% IG). Este tipo de resultados pone de manifiesto la necesidad de evaluar la toxicidad de los extractos desde distintas perspectivas.

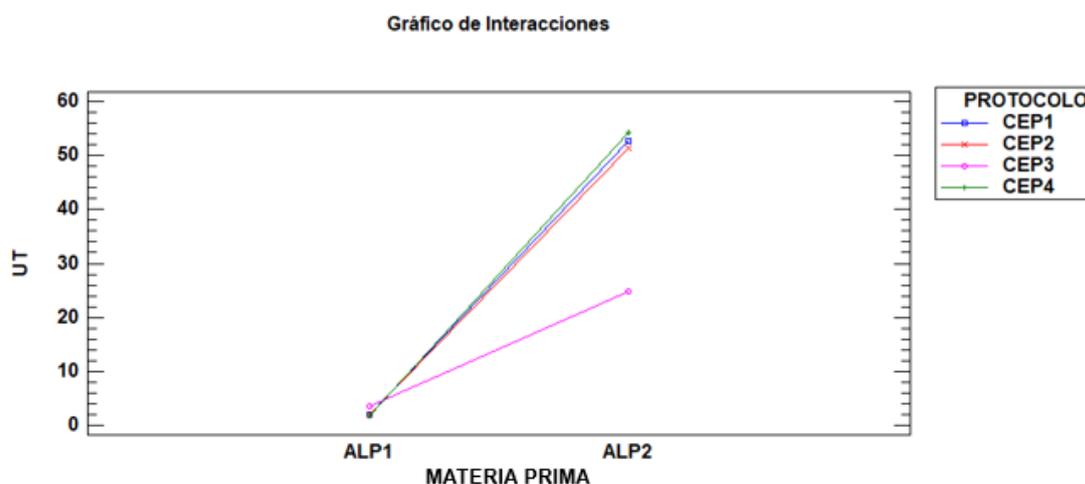


Figura 18. Análisis estadístico de resultados del ensayo de ecotoxicidad mediante un gráfico de interacciones entre materias primas y protocolos de extracción.

IV.3. Estudio de la biodiversidad funcional

La caracterización del perfil fisiológico a nivel de comunidades microbianas permitió determinar la biodiversidad funcional de los extractos acuosos de compost mediante el uso de microplacas Biolog Ecoplate™. A continuación, se muestran los resultados obtenidos, expresados como intensidad metabólica (AWCD) (Fig. 19), riqueza de sustratos (R) (Fig. 20) e índice de Shannon (H') (Fig. 21). La riqueza de sustrato (R) es un parámetro que determina la variedad de sustratos que la comunidad microbiana del extracto puede utilizar, hasta un máximo de 31, valor que se corresponde con el número máximo de sustratos que se puede analizar mediante las microplacas Biolog Ecoplate™. Por otra parte, la intensidad metabólica (AWCD) se mide en términos del promedio de intensidad de color (absorbancia) en los pocillos de la microplaca, en relación con el total de sustratos. Finalmente, el índice de Shannon (H') permite determinar la diversidad funcional, teniendo en cuenta para ello los dos parámetros anteriores.

De forma general, los resultados revelaron una importante relación entre los tres parámetros indicados anteriormente. Se observaron, sin embargo, claras diferencias entre extractos derivados de los distintos compost, ALP1 y ALP2. En general, los extractos procedentes de ALP2 mostraron mayor biodiversidad funcional que los extractos de ALP1. Por otra parte, se detectó un patrón común en la funcionalidad de los extractos derivados de ALP1 y ALP2, en función de los distintos protocolos de extracción. De este modo, los extractos obtenidos mediante el protocolo CEP1, probablemente debido a sus condiciones de extracción menos agresivas, mostraron de forma general mayor biodiversidad funcional. Sin embargo, aquellos tratamientos en los que la temperatura de extracción fue superior,

CEP2 y CEP3, dieron lugar a extractos con capacidades metabólicas claramente reducidas (Fig. 19, 20 y 21).

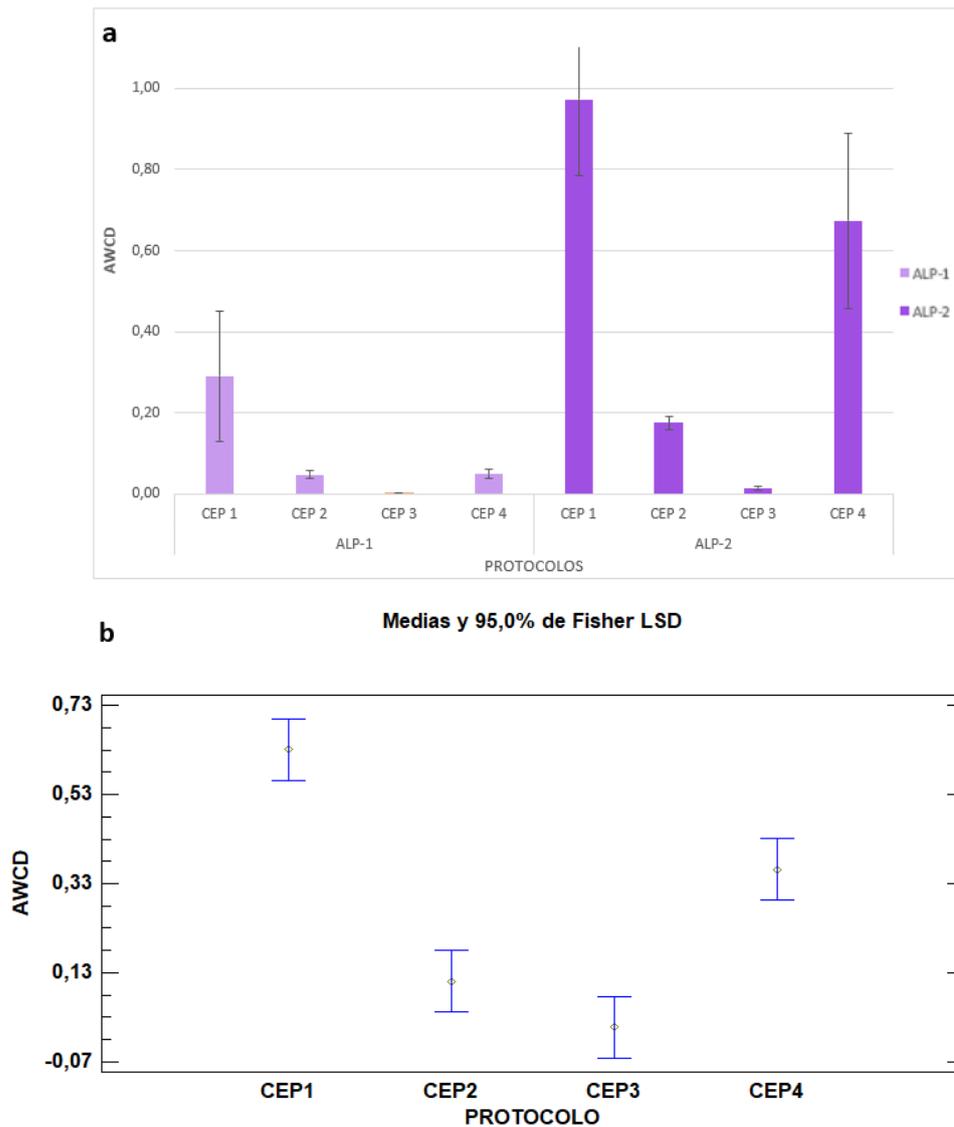


Figura 19. (a) Estudio de la biodiversidad funcional, expresada como intensidad metabólica (AWCD), de los extractos acuosos de las muestras ALP1 y ALP2 obtenidos mediante los cuatro protocolos de extracción. Se muestra la media de tres repeticiones. Las barras de error representan la desviación estándar. (b) Test de Mínima Diferencia Significativa de Fisher (LSD) al 95% de confianza para la variable AWCD en función de los protocolos de extracción. Se muestra la media de tres repeticiones. Las barras de error representan el intervalo LSD de Fisher.

La Figura 19b muestra el test de rangos múltiples derivado del estudio de biodiversidad funcional, expresada como intensidad metabólica (AWCD), sin tener en cuenta la influencia de las materias primas (ALP1 y ALP2). En dicha Figura se muestran 3 grupos de homogeneidad claramente diferenciados. Los valores de AWCD más altos se detectaron en los extractos acuosos obtenidos a partir del protocolo CEP1 seguidos de aquellos obtenidos a partir del CEP4. En ambos protocolos, se aplicaron temperaturas de extracción suaves, cercanas a la ambiental. Sin embargo, los extractos acuosos obtenidos a partir de CEP2 y CEP3 mostraron valores de AWCD significativamente inferiores (Figura 19b). Los valores obtenidos de AWCD a partir de los extractos acuosos de alperujo, con excepción de los obtenidos mediante CEP1, son más bajos que los reportados por Palese et al. (2021)

en tés de compost aireados procedentes de residuos domésticos, los cuales estaban comprendidos entre 0,990 y 0,996. Edenborn et al. (2018) también realizaron un análisis del perfil metabólico pero, en este caso, a partir de tés de compost comerciales de las marcas Aunt Rohde's y Soil Mender. En este caso, se detectaron valores de intensidad metabólica que oscilaron entre 0,5 y 0,7, los cuales concuerdan con los obtenidos a partir del extracto acuoso de ALP2 sometido al protocolo de extracción CEP4.

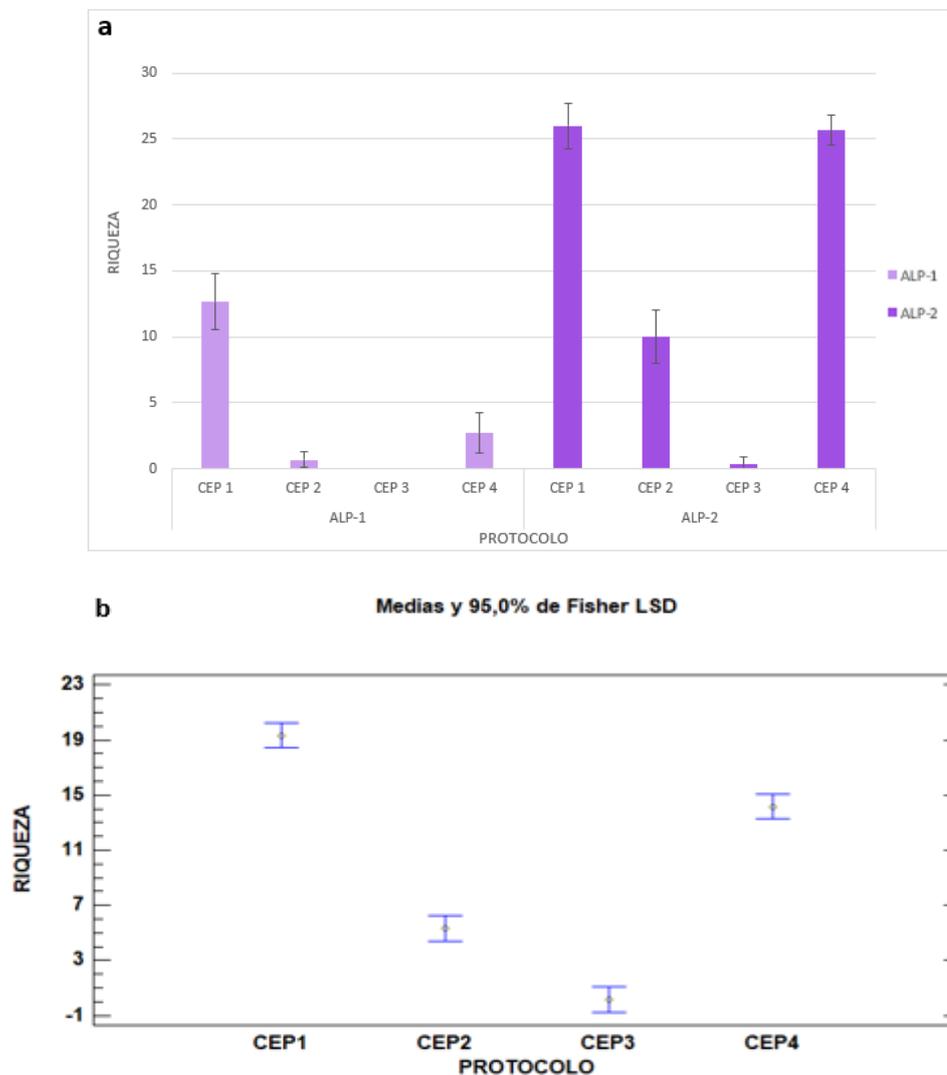
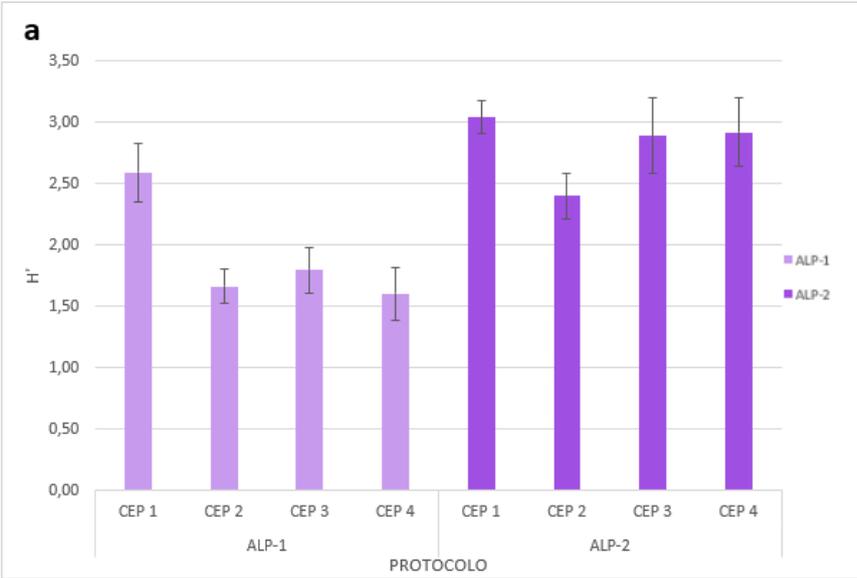


Figura 20. (a) Estudio de la biodiversidad funcional, expresada como riqueza de sustratos (R), de los extractos acuosos de las muestras ALP1 y ALP2 obtenidos mediante los cuatro protocolos de extracción. Se muestra la media de tres repeticiones. Las barras de error representan la desviación estándar. (b) Test de Mínima Diferencia Significativa de Fisher (LSD) al 95% de confianza para la variable R en función de los protocolos de extracción. Se muestra la media de tres repeticiones. Las barras de error representan el intervalo LSD de Fisher.

Tras el análisis de riqueza de sustratos (R) (Fig. 20) se observó una tendencia muy similar a lo detectado para la variable intensidad metabólica (AWCD). Los valores de R a partir de los extractos derivados de ALP2 fueron muy superiores a los observados a partir de los extractos ALP1 (Fig. 20a), aunque en ambos casos los extractos derivados de CEP1 y CEP4 fueron los que mostraron una mayor riqueza (R) de sustratos. En este caso, el test de rangos múltiples reveló la existencia de 4 grupos de homogeneidad perfectamente diferenciados (Fig. 20b), de forma que los valores de R

significativamente más bajos se detectaron, en general, a partir de los extractos derivados de CEP3. Los resultados obtenidos por Edenborn et al. (2018) a partir de tés de compost muestran valores de riqueza de sustrato (R) entre 15 y 19, los cuales únicamente son superados, en este trabajo, por los extractos de compost ALP2, obtenidos a partir de los protocolos CEP1 y CEP4 (valores en torno a 26). Por otro lado, independientemente de la materia prima de procedencia, los valores de R se encontraron muy cercanos a 0 en los extractos obtenidos a partir del protocolo CEP3. Esto tiene sentido, teniendo en cuenta que la temperatura de extracción aplicada en este protocolo fue de 70 °C.



b Medias y 95,0% de Fisher LSD

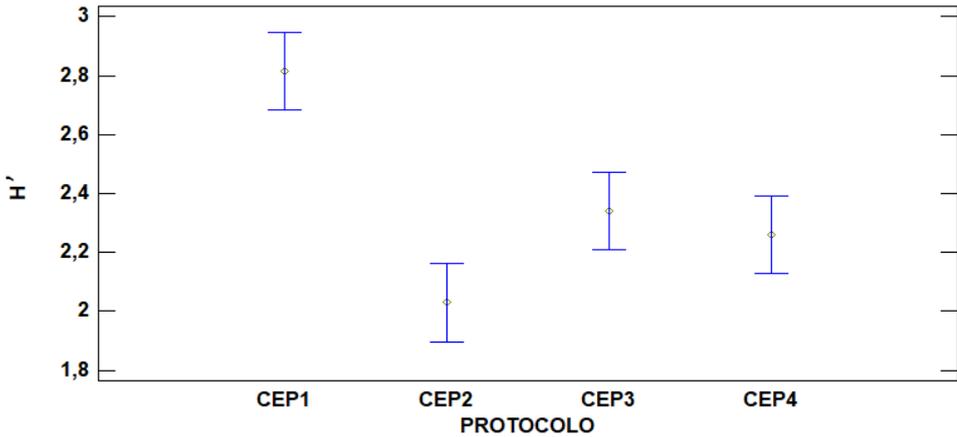


Figura 21. (a) Estudio de la biodiversidad funcional, expresada como índice de Shannon (H'), de los extractos acuosos de las muestras ALP1 y ALP2 obtenidos mediante los cuatro protocolos de extracción. Se muestra la media de tres repeticiones. Las barras de error representan la desviación estándar. (b) Test de Mínima Diferencia Significativa de Fisher (LSD) al 95% de confianza para la variable H' en función de los protocolos de extracción. Se muestra la media de tres repeticiones. Las barras de error representan el intervalo LSD de Fisher.

En la Figura 21 se muestran los resultados derivados del análisis de diversidad funcional microbiana, expresada en este caso mediante el índice de Shannon (H'). De forma general, se pudo apreciar que los extractos acuosos de ALP2 presentaron valores de H' superiores, en un rango aproximado de 2,4 a 3,0, mientras que los extractos acuosos obtenidos a partir de ALP1 mostraron

valores de H' , en general inferiores, en un rango aproximado de 1,6 a 2,6 (Fig. 21a). El valor de H' en ecosistemas naturales varía entre 0,5 y 5, aunque su valor normal está entre 2 y 3; valores inferiores a 2 se relacionan con baja diversidad, mientras que los superiores a 3 son reflejo de una elevada diversidad. Por consiguiente, los extractos acuosos obtenidos a partir de ALP2, que presentaron valores superiores a 2,5 ponen de manifiesto el gran potencial funcional presente en este tipo de extractos acuosos. Edenborn et al. (2018) mostraron resultados muy similares a los valores de H' obtenidos en este estudio. Sin embargo, estos resultados son ligeramente inferiores a aquellos obtenidos por Palese et al. (2021) (valores de H' entre 3,32 y 3,41) a partir de tés de compost procedentes de residuos urbanos aireados.

La Figura 21b muestra el test de rangos múltiples para los valores del índice de Shannon (H'), en función del protocolo de extracción. Así, en términos generales fue posible diferenciar 3 grupos de homogeneidad, destacando especialmente los valores de H' derivados de los extractos CEP1. Mientras que los anteriores parámetros de diversidad, AWCD y R, tienen un comportamiento muy similar, el Índice de Shannon (H') tiene en cuenta tanto riqueza como abundancia de especies, por lo que la interpretación puede resultar un tanto diferente. En este caso, los valores de H' fueron globalmente más bajos a partir de los extractos derivados del protocolo CEP2, mientras los extractos CEP3 y CEP4 fueron estadísticamente similares en términos de diversidad H' .

IV.4. Análisis comparativo

Con objeto de establecer una relación entre todos los parámetros analizados, se realizó un test de correlaciones Pearson Producto-Momento con una significancia del 95% (Fig. 22a) y un análisis de funciones discriminantes, con objeto de clasificar los resultados en función de los protocolos de extracción (Fig. 22b). Resulta destacable que, en términos generales, las variables relacionadas con diversidad funcional (AWCD, R y H') correlacionaron positivamente con la ecotoxicidad (UT) y negativamente con el pH (Fig. 22a). La relación inversamente proporcional entre los parámetros AWCD y pH también ha sido previamente descrita por Feigl et al. (2017). Estos autores demostraron, gracias a estudios de biodiversidad funcional, que la aplicación de barro rojo (pH alcalino) provocaba una estabilización biológica de las comunidades microbianas en la zona de aplicación, influyendo así positivamente sobre el estado de salud general de los suelos.

El estudio de correlaciones de Pearson también muestra una importante correlación positiva entre la ecotoxicidad y la conductividad eléctrica (Fig. 22a). Una relación similar ha sido descrita anteriormente por Martínez-Gallardo et al. (2021), a partir de lodos de alpechín almacenados en balsas de evaporación en desuso. Los valores altos de conductividad eléctrica suponen mayor concentración de sales o iones en el extracto que pueden propiciar una mayor presión tóxica. En el caso de los extractos obtenidos en este trabajo, a partir de compost principalmente compuesto de alperujo, el alto nivel de conductividad eléctrica y ecotoxicidad se asocia también al elevado contenido en polifenoles, los cuales pueden tener un marcado carácter antimicrobiano.

Por otro lado, la reducción del índice de germinación suele estar directamente asociada al aumento de la concentración de materia orgánica, lo que se traduciría en mayores valores de DBO_5

(Young et al., 2012). Sin embargo, el análisis de correlaciones, en este caso, resultó contradictorio, ya que se detectó una correlación positiva significativa entre ambos parámetros. Este hecho puede deberse al comportamiento “anárquico” de la variable DBO₅ descrito previamente en este trabajo (Fig. 13c, Fig. 15b). Los resultados en este sentido deberían ser analizados con cautela, ya que la correlación positiva detectada, entre DBO₅ e IG podría ser irreal y estar, en este caso, en el límite de la significancia estadística. Más aún, podría ser el reflejo de otras correlaciones entre otras variables no analizadas en este trabajo, pero que se encuentran estrechamente relacionadas con el índice de germinación (p. ej. extracción de sustancias fitoestimulantes).

En cuanto al análisis de funciones discriminantes (Figura 22b), se indica a continuación la ecuación o función principal que permite discriminar entre los distintos protocolos de extracción aplicados. A esta ecuación se le denomina primera función discriminante estandarizada (Función 1) y gracias a ella es posible dar una explicación relativa del 90,78% de todos los resultados agrupados en función de los protocolos de extracción. Su expresión matemática es la siguiente:

$$0,578379 \times AWCD - 5,16705 \times RIQUEZA + 0,213036 \times H' + 2,63984 \times UT + \\ 0,0549252 \times DBO + 1,04395 \times pH + 2,55916 \times CONDUCTIVIDAD + 0,342989 \times IG$$

A la vista de lo observado en la Figura 22b, fue posible clasificar todos los resultados del estudio, en 4 clúster bien diferenciados, que se correspondieron con los 4 protocolos de extracción aplicados. Este tipo de análisis nos permite no sólo clasificar las observaciones del estudio en función de similitudes, sino también clasificar nuevas observaciones como pertenencia a uno o más grupos. Así, los resultados del análisis revelaron una mayor similitud entre los protocolos CEP2 y CEP3, mientras que los protocolos CEP1 y CEP4 fueron muy diferentes entre sí, y respecto al resto.

A la vista de los resultados obtenidos, sale a la vista que las características físico-químicas y biológicas de los extractos analizados fueron muy dependientes de los protocolos de extracción aplicados, así como de los compost de procedencia, lo que puede repercutir significativamente en el potencial carácter biofertilizante y fitoestimulante de este tipo de productos. De este modo, teniendo en cuenta los resultados globales del trabajo, se pudo intuir un vínculo importante entre los protocolos CEP1 y CEP4 y una mayor biodiversidad funcional y carácter fitoestimulante de los extractos, mientras que los protocolos CEP2 y CEP3 podrían estar más relacionados con una menor biodiversidad funcional y un carácter más neutro, o incluso fitotóxico, de los extractos.

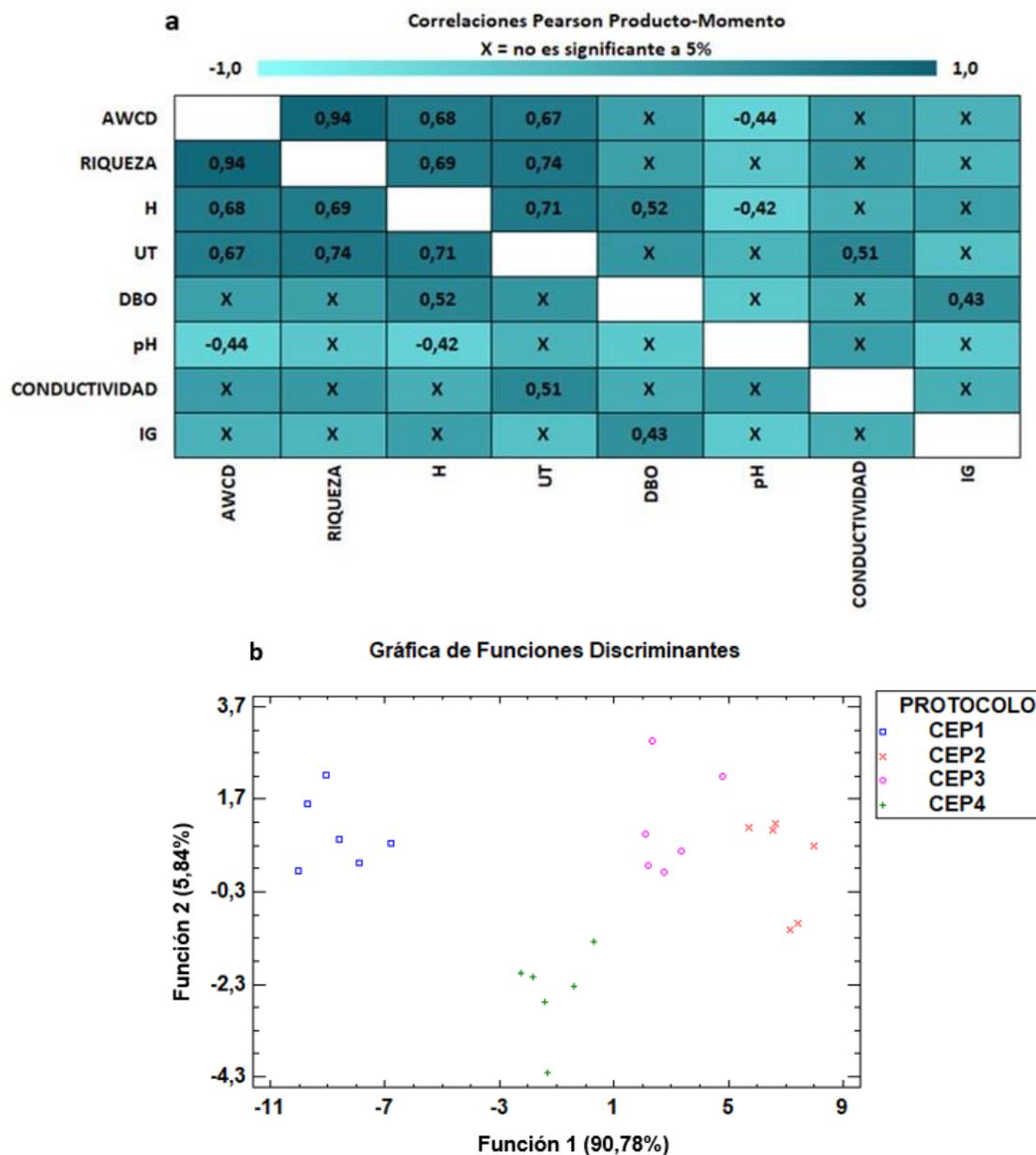


Figura 22. Análisis estadístico global de todos los parámetros objeto de estudio en el ensayo. (a) Gráfico de correlaciones de Pearson Producto-Momento al 95% de significancia y (b) Gráfica de funciones discriminantes por protocolos.

V. CONCLUSIONES

A continuación, se exponen las conclusiones derivadas del trabajo realizado:

- (i) A pesar de que los extractos de compost se obtuvieron a partir de materiales muy similares, compuestos principalmente en su origen por alpeorujo, las diferencias debidas al aporte de otros materiales en las mezclas originales, así como las condiciones operacionales practicadas en las empresas, o el estado de maduración de las muestras, podrían influir de forma significativa en las características de los extractos. Así, aquellos extractos derivados del compost ALP2 destacaron por su mayor biodiversidad funcional, aunque se mostraron más ecotóxicos que los procedentes de ALP1.
- (ii) La temperatura de extracción más agresiva descrita para el protocolo CEP3 (70 °C), se tradujo en una mayor demanda biológica de oxígeno. Sin embargo, no se estableció una clara relación entre este protocolo y el nivel de fitotoxicidad de los extractos.
- (iii) En términos generales, los protocolos de extracción CEP1 y CEP4 se relacionaron con una mayor biodiversidad funcional y capacidad fitoestimulante de los extractos, mientras que los protocolos CEP2 y CEP3 podrían estar más relacionados con una menor biodiversidad funcional y mayor fitotoxicidad, aunque en este último caso, el efecto observado fue muy dependiente de las materias primas de partida.

VI. FINANCIACIÓN

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

VII. BIBLIOGRAFÍA

- Acosta, C.A., Pasquali, C.E.L., Paniagua, G., Garcinuño, R.M., y Hernando, P.F., 2018. Evaluation of total phenol pollution in water of San Martin Canal from Santiago del Estero, Argentina. *Environmental Pollution*, 236, 265-272.
- Alcantara, J.S., Acero, J., Alcántara, J.D., y Sánchez, R.M., 2019. Principales reguladores hormonales y sus interacciones en el crecimiento vegetal. *Nova*, 17(32), 109-129.
- Alurralde, A.L., Di Barbaro, G., Imhoff, S., Gariglio, N., González-Basso, V., Rizo, M., Esperche, E., Manenti, L., y Sasovsky, R., 2019. Aplicación de té de compost de orujo de olivo sobre un suelo franco arcilloso limoso. En: Monetta, P., Paroldi, H.E., y Miguel, R.E., (Eds.), *II Simposio de Residuos Agropecuarios y Agroindustriales del NOA y Cuyo: trabajos completos y comunicaciones*, (1ªEd, pp. 28-31). Ediciones INTA, Buenos Aires, Argentina.

- Aznar-Sánchez, J.A., Velasco-Muñoz, J.F., García-Arca, D., y López-Felices, B., 2020. Identification of Opportunities for Applying the Circular Economy to Intensive Agriculture in Almería (South-East Spain). *Agronomy*, 10(10), 1499.
- Bernal, M.P., Sommer, S.G., Chadwick, D., Qing, C., Guoxue, L., y Michel Jr, F.C., 2017. Current approaches and future trends in compost quality criteria for agronomic, environmental, and human health benefits. *Advances in Agronomy*, 144, 143-233.
- Bernal-Vicente, A., Ros, M., Tittarelli, F., Intrigliolo, F., y Pascual, J.A., 2008. Citrus compost and its water extract for cultivation of melon plants in greenhouse nurseries. Evaluation of nutriactive and biocontrol effects. *Bioresource Technology*, 99(18), 8722-8728.
- Bláha, L., Hilscherová, K., Čáp, T., Klánová, J., Machát, J., Zeman, J., y Holoubek, I., 2010. Kinetic bacterial bioluminescence assay for contact sediment toxicity testing: relationships with the matrix composition and contamination. *Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal*, 29(3), 507-514.
- Boquete, E.J., 2021. Evaluación de la fitotoxicidad de distintas concentraciones de té de vermicompost elaborado en base a residuos vegetales en un ámbito urbano. [Trabajo Fin de Grado, Universidad de Buenos Aires]. Repositorio Institucional – Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires, Argentina.
- Calvo, A., 2013. Gestión integral de residuos de almazara mediante combinación de procesos físico-químicos [Tesis de Doctorado, Universidad de Valladolid]. Repositorio Institucional - Universidad de Valladolid, Valladolid, España.
- Castañeda, D. J., y Celis, S.I., 2018. Evaluación de la toxicidad con bacterias *Vibrio Fischeri* en suelos y agua procedentes de cultivos de café y maíz contaminados con Glifosato y Paraquat. [Trabajo Fin de Grado, Universidad de la Salle]. Repositorio Institucional – Universidad de la Salle, Bogotá, Colombia.
- Castillo, G., Gregorí, B.S., Michelena, G., Díaz de Villegas, M.E., Delgado, G., Montano, R., Cejas, G., y Gálvez, L.O., 2007. Bioproductos para la agricultura: surgimiento y desarrollo en el ICIDCA. ICIDCA. Sobre los Derivados de la Caña de Azúcar, 41(3), 42-51.
- Castillo, F., (2021). El mercado de los bioproductos. Tecnologías aplicadas para la producción sostenible de alimentos. Fundación Cajamar. URL: <https://www.plataformatierra.es/innovacion/observatorio-tecnologico-bioproductos-2021-06/>.(Consultado 24/04/2022).
- Christodoulou, E., Agapiou, A., Anastopoulos, I., Omirou, M., y Ioannides, I.M. 2019. The effects of different soil nutrient management schemes in nitrogen cycling. *Journal of Environmental Management*, 243, 168-176.

- Cortés, M., 2021. Consumo de Aove en Andalucía mediante un modelo econométrico. [Trabajo Fin de Grado, Universidad de Jaen]. Repositorio Institucional – Universidad de la Jaén, Jaén, España.
- Dearborn, Y., 2011. Compost Tea: Literature review on production, application and plant disease management. San Francisco Department of Environment Toxic Reduction Program: IPM Task Order, 3-18.
- Diáñez, F., Santos, M., Marín, F., Camacho, F, y Tello, J.C., 2011. Té de compost en el control de patógenos. Phytoma España: La revista profesional de sanidad vegetal, 225, 40-46.
- Díaz, I., 2021. Obtención de compost fitoestimulante y biopesticida mediante la adición de microorganismos. [Trabajo Fin de Grado, Universidad de Almería]. Repositorio Institucional - Universidad de Almería, Almería, España.
- Durán, E., Gámiz, L., Cox, L., Cornejo, J., y Hermosín, M.C., 2017. Ensayos con biocarbones procedentes de residuos de almazara y orujera para la eliminación de contaminantes en aguas. En: López, R., y Cabrera, F. (Eds), Reciclando los residuos para mejorar los suelos y el medioambiente. (1ªEd, pp. 287-291) Red Española de Compostaje.
- Edenborn, S.L., Johnson, L.M.K., Edenborn, H.M., Albarran-Jack, M.R., y Demetron, L.D., 2018. Amendment of a hardwood biochar with compost tea: effects on plant growth, insect damage and the functional diversity of soil microbial communities. Biological Agriculture & Horticulture, 34(2), 88-106.
- EN 12920:2006 + A1:2008, “Characterization of waste – Methodology for the determination of the leaching behaviour of waste under specified conditions”.
- Espinosa-Antón, A.A., Hernández-Herrera, R.M., y González, M., 2021. Potencial de las macroalgas marinas como bioestimulantes en la producción agrícola de Cuba. Centro Agrícola, 48(3), 81-92.
- European Environment Agency (EEA)., 2012. Fertilizer consumption in 1997/1999 and projections for 2030. URL: <https://www.eea.europa.eu/data-and-maps/figures/fertiliser-consumption-in-1997-1999-and-projections-for-2030> (Consultado 11/04/2022).
- Ezzariai, A., Hafidi, M., Khadra, A., Aemig, Q., El Fels, L., Barret, M., Merlina, G., Patureau, D., y Pinelli, E., 2018. Human and veterinary antibiotics during composting of sludge or manure: Global perspectives on persistence, degradation, and resistance genes. Journal of Hazardous Materials, 359, 465-481.

- Feigl, V., Ujaczki, É., Vaszita, E., y Molnár, M., 2017. Influence of red mud on soil microbial communities: Application and comprehensive evaluation of the Biolog EcoPlate approach as a tool in soil microbiological studies. *Science of the Total Environment*, 595, 903-911.
- Florez-Jalixto, M., Roldán-Acero, D., Omote-Sibina, J.R., y Molleda-Ordoñez, A., 2021. Biofertilizers and biostimulants for agricultural and aquaculture use: Bioprocesses applied to organic by-products of the fishing industry. *Scientia Agropecuaria*, 12(4), 635-651.
- Grageda-Cabrera, O.A., Díaz-Franco, A., Peña-Cabriales, J.J., y Vera-Nuñez, J.A., 2012. Impacto de los biofertilizantes en la agricultura. *Revista mexicana de ciencias agrícolas*, 3(6), 1261-1274.
- Gueboudji, Z., Bagues, M., Kadi, K., Nagaz, K., y Addad, D., 2021. Effect of storage time on the biodegradability of olive oil mill wastewater from the cold extraction of olive oil system. *The EuroBiotech Journal*, 5(3), 142-154.
- Guzmán, M., y Quintero, M.F., 2021. El reto de la horticultura moderna en la calidad de vida. En: Fischer, G., Miranda, D., Magnitskiy, S., Balaguera-López, H.E., y Molano, Z., (Eds.), *Avances de la horticultura*, (1ªEd, pp. 40-61). Sociedad Colombiana en Ciencias Hortícolas, Bogotá, Colombia.
- IOC (International Olive Council), 2021. World Olive Oil Table. URL: <https://www.internationaloliveoil.org/the-world-of-olive-oil/?lang=es> (Consultado 22/05/2022)
- ISO, D. 11348-3 (2007) Water quality—determination of the inhibitory effect of water samples on the light emission of *Vibrio fischeri* (Luminescent bacteria test)—part 3: method using freeze-dried bacteria. International Organization for Standardization.
- Jarque, S., Masner, P., Klánová, J., Prokeš, R., y Bláha, L., 2016. Bioluminescent *Vibrio fischeri* assays in the assessment of seasonal and spatial patterns in toxicity of contaminated river sediments. *Frontiers in Microbiology*, 7, 1738.
- Jurado, M., 2015. Empleo de inoculantes microbianos en el proceso de compostaje de restos vegetales [Tesis de Doctorado, Universidad de Almería]. Repositorio Institucional - Universidad de Almería, Almería, España.
- Kiss, G., Gango, M., Horváth, E., Eck-Varanka, B., Labancz, K., y Kováts, N., 2021. Assessment of ecotoxicity of atmospheric humic-like substances using the *Vibrio fischeri* bioluminescence inhibition bioassay. *Atmospheric Environment*, 261, 118561.

- Koné, S.B., Dionne, A., Tweddell, R.J., Antoun, H., y Avis, T.J., 2010. Suppressive effect of non-aerated compost teas on foliar fungal pathogens of tomato. *Biological Control*, 52(2), 167-173.
- Lappalainen, J., Juvonen, R., Nurmi, J., y Karp, M., 2001. Automated color correction method for *Vibrio fischeri* toxicity test. Comparison of standard and kinetic assays. *Chemosphere*, 45, 635–641.
- Lappalainen, J., Juvonen, R., Vaajasaari, K., y Karp, M., 1999. A new flash method for measuring the toxicity of solid and colored samples. *Chemosphere*, 38, 1069–1083.
- Ley 22/2011, de 28 de julio, de residuos y suelos contaminados. (2011). Boletín Oficial del Estado. <https://www.boe.es/eli/es/l/2011/07/28/22/con> (Consultado 28/04/2022).
- López, M.J., Suárez-Estrella, F., Moreno, J., 2018. Los microorganismos como elementos clave de la bioeconomía. *Mediterráneo Económico*, 31, 291-307.
- López-Padrón, I., Martínez-González, L., Pérez-Domínguez, G., Reyes-Guerrero, Y., Núñez-Vázquez, M., y Cabrera-Rodríguez, J.A., 2020. Las algas y sus usos en la agricultura. Una visión actualizada. *Cultivos Tropicales*, 41(2).
- Mac Donnell, M.T., 2018. Producción, aplicación y beneficios de los extractos acuosos del compostaje ("té de compost") [Trabajo fin de grado - Universidad Nacional del Litoral]. Repositorio Institucional - Universidad Nacional del Litoral, Santa Fe, Argentina.
- Markets and markets. 2022. Biofertilizer Market: Global Industry Trends, Share, Size, Growth, Opportunity and Forecast 2022-2027. URL: <https://www.marketresearch.com/> (Consultado 11/04/2022).
- Martin, C.S., 2015. Enhancing soil suppressiveness using compost and compost tea. En: Meghvansi, M.K., y Varma, A., (Eds.), *Organic Amendments and Soil Suppressiveness in Plant Disease Management* (Vol. 46, pp. 25-49). Springer, Dordrecht, Países Bajos.
- Martínez-Gallardo, M.R., 2021. Estudio y manejo de comunidades microbianas de lodos de alpechín en balsas de evaporación para su biorremediación y aprovechamiento [Tesis de Doctorado, Universidad de Almería]. Repositorio Institucional - Universidad de Almería, Almería, España.
- Martínez-Gallardo, M.R., López, M.J., Jurado, M.M., Suárez-Estrella, F., López-González, J.A., Sáez, J.A., Sáez, J.A., Moral, R., y 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.

- Martínez-Gallardo, M.R., López, M.J., López-González, J.A., Jurado, M.M., Suárez-Estrella, F., Pérez-Murcia, M.D., Sáez, J.A., Moral, R., y Moreno, J., 2021. Microbial communities of the olive mill wastewater sludge stored in evaporation ponds: The resource for sustainable bioremediation. *Journal of Environmental Management*, 279, 111810.
- Mascañero Varas, M y de Bustos, M.E., 2019. Fitotoxicidad en *Lactuca sativa* L. por aplicación de extractos acuosos de compost a base de alperujo. En: Monetta, P., Paroldi, H.E., y Miguel, R.E., (Eds.), II Simposio de Residuos Agropecuarios y Agroindustriales del NOA y Cuyo: trabajos completos y comunicaciones, (1ªEd, pp. 136-139). Ediciones INTA, Buenos Aires, Argentina.
- Mejía, P.A., 2017. Efecto de la aplicación de té de vermicompost y microorganismos promotores del crecimiento de plantas (PGPMs) en la composición y funcionalidad de la microbiota rizosférica de cultivo orgánico de melón. [Trabajo Fin de Máster, Universidad de Almería]. Repositorio Institucional - Universidad de Almería, Almería, España.
- Mengesha, W.K., Powell, S.M., Evans, K.J., y Barry, K.M., 2017. Diverse microbial communities in non-aerated compost teas suppress bacterial wilt. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 33(3), 1-14.
- Milinković, M., Lalević, B., Jovičić-Petrović, J., Golubović-Ćurguz, V., Kljujev, I., y Raičević, V., 2019. Biopotential of compost and compost products derived from horticultural waste—effect on plant growth and plant pathogens' suppression. *Process Safety and Environmental Protection*, 121, 299-306.
- Moreno, J., Mormeneo, S., 2008. Microbiología y bioquímica del proceso de compostaje. En: Moreno J., Moral R., (Eds.), *Compostaje*, (1ªEd, pp. 111-141). Mundi-Prensa. Madrid, España.
- Oka, Y., y Yermiyahu, U., 2002. Suppressive effects of composts against the root-knot nematode *Meloidogyne javanica* on tomato. *Nematology*, 4(8), 891-898.
- Palese, A.M., Pane, C., Villecco, D., Zaccardelli, M., Altieri, G., y Celano, G., 2021. Effects of Organic Additives on Chemical, Microbiological and Plant Pathogen Suppressive Properties of Aerated Municipal Waste Compost Teas. *Applied Sciences*, 11(16), 7402.
- Paroldi, H.E., Medina, E.M., Rodriguez, LA., y Monetta, P., 2019. Variación de las comunidades microbianas en función de las diferentes fases térmicas en el proceso de compostaje del alperujo. En: Monetta, P., Paroldi, H.E., y Miguel, R.E., (Eds.), II Simposio de Residuos Agropecuarios y Agroindustriales del NOA y Cuyo: trabajos completos y comunicaciones, (1ªEd, pp. 314-315). Ediciones INTA, Buenos Aires, Argentina.

- Persone, G., Marsalek, B., Blinova, I., Törökne, A., Zarina, D., Manusadzianas, Nalecz-Jawecki, G., Tofan, L., Stepanova, N., Tothova, L., y Kolar, B., 2003. A practical and user-friendly toxicity classification system with microbiotests for natural waters and wastewaters. *Environmental Toxicology*, 18, 395-402.
- Real Decreto 999/2017, de 24 de noviembre, por el que se modifica el Real Decreto 506/2013, de 28 de junio, sobre productos fertilizantes, 2017. Boletín oficial del Estado. <https://www.boe.es/eli/es/rd/2017/11/24/999> (Consultado 23/05/2022).
- Roig, A., Cayuela, M.L., Sánchez-Monedero, M.A., 2006. An overview on olive mill wastes and their valorisation methods. *Waste Management*, 26(9), 960-969.
- Sánchez San Fulgencio, N., Suárez-Estrella, F., López, M.J., Jurado, M.M., López-González, J.A., y Moreno, J., 2018. Biotic aspects involved in the control of damping-off producing agents: the role of the thermotolerant microbiota isolated from composting of plant waste. *Biological Control*, 124, 82-91.
- Sayadi-Gmada, S., Rodríguez-Pleguezuelo, C.R., Rojas-Serrano, F., Parra-López, C., Parra-Gómez, S., García-García, M.D.C., García-Collado, R., Lorbach-Kelle, M.B., y Manrique-Gordillo, T., 2019. Inorganic waste management in greenhouse agriculture in Almeria (SE Spain): Towards a circular system in intensive horticultural production. *Sustainability*, 11(14), 3782.
- Seghetta, M., Hou, X., Bastianoni, S., Bjerre, A.B., y Thomsen, M., 2016. Life cycle assessment of macroalgal biorefinery for the production of ethanol, proteins and fertilizers – A step towards a regenerative bioeconomy. *Journal of Cleaner Production*, 137, 1158-1169
- Shekhar, H.S., Fleming, C., Selby, C., Rao, J.R., y Martin, T., 2014. Plant biostimulants: a review on the processing of macroalgae and use of extracts for crop management to reduce abiotic and biotic stresses. *Journal of Applied Phycology*, 26(1), 465-490.
- Soria, M.D.J., Ferrera-Cerrato, R., Etchevers, J., Alcántar, G., Trinidad, J., Borges, L., y Pereyda, G., 2001. Producción de biofertilizantes mediante biodigestión de excreta líquida de cerdo. *Terra Latinoamericana*, 19(4), 353-362.
- Soto-Jimenez, M.F., Ochoa-Izaguirre, M.J., y Bojorquez-Mascareño, E.I., 2019. Beneficios de los florecimientos macroalgales para la producción de biofertilizantes. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 10(8), 1863-1874.
- Sprague, J.B., y Ramsay, B.A., 1965. Lethal levels of mixed copper–zinc solutions for juvenile salmon. *Journal of the Fisheries Research Board of Canada*, 22(2), 425-432.

- Suárez-Estrella, F., y Moreno, J., 2012. Los microorganismos al servicio de la agricultura: agentes microbianos de control biológico (AMCB). Cuadernos de Estudios Agroalimentarios (CEA), 1, 73-88.
- Tello, P., 2022. Análisis comparativo del ciclo de vida en la producción de aceite de oliva en olivar tradicional y superintensivo. [Trabajo Fin de Máster, Universidad de Sevilla]. Repositorio Institucional – Universidad de Sevilla, Sevilla, España.
- Tortosa, G., Alburquerque, J.A., Ait-Baddi, G., Cegarra, J., 2012. The production of commercial organic amendments and fertilisers by composting of two-phase olive mill waste (“alperujo”). *Journal of Cleaner Production*, 26, 48-55.
- Tortosa, G., Alburquerque, J.A., Bedmar, E.J., Ait-Baddi, G., y Cegarra, J., 2014. Strategies to produce commercial liquid organic fertilisers from “alperujo” composts. *Journal of Cleaner Production*, 82, 37-44.
- Tortosa, G., 2011. Elaboración a escala preindustrial de enmiendas y abonos orgánicos sólidos y líquidos mediante co-compostaje de orujo de oliva de dos fases o “alperujo” [Tesis de Doctorado, Universidad de Murcia]. Repositorio Institucional - Universidad de Murcia, Murcia, España.
- Vargas-García, M.C., Suárez-Estrella, F., López, M.J., y Moreno, J., 2010. Microbial population dynamics and enzyme activities in composting processes with different starting materials. *Waste Management*, 30(5), 771-778.
- Vázquez, M.A., y Soto, M., 2011. El ensayo de DBO como indicador de la estabilidad del compost. En: López, J.I., Rad, C., y Navarro, M. (Eds.), *Compostaje de residuos orgánicos y seguridad medioambiental* (1ªEd, pp. 457-467). Servicio de Publicaciones e Imagen Institucional – Universidad de Burgos, Burgos, España.
- Velasco-Muñoz, J.F., Mendoza, J.M.F., Aznar-Sánchez, J.A., y Gallego-Schmid, A., 2021. Circular economy implementation in the agricultural sector: Definition, strategies and indicators. *Resources, Conservation and Recycling*, 170, 105618.
- Verrillo, M., Salzano, M., Cozzolino, V., Spaccini, R., Y Piccolo, A., 2021. Bioactivity and antimicrobial properties of chemically characterized compost teas from different green composts. *Waste Management*, 120, 98-107.
- Vessey, J.K., 2003. Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. *Plant and Soil*, 255(2), 571-586.
- Villarán, M. C., Chávarri, M., Dietrich, T., y Rodríguez, E., 2018. Subproductos hortofrutícolas para una bioeconomía circular. *Mediterráneo Económico*, 31, 251-272.

- Vijay, R., Wood, E.E., y Llewellyn, C.A., 2021. Algae biostimulants: A critical look at microalgal biostimulants for sustainable agricultural practices. *Biotechnology Advances*, 49, 107754.
- Young, B.J., Riera, N.I., Beily, M.E., Bres, P.A., Crespo, D.C., y Ronco, A.E., 2012. Toxicity of the effluent from an anaerobic bioreactor treating cereal residues on *Lactuca sativa*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 76, 182-186.
- Zucconi, F., Forte, M., Monaco, A. y de Bertoldi, M., 1981a. Biological evaluation of compost maturity. *BioCycle*, 22, 27-29.
- Zucconi, F., Monaco, A. y Forte, M., 1985. Phytotoxins during the stabilization of organic matter. En: Gasser, J.K.R. (Eds.), *Composting of Agricultural and other Wastes*. Elsevier Applied Science. (pp. 73-85). London, UK.
- Zucconi, F., Pera, A., Forte, M. y De Bertoldi, M., 1981b. Evaluating toxicity of immature compost. *Biocycle*, 22, 54-57.