



Cuantificación de grupos microbianos implicados en la capacidad biofertilizante del compost de origen industrial: estudio comparativo

**UNIVERSIDAD DE ALMERÍA
FACULTAD DE CIENCIAS
EXPERIMENTALES**

Grado en Biotecnología

TRABAJO FIN DE GRADO

Curso académico: 2020-2021

Autora: Patricia Sánchez Aranda

Director: Juan Antonio López González

Codirector: María José López López

Departamento de Biología y Geología

Área de Microbiología

Agradecimientos

Me gustaría hacer una mención especial a Joaquín Moreno Casco. Gracias a él descubrí lo bonita que es la Microbiología. Aunque ya no estes con nosotros, nunca me olvidaré de ti. Por tu pasión, tu dedicación, por todas las lecciones de vida que me enseñaste y porque puedo asegurar que para todos has sido como un padre, infinitas gracias.

En segundo lugar, agradecer a mi codirectora, María José López López, por haberme dado también esta oportunidad. Agradezco enormemente todas sus recomendaciones, su simpatía y cómo me ha guiado no solo a la hora de realizar este trabajo, sino también en el ámbito personal.

No puedo dejar de mencionar a mi tutor, Juan Antonio López González, por haberme dado la oportunidad de realizar este trabajo. En las circunstancias actuales en las que nos encontramos, para mí ha sido un privilegio poder realizar el trabajo fin de grado en relación con la parte de la Biotecnología con la que me siento más identificada. Gracias por toda la ayuda y consejos que me has brindado, siempre con una sonrisa y haciendome sentir que se puede con todo. También me gustaría agradecerle su labor como profesor durante estos años. Desde la primera clase en la que me daba miedo encender el mechero hasta la última me he sentido totalmente confiada y a gusto por tu increíble labor docente y tu gran alegría. Por todo esto, siempre me acordaré de ti.

En cuarto lugar, quiero dar las gracias a María José Estrella González por toda la ayuda y consejos que me ha aportado durante estos meses. Ha sido un placer poder compartir esta experiencia contigo en la que me has hecho sentirme completamente apoyada desde el primer momento.

Junto a ellos, no puedo olvidarme de mi fiel compañero David Ferrer Zamora. Hemos sido un equipo durante toda esta experiencia, apoyándonos codo con codo en todos los problemas que nos han surgido. Sin duda, puedo asegurar que me llevo un muy buen amigo.

También me gustaría agradecer al resto de compañeros de laboratorio, tanto profesores como compañeros, por hacerme sentir como en casa a pesar de mi timidez. Gracias por los buenos ratos que hemos tenido y aportarme esos ratitos de felicidad necesarios en estos tiempos tan difíciles. Sois unas personas maravillosas.

Durante estos años de carrera ha habido personas muy importantes para mí, las cuales me han hecho convertirme en la persona que soy ahora.

De todas ellas, una de ellas se merece una mención especial. Macarena, gracias por compartir conmigo estos cuatro años. Contigo la vida tiene otro color. Gracias por cuidarme, estar conmigo en todos los momentos y haber sido como mi hermana.

Patricia, Corina, María y Aitana, agradeceros los momentos de risas, los recuerdos inolvidables y la enorme confianza que me habéis transmitido. Desde luego, puedo considerados unas grandes amigas.

A Elena, por haber sido la mejor persona que la carrera me ha podido dar y a Félix por contagiarme su alegría. A pesar de que solo pudimos compartir un año juntos, sabéis que siempre os

llevo en mi corazón, y que tanto Granada como Almería serán nuestro punto de reencuentro durante muchos años.

Por supuesto, agradecer a las que siempre han estado conmigo. A mis amigas de toda la vida, gracias por apoyarme siempre. Aunque las circunstancias de la vida hacen que solo podamos vernos un par de veces al año, sabéis que sois muy importantes para mí. Nos veremos pronto.

Para terminar, no puedo olvidarme de mi pilar fundamental: mi familia. Gracias papá y mamá por haber hecho todo lo posible para que lograra mis sueños y por los valores que me habéis transmitido. Estoy muy orgullosa de vosotros, y sé que vosotros de mí también. A mi hermana, Laura, porque somos un equipo imparable y por aportarme esa pizca de felicidad tan necesaria día a día. Por último, no puedo olvidarme de la que ha sido mi segunda madre durante estos últimos años. Abuela, gracias por cuidarme cuando más lo necesitaba.

De todo corazón, gracias.

Índice	
Resumen	5
Abstract	6
1. Introducción	7
1.1. El compostaje	7
a. Fases del compostaje	7
b. El compost maduro	9
c. Importancia del compost en suelos y agricultura.	10
1.2. Biofertilizantes	11
a. Microorganismos con capacidad biofertilizante en el compost	12
1.3. Estudios de la capacidad biofertilizante del compost	15
2. Objetivos	16
3. Materiales y métodos	16
3.1. Muestras de compost	16
3.2. Medios de cultivo	17
3.3. Diseño experimental: protocolo de cuantificación	25
a. Diseño experimental	25
b. Preparación y siembra de las muestras	25
c. Cuantificación de la microbiota presente en las muestras	26
d. Análisis estadístico	27
4. Resultados y discusión	28
4.1. Estudio de la microbiota mesófila y termófila presente.	28
4.2. Estudio de la presencia de microorganismos implicados en el ciclo biogeoquímico del nitrógeno.	35
4.3. Estudio de la correlación entre las diferentes variables analizadas.	44
5. Conclusiones	45
6. Bibliografía	46

Resumen

En los últimos años, el uso abusivo de fertilizantes químicos ha provocado la disminución de los niveles de materia orgánica presente en el suelo. Esto ha dado lugar a la acumulación de residuos y un empobrecimiento de los suelos, con la consiguiente pérdida del rendimiento de los cultivos. Los biofertilizantes se han impuesto como una alternativa frente a los fertilizantes químicos. Entre ellos se encuentra el compost, el cual contiene microorganismos capaces de movilizar nutrientes, producir sustancias promotoras del crecimiento y actuar frente a patógenos, todo ello siendo más respetuoso con el medio ambiente.

Por ello, este estudio se centró en evaluar la microbiota presente en diferentes sustratos, entre los que se encontraron compost procedentes de lodos de depuradora y residuos vegetales, muestras de jardinería y sustratos universales. Los microorganismos cuantificados consistieron en bacterias, actinobacterias y hongos tanto mesófilos como termófilos, microorganismos implicados en el ciclo biogeoquímico del nitrógeno y los comprometidos en la movilización de nutrientes como el fósforo, el potasio y el hierro.

Los compost analizados en el presente estudio contuvieron una microbiota rica y diversa constituida por bacterias, de las que las actinobacterias constituyen un pilar fundamental y hongos que se desarrollaron tanto en condiciones mesófilas como termófilas, debido a la alta termotolerancia del microbioma del compostaje. Los diferentes grupos de microorganismos involucrados en la asimilación de nitrógeno también se hallaron en todos los productos, existiendo diferencias significativas entre las muestras. Sin embargo, no se detectaron nitrificantes en ninguna de ellas. En cuanto a los microorganismos solubilizadores de fosfato, potasio o hierro, su presencia se vio limitada a cinco de las muestras y entre las que destacaron las muestras de jardinería y una de las compuestas por residuos vegetales. Por último, se observó correlación entre algunos de los parámetros estudiados, pudiendo relacionar ciertos grupos microbianos con las actividades biofertilizantes.

Palabras clave: compost, biofertilizante, solubilización, producto final.

Abstract

In recent years, the excessive use of chemical fertilizers has caused a decrease in the levels of organic matter in soil. This has given rise to an accumulation of waste and impoverishment of the soils, with the consequent loss of crop yields. Biofertilizers are one of the main options against chemical fertilizers. Among them is compost, which contains microorganisms capable of mobilizing nutrients, producing growth-promoting substances and facing pathogens, all of them being more respectful with the environment.

For this reason, this study was focused on evaluating the presence of microorganisms with biofertilizing abilities in different final products, among which were sewage sludge, vegetal waste, gardening sample and universal substrates. Quantified microorganisms consisted of those present in the whole process of composting (mesophilic and thermophilic bacteria, actinobacteria and fungi), those ones involved in the biogeochemical nitrogen cycle and those capable of mobilizing nutrients such as phosphorus, potassium and iron. Once the microorganisms were counted, they were represented graphically and statistically analyzed to compare all the samples studied.

Composts analyzed in the study had a diverse microbiota formed by bacteria, of which actinobacteria are a fundamental pillar and fungi, which developed in mesophilic and thermophilic conditions, due to the termotolerance of the composting microbiome. The different microorganisms associated with nitrogen assimilation were also found in all the products, with significant differences between the samples. Nevertheless, nitrifying agents were not detected in any of them. Regarding those microorganisms implicated in the solubilization of phosphate, potassium or iron, their presence was limited to five of the samples, among which both gardening samples and one of those composed of vegetal waste stood out. Finally, there was noticed a correlation between some of the parameters analyzed, being able to implicate certain microbial groups with biofertilizing activities.

Keywords: compost, biofertilizer, solubilization, final product.

1. Introducción

1.1. El compostaje

El compostaje es un proceso aeróbico basado en la descomposición y transformación de residuos sólidos orgánicos en CO₂, biomasa, energía térmica y un producto final estable y rico en compuestos húmicos llamado compost (Sánchez et al., 2017).

En términos ecológicos, la materia orgánica es transformada por la acción de diferentes microorganismos además de la interacción de diferentes factores químicos y físicos tales como la cantidad de nutrientes, humedad, aireación, pH, temperatura de incubación o relación C/N (Jurado et al., 2014b; López-González et al., 2013; Shen et al., 2021) Todos estos parámetros deben de ajustarse y mantenerse controlados para que los microorganismos se encuentren en condiciones óptimas para desarrollar sus actividades biológicas (López-González et al., 2015), obteniendo así un compost adecuado y de calidad (Bian et al., 2019; Siles-Castellano et al., 2020a).

Los residuos orgánicos susceptibles de ser biodegradados están constituidos por diferentes componentes entre los que se encuentran polímeros como la celulosa o las proteínas. Como resultado de la acción microbiana y los cambios bioquímicos que experimenta la materia orgánica se produce la transformación de dichos residuos en un material más estable conocido como fracción húmica (López-González et al., 2013; Wei, H. et al., 2018).

El compostaje es uno de los métodos más antiguos y simples de estabilización de residuos orgánicos (Álvarez-Vera et al., 2019). Supone una de las alternativas más sostenibles para el manejo de residuos orgánicos sólidos en los agroecosistemas (Jurado et al., 2014b) debido a sus ventajas ecológicas y económicas (Zhu et al., 2020). El producto final o compost es utilizado como abono apto para agricultura y/o jardinería, pudiendo ser manipulado, almacenado, transportado y aplicado al suelo sin causar efectos medioambientales (Tortarolo et al., 2008). Además, el compost puede tener otras aplicaciones como recuperación de suelos, restaurar la fertilidad, biorremediación de suelos contaminados o reducir enfermedades en plantas (Nakasaki et al., 2019).

a. Fases del compostaje

El compostaje se divide en cuatro etapas en las cuales la actividad microbiana varía en función del perfil de temperaturas a lo largo del proceso. Estas etapas son la fase mesófila, termófila, de enfriamiento y la fase de maduración (Montoya et al., 2020; Moreno et al., 2021). Las transformaciones de la materia orgánica producidas por los microorganismos se intensifican con la temperatura. Asimismo, los cambios en este parámetro son fundamentales para obtener un producto final estable (Jurado et al., 2014c). Por ello, una gran variedad de microorganismos de amplio perfil térmico se asocian al compostaje (López-González et al., 2015). La **Figura 1** ilustra las diferentes fases del compostaje, así como las actividades llevadas a cabo en cada una de ellas.

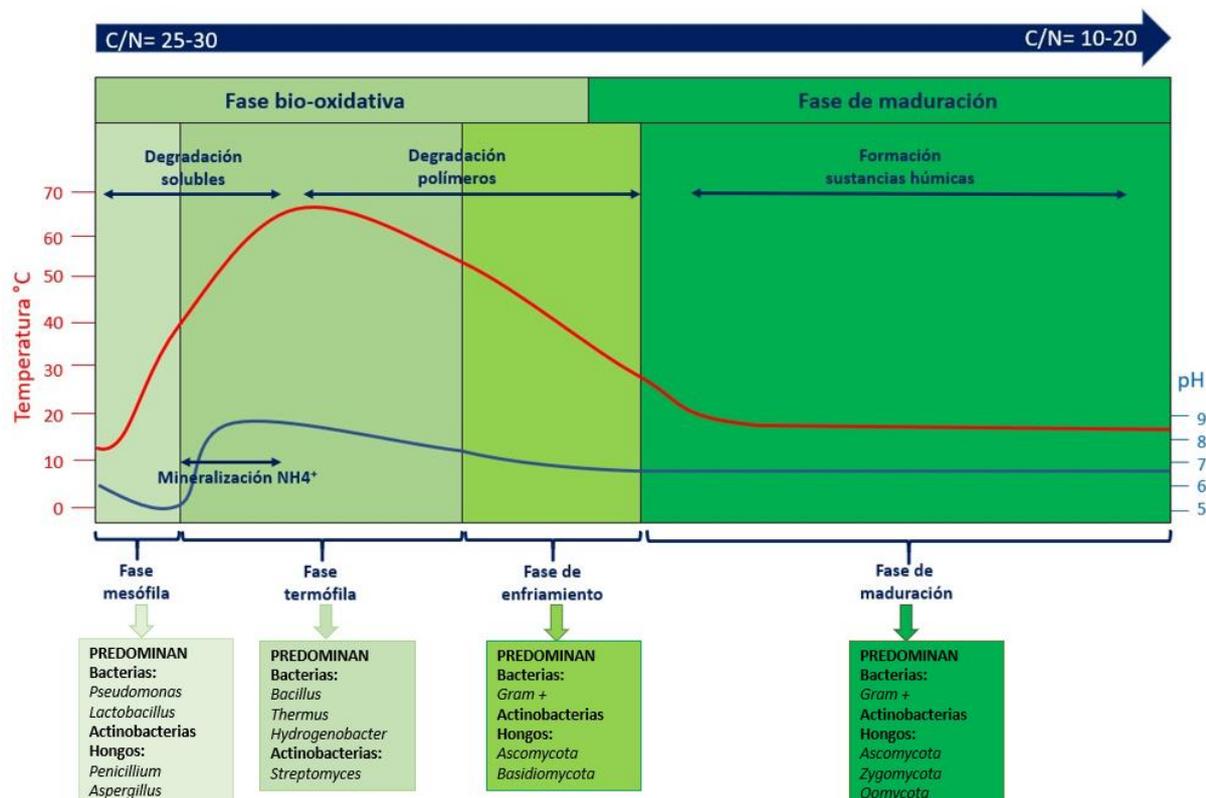


Figura 1. Esquema del proceso de compostaje. Adaptado de Moreno y Mormeneo (2011).

- **Fase mesófila:** en esta fase inicial, los residuos orgánicos se encuentran a temperatura ambiente y los microorganismos se multiplican rápidamente. En ella se degradan los compuestos más simples o los más fácilmente biodegradables. Los microorganismos presentes utilizan compuestos solubles y de fácil asimilación como azúcares, aminoácidos y lípidos presentes en la materia orgánica (Sánchez et al., 2017). Como consecuencia de esta degradación se producen ácidos orgánicos, los cuales provocan que el pH en la fase inicial del compostaje sea ligeramente ácido, con valores cercanos a 5,8 (López-González et al., 2015; Montoya et al., 2020). La relación C/N inicial óptima se encuentra entre valores de 25 y 30 (Estrella-González et al., 2020a; Voběrková et al., 2020). La temperatura en la fase mesófila aumenta rápidamente alcanzando 40 °C (Bonito et al., 2010). Dichos valores limitan la presencia a microbiota termotolerante. Entre las bacterias presentes, destacan familias como *Rhodospirillaceae*, *Bacillaceae*, *Flavobacteriaceae* y *Nocardiospiceae* (Estrella-González et al., 2020b) pero la biodiversidad es enorme, adscrita inicialmente a la microbiota indígena de los residuos de partida.

- **Fase termófila:** el aumento de la temperatura debido a las reacciones exotérmicas llevadas a cabo por el metabolismo microbiano provoca la eliminación de los microorganismos exclusivamente mesófilos por termófilos y termotolerantes (Moreno et al., 2021). Estos microorganismos presentan enzimas capaces de degradar moléculas como celulosa, hemicelulosa o proteínas, las cuales destacan por su complejidad. La descomposición de estos compuestos genera la liberación de CO₂, agua, y amonio. El grupo microbiano característico de la etapa termófila es el grupo de las actinobacterias (López-González et al., 2015; Sánchez et al., 2017), aunque las bacterias formadoras de esporas y los hongos termotolerantes están presentes en esta fase (Khalil et al., 2011). Algunas especies de actinobacterias características en el compostaje son *Streptomyces thermovulgaris*, *Actinobifida*

chromogena, *Thermoactinomyces vulgaris*, *Micromonospora carbonacea*, *Streptomyces lincolnensis*, *S.variegatus*, y *S. lusitanus* (Jurado et al., 2014c). La temperatura durante la etapa termófila puede alcanzar valores máximos superiores a 70 °C (Sánchez et al., 2017). Además, las altas temperaturas aseguran la eliminación de patógenos (López-González et al., 2013; Rastogi et al., 2020). El pH aumenta hasta valores alcalinos de 8-9 (Montoya et al., 2020) debido a la presencia de amonio provocada por la degradación de las proteínas (Jurado et al., 2014a).

- **Fase de enfriamiento:** las fuentes de energía se agotan disminuyendo la acción de los microorganismos y provocando un descenso de la temperatura. Sin embargo, en esta etapa de enfriamiento puede llevarse a cabo la degradación por parte de microorganismos termotolerantes de restos de azúcares, celulosa y hemicelulosa que no hayan sido degradados por las enzimas microbianas en las fases anteriores. La degradación de los compuestos orgánicos durante el enfriamiento se enfoca en compuestos complejos como la lignina (López- González et al., 2013). Entre los grupos microbianos presentes en esta fase destacan los hongos (Nakasaki et al., 2019) debido a la capacidad de sus esporas para resistir las altas temperaturas (Sánchez et al., 2017). Las principales familias de hongos en el compostaje son *Microascaceae*, *Trichocomaceae*, *Cladosporiaceae*, *Trichosporonaceae* y *Saccharomycetales* (Estrella-González et al., 2020b).

- **Fase de maduración:** los microorganismos mesófilos recolonizan la pila de compostaje (Rastogi et al., 2020). En esta fase se llevan a cabo reacciones de condensación y repolimerización de las sustancias húmicas (López-González et al., 2013) obtenidas a partir de los residuos de lignina y celulosa (Montoya et al., 2020). Asimismo, el proceso de nitrificación se encuentra principalmente asociado a la etapa de maduración (Jurado et al., 2015). El pH final del proceso de compostaje se sitúa en torno a 8 (Bonito et al., 2010) y la relación C/N desciende a valores entre 10 y 15 característicos de la materia orgánica estabilizada (Asadu et al., 2020).

b. El compost maduro

El proceso de compostaje concluye con la formación de un producto final, estable e higienizado conocido como compost (Insam y de Bertoldi, 2007; Jurado et al., 2015). El producto obtenido posee una serie de beneficios que mejoran la calidad y fertilidad de los suelos, afectando a factores físicos, químicos y biológicos. Sin embargo, si el estado de madurez del compost no es el adecuado, los beneficios de este producto son sustituidos por efectos perjudiciales tales como daños en las raíces, inhibición de la germinación y desarrollo inadecuado de las plantas (Rastogi et al., 2020). Es por ello que, determinar los parámetros para valorar la madurez del compost se ha convertido en un requerimiento imprescindible:

- **Relación C/N:** esta proporción ha sido comúnmente el principal parámetro utilizado para medir la estabilidad del compost (Tortarolo et al., 2008). Los niveles iniciales de carbono y nitrógeno en la materia orgánica pueden alterar la calidad del compost final. La relación C/N inicial debe de encontrarse entre valores entre 25 y 30, mientras que la relación final debe ser inferior a 15 para considerar que se ha obtenido un compost maduro (Vargas-García et al., 2006). Sin embargo, estos valores resultan relativos dependiendo de la forma en la que se encuentre el carbono. Una materia

orgánica con altos niveles de lignocelulosa implica una baja disponibilidad del elemento debido a su carácter recalcitrante.

- **Nivel de compuestos húmicos:** evaluar la fracción de lignocelulosa y la cantidad y naturaleza de sustancias húmicas es otro de los indicadores más utilizados. La lignocelulosa es el componente orgánico más adecuado para obtener una fracción húmica idónea. Por lo tanto, estudiar los niveles de este componente permite conocer la madurez del compost. La estimación de los niveles de lignocelulosa y sustancias húmicas son estudiadas mediante diferentes índices como el contenido de ácidos húmicos, el carbono total extraíble y el índice de humificación (Jurado et al., 2014a; Jurado et al., 2020; Voběrková et al., 2020).

- **Índice de nitrificación:** la fracción amonio/nitrato puede usarse como un evaluador de la madurez del compost. En las fases finales del compostaje, este indicador debe presentar valores mínimos, signo de que se ha llevado a cabo el proceso de nitrificación típico de la etapa de maduración. Comúnmente, se utilizan los siguientes valores de la relación $\text{NH}_4^+/\text{NO}_3^-$ para evaluar la calidad del compost: completamente maduro (< 0.5), maduro (entre 0,5 y 3) e inmaduro (> 3) (Awasthi et al., 2020; Siles-Castellano et al., 2020b).

Diferentes estudios (Estrella-González et al., 2019; Geethamani et al., 2020; Jiang et al., 2019; Melis y Castaldi, 2004) han propuesto otros parámetros como indicadores de la madurez del compost. Entre ellos pueden destacar el intercambio catiónico, el índice de germinación, la humedad, evaluar el perfil de temperatura a lo largo del proceso de compostaje, la velocidad de consumo de oxígeno, la actividad enzimática y las fuentes de carbono disponibles (Jurado et al., 2014a).

De acuerdo con los indicadores mencionados y en el caso de la normativa española, según el BOE A-2017-14332 un compost se considera maduro si contiene un mínimo de materia orgánica del 35-40%, un valor de humedad no superior al 40% y una relación C/N menor de 15-20.

c. Importancia del compost en suelos y agricultura.

La fertilidad de los sistemas agrícolas depende, en gran medida, de la materia orgánica presente en el suelo. En las últimas décadas, la agricultura intensiva y el uso indiscriminado de fertilizantes de origen químico ha dado lugar a la reducción de los niveles de materia orgánica, provocando el empobrecimiento de los suelos y la acumulación de residuos (Sánchez et al., 2017). Por estos motivos, existe una necesidad de encontrar alternativas respetuosas con el medio ambiente para el tratamiento de residuos y mejorar las características físicas, químicas y microbiológicas del suelo (Jurado et al., 2014a; Shen et al., 2021).

El compost ha sido empleado tradicionalmente para cumplir todos los requisitos mencionados anteriormente, resultando interesante por su bajo impacto ambiental y bajo coste (Montoya et al., 2020). Igualmente, se enmarca en el modelo de economía circular, el cual consiste en aprovechar los recursos lo máximo posible y disminuir la generación de residuos (van Ewijk y Stegemann, 2020). Este producto puede suponer una alternativa frente a los fertilizantes químicos (Vargas-García et al., 2006) mejorando en el suelo características físicas como la porosidad, químicas como el intercambio

catiónico y biológicas como favorecer el crecimiento de una mayor biodiversidad microbiana (Anli et al., 2020; Sánchez et al., 2017). De esta manera, el uso del compost aumenta la disponibilidad de nutrientes como carbono, nitrógeno y fósforo, la retención de agua y la resistencia de las plantas frente a situaciones de estrés (Nakasaki et al., 2019). Todas estas características que ofrecen al compost un alto valor como biofertilizante se deben a la presencia de microorganismos capaces de solubilizar nutrientes, producir antibióticos u otras sustancias que estimulan el crecimiento y la resistencia de las plantas frente a situaciones adversas (Jiang et al., 2019; Jurado et al., 2019; Sánchez-San Fulgencio et al., 2018).

1.2. Biofertilizantes

Los biofertilizantes son productos que contienen microorganismos capaces de movilizar nutrientes a través de transformaciones biológicas. Entre sus cualidades se encuentra la capacidad de mejorar la fertilidad del suelo y los cultivos mediante actividades como la fijación de nitrógeno atmosférico, la solubilización de fosfato o produciendo sustancias promotoras del crecimiento como fitohormonas y vitaminas (Bahadur et al., 2014; Wu et al., 2005). Algunos estudios (Anli et al., 2020; Duo et al., 2018; Sandhya et al., 2010) indican que estos productos tienen la capacidad de mejorar la actividad fotosintética, la conductancia estomática y mitigar los problemas derivados del estrés por la sequía. Desde un punto de vista ambiental, son más respetuosos con el medio ambiente, por lo que se plantean como los sustitutos de los fertilizantes químicos (Asadu et al., 2020). En la **Figura 2** se pueden observar algunos de los beneficios de los biofertilizantes.

Los principales productos y microorganismos clasificados como biofertilizantes son el compost, las bacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPRs) y los hongos micorrícicos arbusculares. La incorporación de estos productos en suelos y cultivos da lugar a una mayor retención de agua y absorción de nutrientes, ya sea por las hifas de los hongos o por la movilización favorecida por el compost y los PGPRs (Anli et al., 2020).

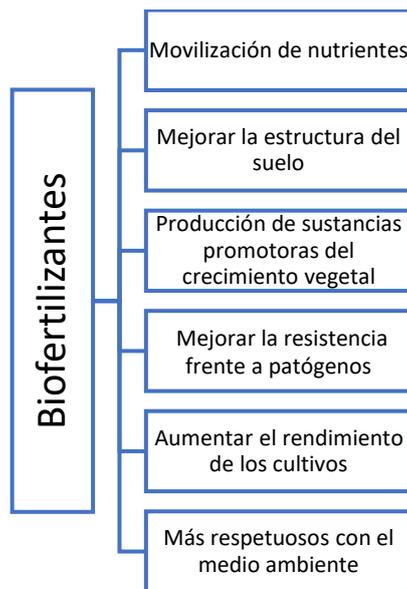


Figura 1. Ventajas de la aplicación de biofertilizantes.

a. Microorganismos con capacidad biofertilizante en el compost

El compost es un producto con capacidad biofertilizante debido a la gran cantidad de microorganismos funcionales que posee. Estos microorganismos presentes en el compost son fundamentales para la transformación y movilización de nutrientes en el suelo (Sánchez et al., 2017).

A lo largo del proceso de compostaje participan diferentes grupos microbianos con diferentes actividades metabólicas a través de la producción de exoenzimas microbianas excretadas en los sustratos en los que se encuentran. Las celulasas, β -glucosidasas y amilasas están implicadas en la mineralización de compuestos carbonados; las proteasas, en el ciclo del nitrógeno; y las fosfatasa, en la solubilización de fósforo (Jurado et al., 2014a; Voběrková et al., 2020). Todas estas actividades son llevadas a cabo por bacterias, hongos y actinobacterias. Igualmente, estos grupos microbianos resultan de interés porque, incluso algunos de ellos, producen antibióticos que protegen a los cultivos frente a patógenos y fitohormonas que promueven el crecimiento vegetal (Shen et al., 2021).

i. Disponibilidad de nitrógeno

El nitrógeno es necesario para la síntesis de ácidos nucleicos, aminoácidos, amidas, proteínas, nucleótidos, coenzimas, etcétera. A pesar de la importancia de este elemento, los organismos eucariotas presentan limitaciones a la hora de asimilarlo y dependen de la acción de los microorganismos para obtenerlo. La cantidad de nitrógeno en el suelo es escasa ya que se encuentra principalmente en la atmósfera siendo el elemento mayoritario de esta (79%) y no es asimilable. Solo los microorganismos fijadores de nitrógeno son capaces de introducirlo en el sistema. Las plantas absorben el nitrógeno en formas inorgánicas, principalmente como amonio o formas nítricas. Muchos microorganismos que transforman el nitrógeno durante el compostaje son bacterias fijadoras de nitrógeno, nitrificantes y amonificantes (Sánchez et al., 2017). La **Figura 3** ilustra el ciclo del nitrógeno.

- **Fijación de nitrógeno ($N_2 + 8H^+ + 8e^- \rightarrow 2NH_3 + H_2$):** aunque solo se necesitan seis electrones para reducir el nitrógeno atmosférico, en el proceso se consumen en realidad ocho electrones, de los que dos se pierden como H_2 (actividad hidrogenasa), por cada mol de N_2 reducido. Los microorganismos implicados en este proceso son filogenéticamente, en su gran mayoría, alfa-, beta- o gammaproteobacterias, y pueden ser tanto de vida libre aerobias (como *Azotobacter*) o anaerobias estrictas (como *Clostridium*) o incluso procariotas simbioses como *Rhizobium* o *Frankia*. El nitrógeno fijado, en su mayoría, se recicla en formas de amoníaco o nitrato (Martínez-Espinosa, 2020), por tanto, la fijación de nitrógeno biológica en determinados ambientes naturales como en algunos cultivos, se hace realmente ventajosa.

- **Amonificación:** en las primeras fases del compost las proteínas son hidrolizadas por enzimas proteolíticas dando lugar a aminoácidos. Mediante el proceso aeróbico de la amonificación, los aminoácidos son transformados en amonio. Este compuesto puede ser asimilado por las plantas o usado por las bacterias oxidantes de amonio, llevándose a cabo el proceso de nitrificación (Jurado et al., 2015).

- **Nitrificación:** la nitrificación es un proceso bio-oxidativo secuencial. En un primer paso, el amoniaco es convertido en nitrito por las bacterias oxidantes de amonio. En segundo lugar, las bacterias oxidantes de nitrito completan el proceso de nitrificación transformando el nitrito a nitrato, el cual es considerado como uno de los productos estabilizados del compost (Jurado et al., 2014c; Sánchez et al., 2017). A pesar de ser un compuesto utilizado por las plantas para asimilar nitrógeno, es susceptible de perderse por lixiviación.

- **Desnitrificación:** este proceso permite cerrar el ciclo del nitrógeno, ya que devuelve este elemento a la atmósfera. Los nitratos y nitritos son reducidos a óxido nitroso y nitrógeno atmosférico por el proceso conocido como reducción desasimilatoria de nitrato, el cual ocurre en condiciones limitantes de oxígeno (Enwall et al., 2005). Desde un punto de vista agrológico, supone la pérdida de nitrógeno disponible para los cultivos.

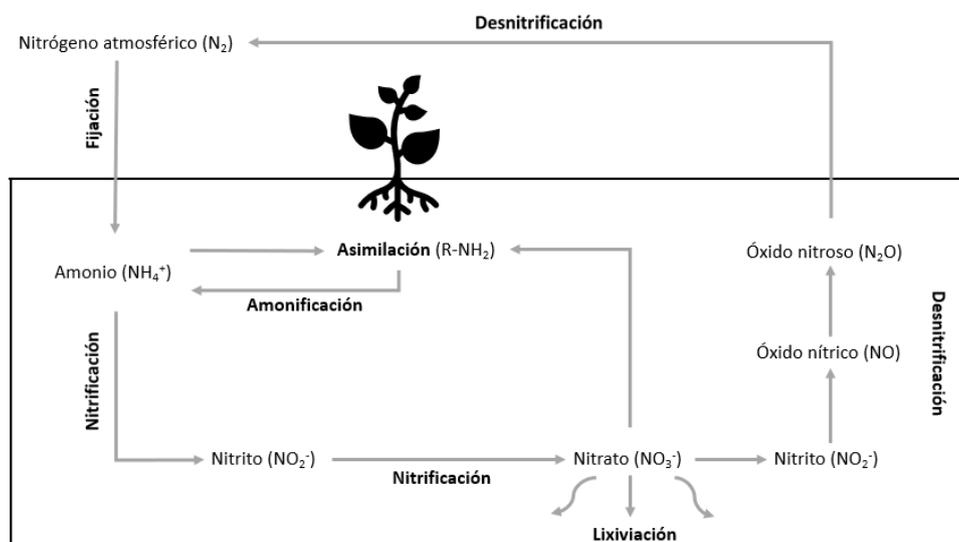


Figura 2. Ciclo biogeoquímico del nitrógeno.

ii. Solubilizadores de hierro: sideróforos

El hierro resulta esencial para el desarrollo de las plantas. Actúa como cofactor de muchas enzimas y se requiere en procesos metabólicos como el ciclo de los ácidos tricarbónicos, la fosforilación oxidativa, la cadena de transporte de electrones y la fotosíntesis. Su deficiencia provoca la interrupción de estos procesos y síntomas visuales como clorosis. Por todos estos motivos, proveer a las plantas con una forma accesible de hierro es crucial. En el suelo, el hierro se encuentra disponible en forma de ion ferroso (Fe^{2+}) o ion férrico (Fe^{3+}), el cual es el predominante en condiciones aeróbicas, pero no está disponible porque forma hidróxidos insolubles (Radzki et al., 2013).

Los cultivos obtienen hierro gracias a los microorganismos productores de sideróforos, compuestos capaces de quelar hierro con gran afinidad y de forma irreversible. Principalmente están compuestos por hidroxamatos o catecoles (**Figura 4**). El ion férrico se une fuertemente a los sideróforos permitiendo su transformación a ion ferroso, el cual es soluble. Los sideróforos también pueden ayudar a obtener otros elementos como Mo, Mn, Ni y Co. Asimismo, protegen a los cultivos de enfermedades provocadas por patógenos porque limitan la disponibilidad de hierro para estos microorganismos. Los sideróforos son producidos por bacterias y hongos, pudiendo destacar especies como *Aspergillus niger*, *Penicillium citrinum* y *Trichoderma harzianum* (Ghosh et al., 2020).

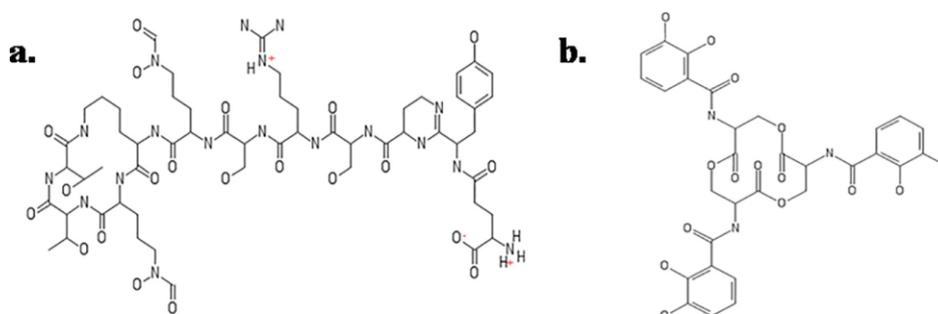


Figura 3. Estructura química de los sideróforos: a. Hidroxamato, b. Catecol (Ghosh et al., 2020).

iii. Solubilizadores de fosfato

El fósforo es importante para el crecimiento y desarrollo por su participación en la formación de fosfolípidos, coenzimas, nucleótidos, ADN, ARN, ATP y procesos como el desarrollo radicular o la formación de semillas. Sin embargo, es un elemento limitante en el suelo debido a que forma compuestos poco solubles como fosfatos de calcio, hierro, magnesio y aluminio. La disponibilidad de los fosfatos está influenciada por el pH del suelo y la adición de fertilizantes, por lo tanto, la presencia en el suelo de microorganismos solubilizadores de fosfato constituye un papel esencial para aumentar la concentración de fósforo disponible para las plantas (Sánchez et al., 2017).

Los microorganismos solubilizan el fósforo mediante la excreción de ácidos orgánicos que actúan como quelantes y disminuyen el pH del suelo (Bustamante et al., 2016; Nishanth y Biswas, 2008) y enzimas con actividad fosfatasa (Voběrková et al., 2020). Estos microorganismos crecen en medios con fosfato tricálcico, apatita y otras fuentes de fósforo. Ejemplos de microorganismos solubilizadores de fosfato son *Burkholderia cepacia*, *Pseudomonas putida*, *P. luteola*, *Aeromonas hydrophila*, *Enterobacter sakasaki*, y *Enterobacter cloacae* (Montoya et al., 2020).

iv. Solubilizadores de potasio

El potasio forma parte de enzimas, coenzimas y proteínas. Además, está asociado con el movimiento del agua, nutrientes y carbohidratos en los tejidos de las plantas. La deficiencia de potasio se traduce a una disminución del crecimiento y rendimiento en los cultivos (Bahadur et al., 2014).

El potasio puede encontrarse en la litosfera soluble en agua, de manera intercambiable y no intercambiable. Sin embargo, la mayor parte del potasio en el suelo se presenta en formas insolubles en minerales, por lo tanto, no se encuentra directamente disponible para las plantas. Los microorganismos solubilizadores de potasio liberan este elemento mediante la excreción de ácidos orgánicos quelantes que disuelven el potasio de las rocas (Sánchez et al., 2017). Entre estos microorganismos destacan *Bacillus mucilaginosus*, *B. edaphicus*, *B. circulanscan*, *Arthrobacter* spp. y *Aspergillus fumigatus* (Bahadur et al., 2014).

1.3. Estudios de la capacidad biofertilizante del compost

La importancia del compost debido a sus características y aplicaciones ha dado lugar a un especial interés por mejorar su estabilidad y sus propiedades biofertilizantes, así como estudiar las poblaciones microbianas presentes en él. Por lo tanto, se han desarrollado numerosos estudios enfocados a lograr estos objetivos.

Las características físico-químicas del compost se ven mejoradas con la incorporación de nutrientes. Montoya et al. (2020) evaluaron las propiedades del proceso de compostaje suplementado con rocas fosfatadas. Los resultados concluyeron que esta adición tenía efectos positivos en el compostaje aumentando el contenido de fósforo y los microorganismos que los solubilizan. Por otro lado, Sánchez et al. (2017) demostraron que la inoculación de microorganismos en el compost mejora no solo la obtención de nitrógeno y fósforo, sino también la de otros nutrientes como potasio, magnesio, manganeso, boro, hierro y calcio. El estudio de la presencia de consorcios microbianos en el compostaje llevado a cabo por Álvarez-Vera et al. (2019) evidenció que estas asociaciones favorecen la calidad del compost, acelerando la degradación de la materia orgánica, mejorando las características químicas y biológicas y disminuyendo la presencia de compuestos que generan malos olores. Otra de las alternativas de más interés consiste en la aplicación conjunta de compost y residuos obtenidos del tratamiento de aguas residuales. Esta combinación mejora la densidad, la porosidad, los niveles de fósforo y nitratos, la retención de agua y la actividad microbiana (Belyaeva et al., 2012).

En lo referente a los microorganismos implicados en el compostaje, las actinobacterias son objeto de especial interés. El estudio llevado a cabo por Asadu et al. (2020) se dedicó a analizar la capacidad de estos microorganismos para mejorar la capacidad biofertilizante del compost, haciendo hincapié en los géneros *Streptomyces* spp. y *Rothia* spp. para aumentar la presencia de nitrógeno. Además de este objetivo, Shen et al. (2021) buscaron actinobacterias antagonistas a *Ralstonia solanacearum* para combatir la enfermedad del marchitamiento bacteriano del tomate que éste patógeno causa. Finalmente, identificaron a *Streptomyces microflavus* como actinobacteria antagonista a *R. solanacearum* debido a su actividad glucanasa para degradar la pared celular del patógeno.

Los beneficios de diferentes tipos de biofertilizantes fueron evaluados por Anli et al. (2020). Concretamente, estudiaron cómo la aplicación de compost, bacterias promotoras del crecimiento vegetal y hongos micorrícicos mejoraban la respuesta de las palmeras frente a la sequía. Los resultados obtenidos demostraron que los beneficios nutricionales que aportan los biofertilizantes son traducidos en una mayor resistencia de las palmeras frente a la sequía, las cuales presentaban una mayor eficiencia del aparato fotosintético, la captación de agua, acumulación de osmolitos, producción de enzimas antioxidantes, mayor estabilidad de membrana y disminución de la peroxidación lipídica.

En conclusión, la necesidad de utilizar tecnologías como el compostaje supone una mejora en la agricultura y el medio ambiente. Su capacidad biofertilizante unida a su bajo impacto ambiental hacen del compost un producto adecuado para aplicarse a suelos y cultivos. Esto no se debe solo a las mejoras en parámetros físico-químicos que ocasiona, sino también por aumentar la salud de las plantas y favorecer el crecimiento de microorganismos que movilizan nutrientes esenciales en el sistema suelo-planta, consolidándose como una alternativa a los fertilizantes químicos.

2. Objetivos

Este trabajo forma parte de las investigaciones que realiza el grupo de investigación BIO-175, Desarrollo de procesos microbiológicos para la mejor de suelos de interés agrícola, constituido por microbiólogos expertos en compostaje de la Universidad de Almería. Concretamente, el objetivo principal del trabajo consistió en analizar la capacidad biofertilizante de diferentes muestras de compost industrial y comercial mediante la identificación de los grupos microbianos asociados a grupos de interés agronómico. Para lograr este objetivo, se plantearon una serie de objetivos específicos:

- 1- Cuantificar la microbiota fúngica, actinomicetal y bacteriana mesófila y termófila presente en compost procedentes de instalaciones industriales de gestión de residuos orgánicos.
- 2- Analizar la microbiota relacionada con el ciclo biogeoquímico del nitrógeno en las diferentes muestras de compost.
- 3- Estudiar la presencia de agentes biofertilizantes solubilizadores de fosfato, solubilizadores de potasio y productores de sideróforos en compost estabilizados en plantas de compostaje industrial.

3. Materiales y métodos

3.1. Muestras de compost

Para alcanzar los objetivos de este trabajo se han realizado una serie de análisis a 10 muestras de productos estabilizados distintas (seis muestras de compost, dos sustratos comerciales y dos suelos de jardín). Las características de cada una de las materias primas son diferentes y, en consecuencia, son empleadas con distintas finalidades. Al tratarse todas ellas de productos estables, las muestras se almacenaban a temperatura ambiente, en un lugar fresco y seco. La **Tabla 1** recoge información sobre las muestras analizadas. En ella, los residuos vegetales hacen referencia a los residuos de origen

vegetal compuestos por tallos, raíces, césped y recortes de árboles procedentes de la jardinería, limpieza de bosques, agricultura, etcétera. Los lodos de depuradora son residuos de origen urbano y doméstico resultado de la depuración de las aguas residuales. Los sustratos comerciales son productos estabilizados vendidos para favorecer el desarrollo y crecimiento de plantas. Las muestras de jardinería hacen referencia a sustratos presentes en jardines y parques.

Muestra	Material	Composición
Compost 1	Lodo de depuradora	Lodo de depuradora y restos de poda en proporción 1:1 (v/v).
Compost 2	Residuo vegetal	Mezcla de residuo seco de plantas de tomate y virutas de madera de pino en proporción 1:1 (v/v).
Compost 3	Residuo vegetal	Plantas de tomate, tomates de destrío y paja de maíz en proporción 2:1:2 (v/v).
Compost 4	Residuo vegetal	Plantas de tomate, tomates de destrío y paja de maíz en proporción 2:1:2 (v/v).
Compost 5	Residuo vegetal	Residuos hortícolas de plantas de tomate tromelados.
Compost 6	Residuo vegetal	Residuos hortícolas de plantas de tomate.
Sustrato comercial 1	Sustrato universal	Mezcla de fibra de coco, turba rubia, turba negra, material vegetal compostado, materia orgánica y perlita.
Sustrato comercial 2	Sustrato universal	Mezcla de turba, perlita, cal, fertilizante NPK, fosfato de silicio y micronutrientes.
Jardinería 1	Muestra de jardinería	Suelo de jardín.
Jardinería 2	Muestra de jardinería	Suelo de jardín.

Tabla 1. Características de cada uno de los compost estudiados.

3.2. Medios de cultivo

A continuación, se muestran los diferentes medios de cultivos utilizados para llevar a cabo este estudio.

APHA (PANREAC 413799.1210)

El medio APHA fue empleado para estudiar la presencia de bacterias mesófilas y termófilas en cada uno de los compost. Sus componentes se muestran en la **Tabla 2**.

Componente	Cantidad (g/L)
Extracto de levadura	2,5
Glucosa	1,0
Agar bacteriológico	15,0
Enzima digestiva caseína	5,0

Tabla 2. Componentes del medio APHA.

Para preparar este medio de cultivo, se pesaron 23 g de producto y se disolvieron en 1 L de agua destilada. Después, se esterilizó en autoclave a 121 °C durante 20 minutos y se distribuyó en placas de Petri estériles donde se dejó solidificar el medio.

ROSA DE BENGALA (LiofilChem, 610090)

La **Tabla 3** recoge los componentes que forman parte del medio, el cual se utilizó para analizar la microbiota fúngica mesófila y termófila.

Componente	Cantidad (g/L)
Agar bacteriológico	15,0
Cloranfenicol	0,1
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,5
Rosa bengala	0,05
Peptona bacteriológica	5,0
Glucosa	10,0
KH ₂ PO ₄	1,0

Tabla 3. Componentes del medio Rosa de Bengala.

La preparación de este medio consistió en pesar 24 g del preparado de Rosa de Bengala y 3,75 g de agar para disolverlos en 750 mL de agua destilada. Posteriormente se esterilizó en autoclave a 121 °C durante 20 minutos y se repartió en placas de Petri estériles.

AGAR CASEINATO SÓDICO (SCA)

Los componentes del Agar Caseinato Sódico se encuentran en la **Tabla 4**. Este medio fue utilizado para estudiar la microbiota actinomicetal mesófila y termófila.

Componente	Cantidad (g/L)
Caseinato sódico	0,2
K ₂ HPO ₄	0,5
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,2
FeCl ₃ ·6H ₂ O	0,01
Agar bacteriológico	20
pH final	6,5-6,7

Tabla 4. Componentes del medio Agar Caseinato Sódico.

El procedimiento de preparación del Agar Caseinato Sódico consistió en pesar cada uno de los componentes indicados y disolverlos en 1 L de agua destilada ajustando el pH a valores adecuados. Seguidamente, se esterilizó en autoclave y se distribuyó en placas de Petri estériles.

MEDIO PARA SOLUBILIZADORES DE FOSFATO (NBRIP)

Los componentes del medio para solubilizadores de fosfato (medio NBRIP) se muestran en la **Tabla 5**. Este medio se empleó tal y como indica su nombre para identificar microorganismos solubilizadores de fosfato.

Componente	Cantidad (g/L)
Glucosa	10,0
Ca ₃ (PO ₄) ₂	5,0
(NH ₄) ₂ SO ₄	0,5
NaCl	0,2
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,1
KCl	0,2
Extracto de levadura	0,5
MnSO ₄ ·H ₂ O	0,002
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0,002
Agar	15,0

Tabla 5. Componentes del medio para solubilizadores de fosfato.

Para preparar este medio se realizaron los cálculos necesarios para añadir la cantidad adecuada de cada uno de los componentes en un volumen total de 750 mL de agua destilada. Una vez que el medio se encontró disuelto, se esterilizó en autoclave a 121 °C durante 20 minutos y se repartió en placas de Petri estériles.

MEDIO PARA SOLUBILIZADORES DE POTASIO O AGAR ALEKSANDROW (Himeda, M1996-500G)

Para estudiar la presencia de microorganismos solubilizadores de potasio, se utilizó el medio de Aleksandrow (**Tabla 6**).

Componente	Cantidad (g/L)
Dextrosa	5,0
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,5
FeCl ₃	0,005
CaCO ₃	0,1
Ca ₃ (PO ₄) ₂	2,0
AlK ₂ O ₆ Si ₂	2,0
Agar	20,0
pH final (a 25°C)	7,2±0,2

Tabla 6. Componentes del medio Aleksandrow.

La preparación del medio de Aleksandrow consistió en pesar 29,605 g del producto para disolverlos en 1 L de agua destilada. El siguiente paso consistió en autoclavar el medio. En último lugar, se dispensó en placas de Petri estériles.

MEDIO PARA SIDERÓFOROS

La **Tabla 7** recoge los componentes del medio para la detección de microorganismos productores de sideróforos.

Componente	Cantidad/L
Reactivo CAS (Cromo azurol sulfonato)	60,5 mg
HDTMA (Hexadeciltrimetilaminobromuro)	72,9 mg
Fe ₃ ·6H ₂ O 1mM *	10 mL
Piperazina	30,24 mg
Agar	1,5%

Tabla 7. Componentes del medio para sideróforos.

*Disolución Fe₃·6H₂O 1mM: Se disolvieron 0,027 g de Fe₃·6H₂O en 99 mL de H₂O y se incorporó 1mL de HCl 1N en agitación.

El procedimiento para preparar este medio consistió en pesar los componentes y añadir la disolución de Fe₃·6H₂O 1mM para disolverlo en 1 L de agua destilada. Por último, se esterilizó en autoclave a 121 °C durante 20 minutos y se distribuyó en placas de Petri estériles.

MEDIO DE BURK SIN NITRÓGENO (BSN)

El medio de Burk sin nitrógeno fue utilizado para analizar la presencia de microorganismos fijadores de nitrógeno atmosférico. La composición del medio se muestra en la **Tabla 8**.

Componente	Cantidad (g/L)
Glucosa	5
KH ₂ PO ₄	0,64
K ₂ HPO ₄	0,16
NaCl	0,2
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,2
CaSO ₄ ·2H ₂ O	0,05
NaMoO ₄ ·2H ₂ O	0,001
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0,0025
Agar	15

Tabla 8. Componentes del medio de Burk sin nitrógeno.

Para elaborar este medio es necesario preparar tres soluciones conteniendo cada una diferentes sales de Burk disueltas en agua destilada (**Tablas 9, 10 y 11**). De lo contrario, las sales precipitarían. Su preparación se llevó a cabo pesando cada uno de los componentes indicados y se disolvieron en 1 L de agua destilada. Seguidamente, se autoclavaron y conservaron a 4 °C hasta su posterior uso para elaborar el medio de Burk sin nitrógeno.

Solución A

Componente	Cantidad/L
K₂HPO₄	6,4 g
KH₂PO₄	1,6 g
Agua destilada	c.s.p. 1 L

Tabla 9. Componentes de la Solución A de sales de Burk.

Solución B

Componente	Cantidad/L
NaCl	2,0 g
MgSO₄·7H₂O	2,0 g
CaSO₄·2H₂O	0,5 g
Agua destilada	c.s.p. 1 L

Tabla 10. Componentes de la Solución B de sales de Burk.

Solución C

Componente	Cantidad/L
NaMoO₄·2H₂O	0,01 g
FeSO₄·7H₂O	0,025 g
Agua destilada	1 L

Tabla 11. Componentes de la Solución C de sales de Burk.

Por lo tanto, el medio Burk sin nitrógeno se obtiene pesando la cantidad de glucosa y agar (**Tabla 8**) necesario para 700 mL de agua destilada y se añadieron 100 mL de cada una de las sales de Burk en condiciones de esterilidad. Finalmente, se autoclavó el medio y se repartió en placas de Petri estériles.

MEDIO DE AMONIFICANTES

La **Tabla 12** recoge los componentes que forman parte del medio para analizar la presencia de microorganismos amonificantes.

Componente	Cantidad/L
Solución de Winogradsky	50,0 mL
Asparragina	0,2 g
Solución de oligoelementos	1,0 mL
Agua destilada	c.s.p. 1 L

Tabla 12. Componente del medio de amonificantes.

El procedimiento de preparación de este medio consistió en calcular las cantidades necesarias para la elaboración de un determinado volumen final. Normalmente, se prepararon 500 mL. Las soluciones de Winogradsky y oligoelementos se adicionaron en condiciones de esterilidad. Posteriormente, se dividió el medio en tubos gordos a razón de 9 mL por tubo. Por último, se esterilizó en autoclave a 121 °C durante 20 minutos.

MEDIO DE NITRIFICANTES

El medio para microorganismos nitrificantes queda reflejado en la **Tabla 13** con sus respectivos componentes.

Componente	Cantidad/L
Solución de Winogradsky	50,0 mL
(NH ₄) ₂ SO ₄	0,5 g
CaCO ₃	7,5 g
Agua destilada	c.s.p. 1 L

Tabla 13. Componentes del medio de nitrificantes.

Este medio se preparó añadiendo las cantidades necesarias para obtener un volumen final de 500 mL, incorporando la Solución de Winogradsky se incorporó en condiciones de esterilidad. Seguidamente, se repartió el medio en tubos largos a razón de 9 mL por tubo y se esterilizó en autoclave.

MEDIO DE DESNITRIFICANTES

El estudio de microorganismos desnitrificantes se realizó con este medio, cuyos componentes quedan reflejados en la **Tabla 14**.

Componente	Cantidad/L
Glicerol	10,0 g
Extracto de levadura	3,0 g
Peptona	5,0 g
KNO ₃	1,0 g
Solución de Winogradsky	50,0 mL
Solución de oligoelementos	1,0 mL
Rojo fenol 0.04% aq	20,0 mL
Agua destilada	c.s.p. 1 L

Tabla 14. Componentes del medio de desnitrificantes.

La preparación del medio de desnitrificantes consistió en añadir las cantidades necesarias para obtener un volumen total de 500 mL. Las soluciones de Winogradsky y oligoelementos se añadieron en condiciones de esterilidad. El siguiente paso consistió en repartir el medio en tubos pequeños a razón de 4,5 mL por tubo. Finalmente, se esterilizó en autoclave a 121 °C durante 20 minutos.

SOLUCIÓN DE WINOGRADSKY

La solución de Winogradsky forma parte de los componentes necesarios para los medios de amonificantes, nitrificantes y desnitrificantes. Su composición se muestra en la **Tabla 15**.

Componente	Cantidad (g/L)
K ₂ HPO ₄	5,0
MgSO ₄ ·7H ₂ O	2,5
NaCl	2,5
Fe ₂ (SO ₄) ₃ ·H ₂ O	0,05
MnSO ₄ ·H ₂ O	0,05

Tabla 15. Componentes de la Solución de Winogradsky.

Para obtener la solución de Winogradsky se pesaron las cantidades indicadas y se disolvieron en 1 L de agua destilada. Por último, se esterilizó en autoclave y se conservó la solución a 4 °C hasta su posterior uso.

SOLUCIÓN DE OLIGOELEMENTOS

Los componentes que forman parte de la solución de oligoelementos se representan en la **Tabla 16**. Dicha solución forma parte de los medios de desnitrificantes y amonificantes.

Componente	Cantidad (g/L)
Ácido nitrilotriacético 99%	1,5
MgSO ₄ ·7H ₂ O	3,0
NaCl	1,0
MnSO ₄ ·H ₂ O	0,5
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0,1
CoSO ₄ ·7H ₂ O	0,1
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0,1
ZnSO ₄ ·H ₂ O	0,1
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0,01
AlK(SO ₄) ₂ ·12H ₂ O	0,01
H ₃ BO ₃	0,01
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0,01

Tabla 16. Componentes de la Solución de Oligoelementos.

La solución de oligoelementos se preparó añadiendo cada una de las cantidades mostradas en la **Tabla 16** y se disolvieron en 1 L de agua destilada. Seguidamente se esterilizó en autoclave a 121 °C durante 20 minutos para finalmente conservarse a 4 °C hasta su posterior uso.

SOLUCIÓN SALINA AL 0,9%

La **Tabla 17** muestra los componentes para elaborar la solución salina al 0,9%, la cual fue utilizada para preparar las diferentes diluciones seriadas necesarias para inocular las muestras y realizar los cálculos del UFC/g y el NMP.

Componente	Cantidad (g/L)
NaCl	0,9

Tabla 17. Componentes de la solución salina al 0,9%.

El procedimiento para prepararla consistió en pesar la cantidad de cloruro sódico necesaria para un determinado volumen y repartir la solución tanto en matraces de 90 mL como en tubos de 9 mL, los cuales se esterilizaron en autoclave a 121 °C durante 20 minutos.

REACTIVO PARA NITRIFICANTES

El Reactivo para Nitrificantes se utilizó para llevar a cabo la lectura del medio de nitrificantes. Dicho reactivo está compuesto a su vez por dos reactivos, cuyos componentes quedan reflejados en las **Tablas 18 y 19**.

Reactivo 1

Componente	Cantidad/L
Difenilamina*	1 g
H ₂ SO ₄	100 mL

Tabla 18. Componentes del Reactivo 1 del Reactivo para Nitrificantes.

*Disolver la difenilamina en el H₂SO₄ y después verter la mezcla sobre 20 mL de agua destilada.

El Reactivo 1 se preparó calculando las cantidades necesarias para un volumen total de 500 mL y se siguió el protocolo indicado.

Reactivo 2

Componente	Cantidad (g/L)
H ₂ SO ₄ al 98%	150

Tabla 19. Componentes del Reactivo 2 del Reactivo para Nitrificantes.

Para preparar el Reactivo 2 se pesaron 75 g de H₂SO₄ para disolverlos en un volumen total de 500 mL.

REACTIVO PARA AMONIFICANTES (REACTIVO DE NESSLER)

El Reactivo de Nessler se empleó en la lectura e interpretación del medio de amonificantes. Este reactivo está compuesto a su vez por otros dos, cuyos componentes se recogen en las **Tablas 20** y **21**.

Reactivo 1

Componente	Cantidad (g/L)
HgI ₂	50
KI	36,5
Agua destilada	c.s.p. 1L

Tabla 20. Componentes del Reactivo 1 del Reactivo para Amonificantes.

La preparación de este reactivo se llevó a cabo pesando las cantidades adecuadas para obtener un volumen final de 500 mL.

Reactivo 2

Componente	Cantidad (g/L)
KOH	150
Agua destilada	c.s.p. 1L

Tabla 21. Componentes del Reactivo 2 del Reactivo para Amonificantes.

El Reactivo 2 se preparó añadiendo 75 g de KOH para disponer de un volumen final de 500 mL.

3.3. Diseño experimental: protocolo de cuantificación

a. Diseño experimental

La **Figura 5** recoge un esquema resumen de las diferentes partes experimentales para alcanzar el objetivo de este trabajo.

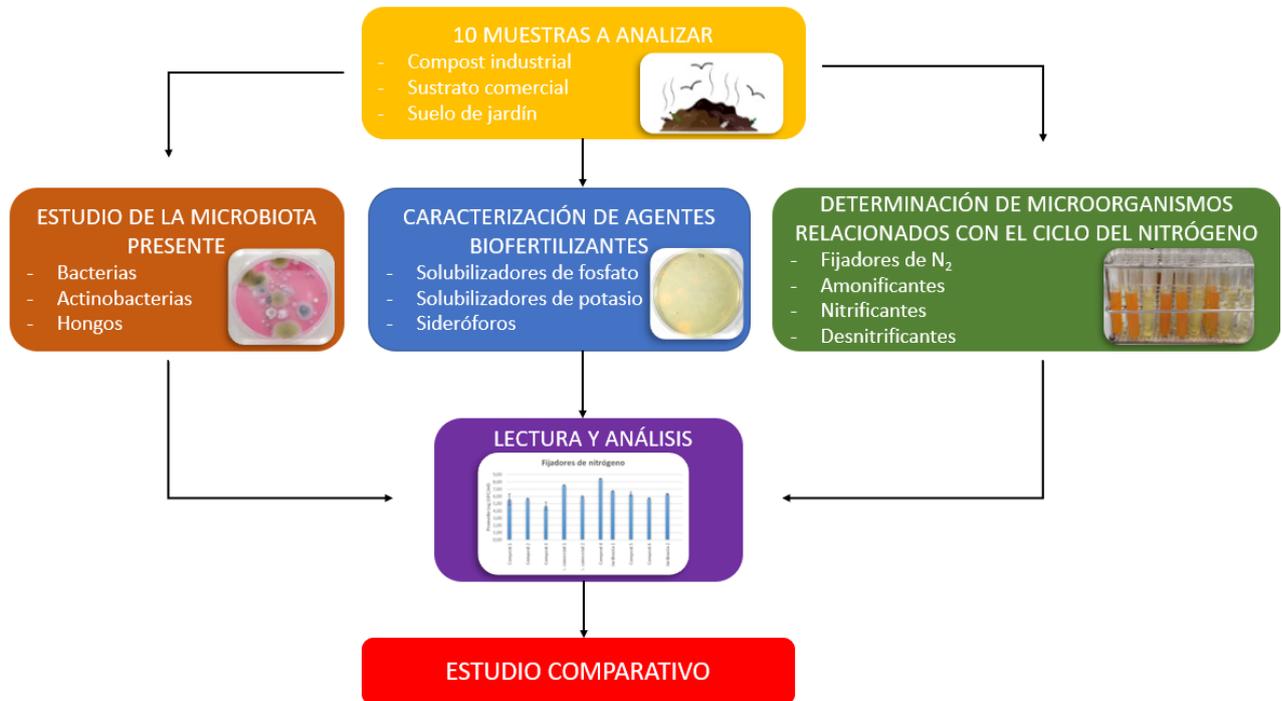


Figura 4. Esquema del diseño experimental.

b. Preparación y siembra de las muestras

Para llevar a cabo este estudio se preparó una serie de diluciones decimales a partir de las muestras de compost con el objetivo de poder estudiar los diferentes indicadores microbianos de la capacidad biofertilizante del compost.

En primer lugar, se tomaron 10 g de compost y se incorporaron a un matraz con 90 mL de solución salina al 0,9% (dilución 10^{-1}). Tras mantener en agitación durante 30 minutos a 120 rpm, se realizaron el resto de las diluciones seriadas en tubos con 9 mL de solución salina al 0.9%. Para ello, se tomó 1 mL de la dilución inicial y se transfirió al tubo de solución salina obteniéndose la segunda dilución (10^{-2}). A partir de esta nueva dilución, se repite el proceso obteniéndose la dilución 10^{-3} y así sucesivamente hasta realizar seis diluciones. El ensayo descrito se realizó por triplicado.

A partir de las diluciones decimales se inoculó en diferentes medios de cultivo un determinado volumen con ayuda de la micropipeta. Los medios en placa fueron inoculados con 100 μ L y se extendió el volumen mediante bolitas de vidrio. En el caso de los medios líquidos, se incorporó 1 mL para las pruebas de amonificantes y nitrificantes mientras que el medio de desnitrificantes fue inoculado con 500 μ L. Cabe destacar que al medio de desnitrificantes se incorporó agar a sobrefusión (45 °C) y se

selló con parafina para asegurar que se cumplieran las condiciones anaerobias necesarias para que se llevase a cabo el proceso de desnitrificación. Cada uno de los medios se incubó durante el intervalo de tiempo necesario y en las condiciones de temperatura adecuadas, datos que quedan reflejados en la **Tabla 22**.

Indicador microbiano	Medio para sembrar	Temperatura de incubación (°C)	Tiempo de incubación
Bacterias mesófilas	APHA	30	48 horas
Actinobacterias mesófilas	Agar Caseinato Sódico	30	72 horas
Hongos mesófilos	Rosa de Bengala	30	5 días
Bacterias termófilas	APHA	50	48 horas
Actinobacterias termófilas	Agar Caseinato Sódico	50	72 horas
Hongos termófilos	Rosa de Bengala	50	5 días
Solubilizadores de fosfato	Medio de NBRIP	30	24-48 horas
Solubilizadores de potasio	Agar Aleksandrow	30	24-48 horas
Sideróforos	Medio para sideróforos	30	5 días
Fijadores de nitrógeno	Burk sin nitrógeno	30	24-48 horas
Amonificantes	Medio para amonificantes	30	15 días
Nitrificantes	Medio para nitrificantes	30	15 días
Desnitrificantes	Medio para desnitrificantes	30	15 días

Tabla 22. Pruebas para analizar y condiciones de incubación.

c. Cuantificación de la microbiota presente en las muestras

Una vez que las muestras se incubaron el tiempo necesario, se procedió a realizar la lectura y recuento de las pruebas llevadas a cabo. La correcta cuantificación de la microbiota presente en las muestras de compost dependió de la adecuada interpretación de los indicadores microbianos estudiados y su posterior recuento mediante la técnica del número más probable (NMP) para los medios líquidos y las unidades formadoras de colonias por gramo (UFC/g) para aquellas pruebas realizadas en placa.

A continuación, se indica cómo se llevó a cabo la lectura e interpretación de cada uno de los indicadores microbianos.

-Microbiota fúngica, actinomicetal y bacteriana mesófila y termófila: se estudió la cuantificación de estos grupos microbianos mediante la identificación y recuento de los diferentes tipos coloniales presentes en cada uno de los medios utilizados.

- **Solubilizadores de fosfato y de potasio:** la lectura de ambos medios se realizó contando las colonias que aparecieron con halo de aclaramiento, indicando la solubilización de fosfato tricálcico y potasio respectivamente.
- **Sideróforos:** la cuantificación de microorganismos productores de sideróforos se llevó a cabo contando las colonias que aparecieron con halos de color rosa-naranja, hecho indicativo de la liberación de sideróforos (el color es dependiente del agente quelante que actúa).
- **Fijadores de nitrógeno:** la lectura de los microorganismos fijadores de nitrógeno se realizó contando los diferentes tipos coloniales presentes en las placas de medio de Burk sin nitrógeno.
- **Amonificantes:** la lectura e interpretación del medio de amonificantes requirió unos pasos de revelado. En primer lugar, se añadió 1 mL de cada tubo con medio de amonificantes en un tubo de hemólisis. Posteriormente se añadieron los componentes del reactivo de Nessler (500 μ L de Reactivo 1 y 500 μ L de Reactivo 2). Los tubos con lectura positiva viraron de color a naranja-ladrillo, indicativo de la presencia de amoniaco en el tubo. Los tubos negativos permanecieron de color amarillo.
- **Nitrificantes:** para interpretar el medio de nitrificantes se añadió 1 mL de reactivo de difenilamina (Reactivo 1) a cada uno de los tubos y 10 gotas de ácido sulfúrico (Reactivo 2). La lectura positiva se detectó por la aparición de un color azul en los tubos debido a la presencia de nitratos. Los tubos negativos permanecieron transparentes.
- **Desnitrificantes:** los tubos positivos en microorganismos desnitrificantes se detectaron por la coloración naranja-rosácea del medio, la presencia de turbidez y el tapón de agar desplazado. Todas estas características son indicativas de que se produjo la respiración anaerobia utilizando el nitrato como aceptor final de electrones. Los tubos negativos permanecieron amarillos (por producirse la fermentación) o no presentaban turbidez.

d. Análisis estadístico

Todas las medidas analíticas se efectuaron por triplicado y los resultados obtenidos se analizaron mediante el paquete estadístico Statgraphics (Statistical Graphics Co.). La determinación del efecto de los diferentes factores estudiados en cada serie experimental sobre los correspondientes parámetros o variables dependientes se realizó mediante un análisis de la varianza (ANOVA) multifactorial considerando también las relaciones entre los distintos factores. Para calcular en todos los casos la suma de cuadrados la cual mide la cantidad de variación para cada factor en el análisis ANOVA se aplicó el método de medida tipo III con un nivel de significación del 0,05%. Según este análisis, una vez determinados los factores que influyeron significativamente en la variabilidad de cada parámetro, se realizó un análisis de rangos múltiples mediante el método de cálculo de las mínimas diferencias significativas para la comparación entre medias de los distintos niveles de cada factor considerando asimismo un intervalo de confianza del 95%. Por último, se efectuó un análisis multivariado de los diferentes factores estudiados en cada serie experimental con el objetivo de obtener su correlación y representarla mediante un gráfico de correlación ordinal de Spearman.

4. Resultados y discusión

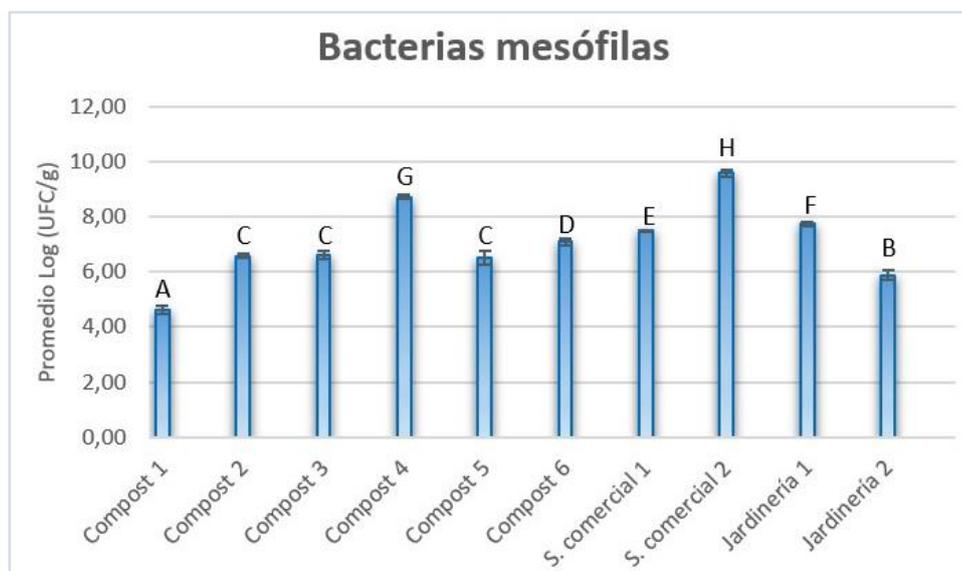
A continuación, se detallan los resultados obtenidos durante el desarrollo de este trabajo. Estos se organizan en tres apartados, siguiendo los objetivos de este Trabajo Final de Grado. En primer lugar, se presenta la microbiota mesófila y termófila estudiada en las diferentes muestras. El segundo apartado se enfoca en el análisis de diferentes grupos microbianos implicados en el ciclo biogeoquímico del nitrógeno. Por último, la tercera sección analiza la presencia en las muestras de microorganismos con capacidad biofertilizante, concretamente de aquellos capaces de solubilizar fosfato, potasio o quelar hierro. Adicionalmente, se incluye un cuarto apartado en el que se estudia la correlación entre las diferentes variables examinadas en este trabajo.

Todas las muestras analizadas correspondían con productos finales. Tal y como se mencionó en el apartado Materiales y Métodos, los ensayos se realizaron con repeticiones por triplicado.

4.1. Estudio de la microbiota mesófila y termófila presente.

a. Microbiota bacteriana.

Los datos recogidos en la **Gráfica 1** muestran que todos los productos finales presentaron elevados niveles de bacterias mesófilas existiendo diferencias significativas entre las muestras, pero no entre las repeticiones de cada una de ellas (**Tabla 23**). En general, los resultados obtenidos oscilaron entre las 6 y 7 unidades logarítmicas a excepción del Compost 1 cuyo recuento fue menor (4,62 log (UFC/g)) y el Compost 4 y el Sustrato comercial 2 que obtuvieron los valores más altos (8,72 y 9,58 log (UFC/g) respectivamente). Adicionalmente, la **Gráfica 1** muestra mediante un análisis de grupos homogéneos que tres de los compost constituidos por residuos vegetales (Compost 2, 3 y 5) fueron similares en cuanto al contenido de bacterias mesófilas. A pesar de que este grupo microbiano predomina en la etapa mesófila del compostaje, la disminución de la temperatura provoca una recolonización por parte de las bacterias mesófilas en las etapas de enfriamiento y maduración (Jurado et al., 2014b). Hassen et al. (2001) estudiaron la evolución de diferentes microorganismos a lo largo del compostaje de residuos sólidos urbanos. En este estudio, los niveles de bacterias mesófilas durante la fase de enfriamiento alcanzaron aproximadamente las $1,8 \times 10^8$ UFC/g, los cuales fueron similares a los obtenidos en la fase mesófila (entre 10^8 UFC/g y 10^9 UFC/g). Igualmente, Goyal et al. (2005) obtuvieron resultados con el mismo orden de magnitud. Comparado con los resultados obtenidos, la mayoría de las muestras presentan menores valores a excepción del Compost 4 y el Sustrato Comercial 2, cuyos resultados concuerdan con los mencionados anteriormente.



Gráfica 1. Representación de la presencia de bacterias mesófilas en las diferentes muestras.

Parámetro	Suma de cuadrados	GL	Cuadrado medio	F	P
A: Muestra	53,4849	9	5,94276	356,33	0,0000
B: Repetición	0,0835981	2	0,0417991	2,51	0,1096
Residuos	0,300196	18	0,0166776		
Total	53,8687	29			

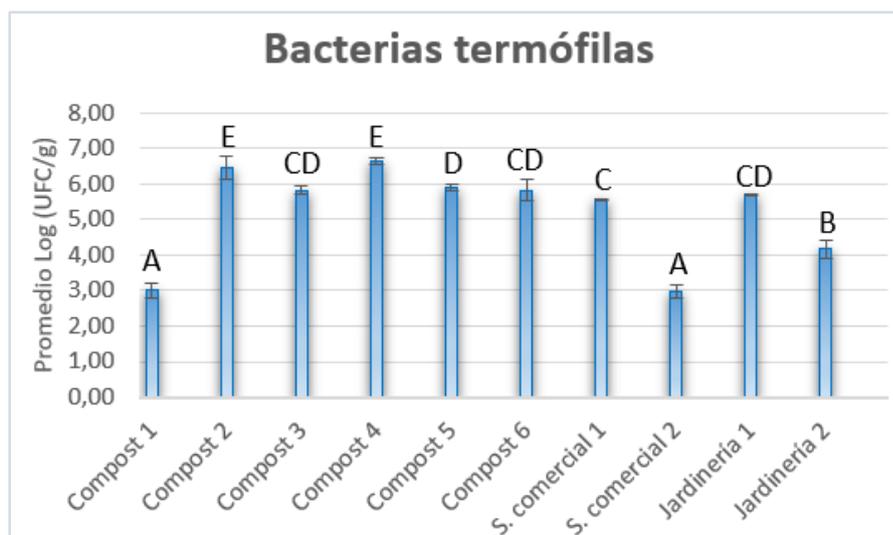
Tabla 23. Análisis de varianza para los valores de recuento de bacterias mesófilas obtenidos en las diferentes muestras, su correspondiente repetición analítica y las interacciones.

GL: Grados de libertad; F: Valor Crítico de la distribución de Fisher; P: Probabilidad (Nivel de significación). Se marcan en rojo los factores significativos.

Repetición	Media LS	Grupos Homogéneos
2	7,01731	A
3	7,08951	AB
1	7,14631	B

Tabla 24. Análisis de rango múltiple para el factor repetición.

En el caso de las bacterias termófilas, los resultados obtenidos (**Gráfica 2**) muestran un ligero descenso en el recuento en comparación con las bacterias mesófilas, ya que los valores oscilaron generalmente entre las 5 y 6 unidades logarítmicas e incluso se llegaron a valores en torno a 3 y 4 unidades logarítmicas en Sustrato comercial 2, Compost 1 y Jardinería 2, las cuales mostraron los valores más bajos (2,97, 3,02 y 4,16 log (UFC/g) respectivamente). Este hecho queda corroborado por estudios anteriores. Goyal et al. (2005) detectaron valores de bacterias termófilas dos órdenes de magnitud menores que en el caso de las bacterias mesófilas, ya que presentan su máximo crecimiento en la fase termófila (López-González et al., 2013). Sin embargo, hay trabajos que apuntan que el grupo termófilo es más abundante en el compost maduro (van Heerden et al., 2002). Pero los trabajos más actuales muestran que, en realidad, esa distinción de grupos es menos importante de lo que cabía pensar, debido a que, en compostaje lo que predomina no es ni mesofilia ni termofilia, sino la termotolerancia (Moreno et al., 2021).



Gráfica 2. Representación de la presencia de bacterias termófilas en las muestras estudiadas.

Parámetro	Suma de cuadrados	GL	Cuadrado medio	F	P
A: Muestra	48,0821	9	5,34245	137,00	0,0000
B: Repetición	0,0552573	2	0,0276286	0,71	0,5056
Residuos	0,701919	18	0,0389955		
Total	48,8392	29			

Tabla 25. Análisis de varianza para los valores de bacterias termófilas obtenidos en los productos finales, su correspondiente repetición analítica y las interacciones.

GL: Grados de libertad; F: Valor Crítico de la distribución de Fisher; P: Probabilidad (Nivel de significación). Se marcan en rojo los valores significativos.

Repetición	Media LS	Grupos Homogéneos
1	5,1466	A
2	5,20696	A
3	5,25132	A

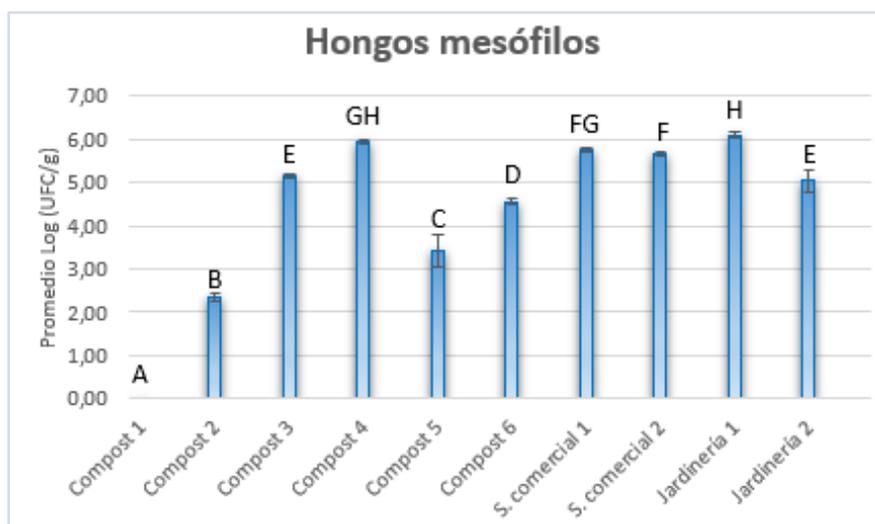
Tabla 26. Análisis de rango múltiple para el factor repetición.

La prueba de rango múltiple representada en la **Gráfica 2** agrupa las muestras en 6 grupos homogéneos, mostrando algunos de los productos finales características intermedias entre otros dos (grupo CD). Tanto los compost con menor recuento (Sustrato Comercial 2 y Compost 1) como aquellos con resultados más elevados (Compost 2 y 4) se agruparon en un mismo grupo homogéneo. La **Tabla 25** muestra que existieron diferencias significativas entre las diferentes muestras, pero no entre las repeticiones de cada una de ellas (**Tabla 26**).

b. Microbiota fúngica.

La **Gráfica 3** muestra la presencia en mayor o menor medida de hongos mesófilos en todos los productos finales a excepción del compost conformado por lodos de depuradora (Compost 1) incluso habiendo repetido los resultados a diluciones más bajas (10^{-1}). Existieron diferencias significativas entre las diferentes muestras las cuales quedan representadas en la **Tabla 27**. Los valores entre los compost correspondientes a residuos vegetales fueron variados, oscilando desde 2,35 log (UFC/g) en

el Compost 2 hasta casi 6 unidades logarítmicas en el Compost 4. En lo referente a los sustratos comerciales, ambos presentaron valores similares (5,75 y 5,65 log (UFC/g) respectivamente), lo cual queda además reflejado en la prueba de rango múltiple incluida en la **Gráfica 3**, indicando que comparten ciertas características. Las muestras de jardinería generaron resultados parecidos, variando solamente en una unidad logarítmica entre ellos (5,03 log (UFC/g) para Jardinería 2 y 6,09 log (UFC/g) para Jardinería 1).



Gráfica 3. Resultados obtenidos tras el estudio de la presencia de hongos mesófilos.

Parámetro	Suma de cuadrados	GL	Cuadrado medio	F	P
A: Muestra	102,402	9	11,378	429,41	0,0000
B: Repetición	0,00986401	2	0,00493201	0,19	0,8317
Residuos	0,476944	18	0,0264969		
Total	102,889	29			

Tabla 27. Análisis de varianza para el recuento de hongos mesófilos en los productos finales, su correspondiente repetición analítica y las interacciones.

GL: Grados de libertad; F: Valor Crítico de la distribución de Fisher; P: Probabilidad (Nivel de significación). Se marcan en rojo los factores significativos.

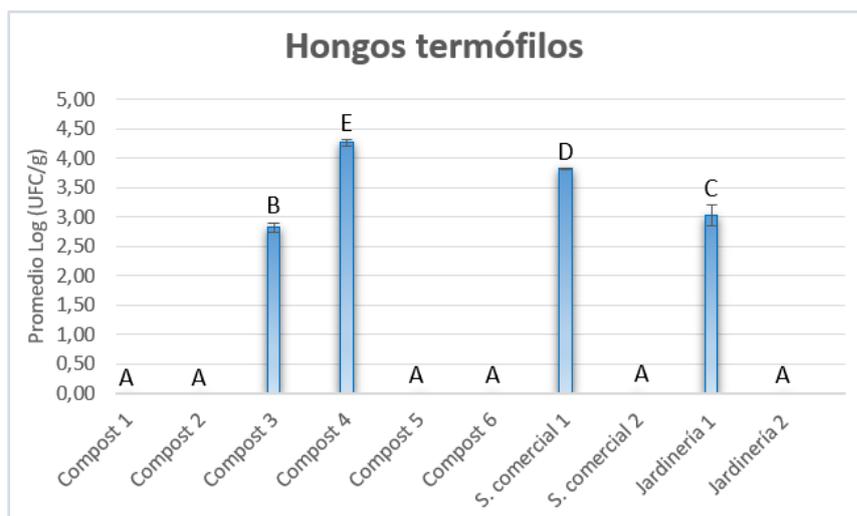
Repetición	Media LS	Grupos Homogéneos
1	4,37261	A
2	4,40791	A
3	4,41361	A

Tabla 28. Análisis de rango múltiple para el factor repetición.

Comparando con otros autores, la microbiota mesófila desciende desde los primeros días de compostaje donde los niveles son aproximadamente de 6 unidades logarítmicas hasta valores de en torno a 3 unidades logarítmicas al final de proceso (Chroni et al., 2009). La mayoría de las muestras estudiadas en este trabajo tuvieron resultados mayores a los mencionados anteriormente, a excepción de los Compost 1 y 2. A pesar de que este grupo microbiano es importante para la formación de sustancias húmicas, solo aquellos capaces de hacer frente a las altas temperaturas alcanzadas durante el compostaje podrán recolonizar el material en la fase de maduración (López-González et al., 2013).

En comparación con las bacterias mesófilas, los niveles de hongos mesófilos en el compost final fueron menores (van Heerden et al., 2002), lo cual quedó corroborado con los resultados obtenidos en esta investigación.

Tal y como queda recogido en la **Gráfica 4**, solo se obtuvieron recuentos de hongos termófilos en 4 de las muestras (Compost 3, Compost 4, Sustrato comercial 1 y Jardinería 1) en las cuales los resultados variaron entre 2,82 log (UFC/g) y 4,26 log (UFC/g). Asimismo, existieron diferencias significativas entre los productos finales (**Tabla 29**) y las 4 muestras con resultados positivos fueron distintas entre ellas, tal y como refleja la prueba de rango múltiple (**Gráfica 4**). El Compost 4 fue el que mayor cantidad de hongos termófilos presentó.



Gráfica 4. Cantidad de hongos termófilos presente en las muestras analizadas.

Parámetro	Suma de cuadrados	GL	Cuadrado medio	F	P
A: Muestra	91,7607	9	10,1956	2577,88	0,0000
B: Repetición	0,00760894	2	0,00380447	0,96	0,4010
Residuos	0,0711908	18	0,00395505		
Total	91,8395	29			

Tabla 29. Análisis de varianza de los valores de hongos termófilos en las muestras, su correspondiente repetición y las interacciones.

GL: Grados de libertad; F: Valor Crítico de la distribución de Fisher; P: Probabilidad (Nivel de significación). Se marcan en rojo los factores significativos.

Repetición	Media LS	Grupos Homogéneos
1	1,38211	A
2	1,38595	A
3	1,41765	A

Tabla 30. Análisis de rango múltiple para el factor repetición.

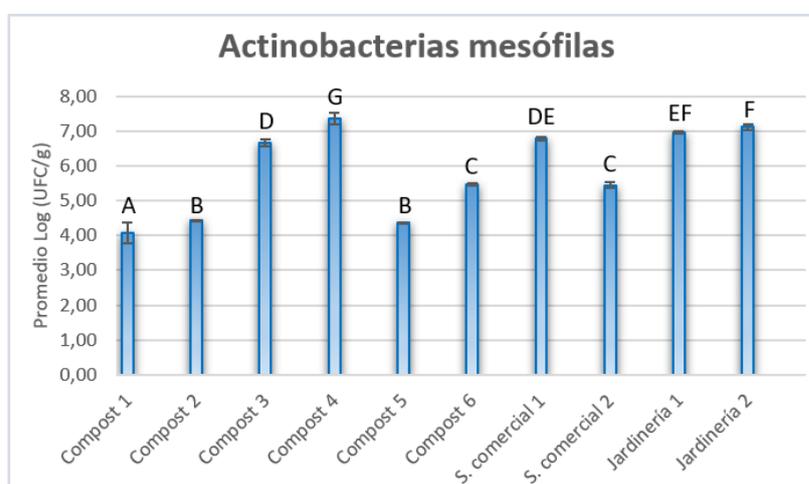
En comparación con los hongos mesófilos, la microbiota fúngica termófila fue menor, ya sea por estar presente en menos muestras, como por haber una menor cantidad en aquellas donde hubo recuentos. Este hecho se debe a que la mayor presencia de estos microorganismos se detecta durante la fase termófila (López-González et al., 2013). Posteriormente, los hongos termófilos disminuyen en

su presencia alcanzando valores de entre 3 y 4 unidades logarítmicas en el final del compostaje (Chroni et al., 2009). En las muestras de este trabajo con resultados positivos, los valores obtenidos concuerdan con los mencionados anteriormente. Al igual que ocurría con la microbiota mesófila, las bacterias termófilas son más abundantes que los hongos en el compost final (Moreno et al., 2021).

c. Microbiota actinomicetal.

Los resultados obtenidos y recogidos en la **Gráfica 5** muestran que, en todos los productos finales, ya sea en mayor o menor grado, las actinobacterias mesófilas estuvieron presentes. Los valores alcanzados se encontraron entre 4,07 log (UFC/g) de la muestra con menor recuento (Compost 1) y 7,35 log (UFC/g) de la muestra con mayor recuento (Compost 4). Estos datos se corroboran con los representados en la **Tabla 31**, en la cual se observaron diferencias significativas entre las muestras. Los productos finales correspondientes a compost mostraron valores similares en torno a las 4 y 5 unidades logarítmicas, a excepción de los Compost 3 y 4 cuyos resultados se encuentran alrededor de las 7 unidades logarítmicas. El Sustrato comercial 1 presentó valores similares al Compost 3. Además, las muestras de jardinería mostraron resultados parecidos, alcanzando valores similares al del Compost 4.

La presencia de actinobacterias mesófilas se considera un buen indicador de un compost maduro (Estrella-González et al., 2020b), lo cual puede indicar que todas las muestras analizadas presentan un grado adecuado de madurez, ya que existen actinobacterias mesófilas en todas ellas. En términos cuantitativos, Chroni et al. (2009) detectó unos niveles de actinobacterias mesófilas en torno a 7 y 8 unidades logarítmicas al final del proceso de compostaje. Comparando con los resultados obtenidos, solo las muestras Jardinería 2 y Compost 4 alcanzaron estos valores.



Gráfica 5. Resultados de la presencia de actinobacterias mesófilas en los diferentes productos finales.

Parámetro	Suma de cuadrados	GL	Cuadrado medio	F	P
A: Muestra	42,877	9	4,76411	308,27	0,0000
B: Repetición	0,0136986	2	0,00684929	0,44	0,6488
Residuos	0,278177	18	0,0154543		
Total	43,1688	29			

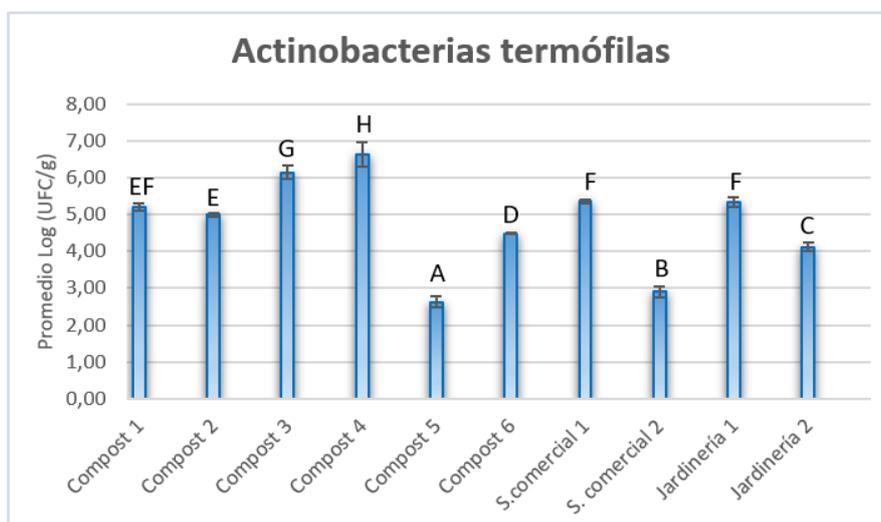
Tabla 31. Análisis de varianza para los resultados de actinobacterias mesófilas obtenidos en los productos finales, su correspondiente repetición analítica y las interacciones.

GL: Grados de libertad; F: Valor Crítico de la distribución de Fisher; P: Probabilidad (Nivel de significación). Se marcan en rojo los factores significativos.

Repetición	Media LS	Grupos Homogéneos
1	5,83216	A
2	5,87372	A
3	5,8805	A

Tabla 32. Análisis de rango múltiple para el factor repetición.

Los resultados representados en la **Gráfica 6** muestran que todos los productos finales contenían actinobacterias termófilas, ya sea en mayor o menor medida. Por lo general, presentaron valores comprendidos entre las 4 y 5 unidades logarítmicas, a excepción del Compost 5 y el Sustrato comercial 1 cuyos resultados fueron menores (en torno a 2 unidades logarítmicas) y los Compost 3 y 4 con valores superiores a 6 unidades logarítmicas. Estos datos se corroboran con los representados en la **Tabla 33**, en la cual se observaron diferencias significativas entre las muestras. En este caso, no pudieron agruparse las muestras entre aquellas correspondientes a compost, sustratos comerciales o productos de jardinería porque sus valores fueron diferentes entre ellas, a excepción de los Compost 1 y 2 cuyos resultados fueron similares. Los niveles de actinobacterias termófilas obtenidos en este trabajo fueron menores en comparación con las mesófilas. Este hecho se debe a que dicho grupo microbiano predomina durante la fase termófila, donde se encarga de degradar moléculas complejas como la celulosa o hemicelulosa, entre otras (Sánchez et al., 2017).



Gráfica 6. Representación de la cuantificación de actinobacterias termófilas en las diferentes muestras analizadas.

Parámetro	Suma de cuadrados	GL	Cuadrado medio	F	P
A: Muestra	44,561	9	4,95122	202,01	0,0000
B: Repetición	0,0176433	2	0,00882164	0,36	0,7026
Residuos	0,441166	18	0,0245092		
Total	45,0198	29			

Tabla 33. Análisis de varianza de recuento de actinobacterias termófilas obtenidos en las muestras, su correspondiente repetición analítica y las interacciones.

GL: Grados de libertad; F: Valor Crítico de la distribución de Fisher; P: Probabilidad (Nivel de significación). Se marcan en rojo los factores significativos.

Repetición	Media LS	Grupos Homogéneos
1	4,74328	A
2	4,79271	A
3	4,79652	A

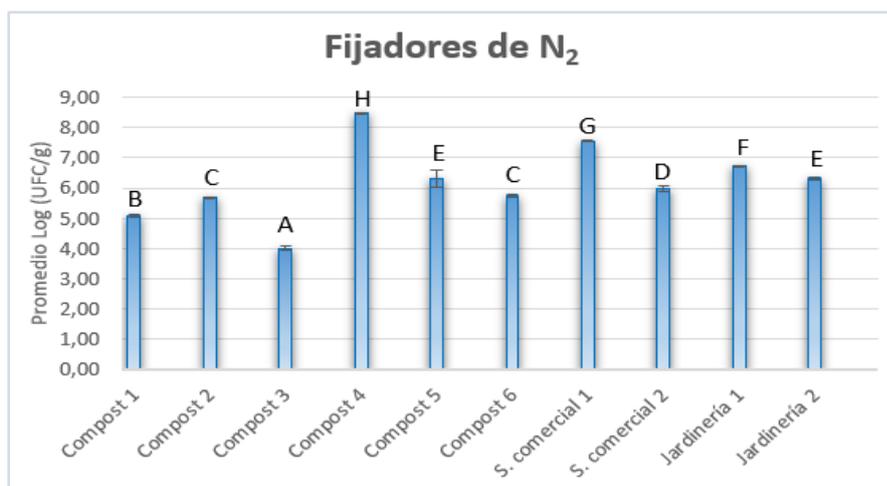
Tabla 34. Análisis de rango múltiple para el factor repetición.

4.2. Estudio de la presencia de microorganismos implicados en el ciclo biogeoquímico del nitrógeno.

a. Fijadores de nitrógeno.

Los resultados referentes a la presencia de bacterias fijadoras de nitrógeno quedan reflejados en la **Gráfica 7**. Tal y como puede observarse, todos los productos finales presentaron fijadores de nitrógeno en diferente medida y existieron diferencias significativas entre las muestras (**Tabla 35**). Los valores obtenidos fluctuaron entre 4,01 log (UFC/g) de la muestra con menor recuento (Compost 3) y 8,48 log (UFC/g) de la muestra con mayor valor (Compost 4). Los recuentos más bajos se encontraron en los productos finales correspondientes a compost (Compost 1, 2, 3 y 6) a excepción de los Compost 4 y 5. En cuanto a las muestras de jardinería, ambas fueron similares con valores en torno a 6 unidades logarítmicas. Los sustratos comerciales fueron diferentes entre ellos, siendo el Sustrato comercial 1 el que mayor cantidad de fijadores de nitrógeno presentó de los dos (7,56 log (UFC/g)) mientras que el Sustrato comercial 2 fue dos unidades más bajo. La prueba de rango múltiple representada en la **Gráfica 7** diferenció las muestras analizadas en 8 grupos, agrupando por un lado a los Compost 2 y 6 y por otro, al Compost 5 con Jardinería 2.

Los valores de microorganismos fijadores obtenidos son mayores a los comentados en trabajos anteriores. Pepe et al. (2013) analizaron diferentes grupos microbianos durante el compostaje de residuos agroindustriales. En lo referente a las bacterias fijadoras de nitrógeno aerobias, detectaron que la carga microbiana inicial (10^6 UFC/g) descendía gradualmente durante las fases termófila y de enfriamiento, aumentando de nuevo al final de la maduración alcanzando valores comprendidos entre las 10^3 UFC/g. El crecimiento se ve limitado por la temperatura, provocando una disminución de la fijación de nitrógeno a partir de los 30 °C. Esta tendencia negativa en el grupo microbiano puede comprometer los niveles de nitrógeno en los productos finales, los cuales suelen tener una concentración más baja que los suelos.



Gráfica 7. Valores obtenidos del análisis cuantitativo de fijadores de nitrógeno.

Parámetro	Suma de cuadrados	GL	Cuadrado medio	F	P
A: Muestra	41,7308	9	4,63676	413,80	0,0000
B: Repetición	0,00659357	2	0,00329678	0,29	0,7486
Residuos	0,201697	18	0,0112054		
Total	41,9391	29			

Tabla 35. Análisis de varianza para los resultados de fijadores de nitrógeno obtenidos en los productos finales, su correspondiente repetición analítica y las interacciones.

GL: Grados de libertad; F: Valor Crítico de la distribución de Fisher; P: Probabilidad (Nivel de significación). Se marcan en rojo los factores significativos.

Repetición	Media LS	Grupos Homogéneos
1	6,17116	A
2	6,18363	A
3	6,20693	A

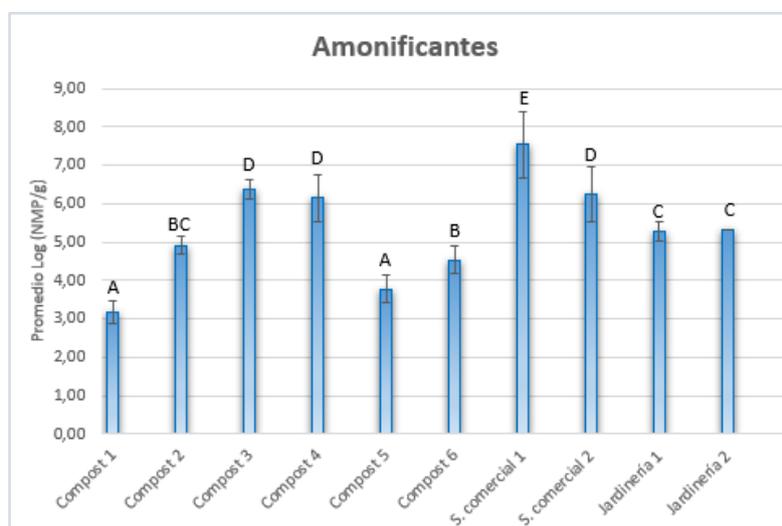
Tabla 36. Análisis de rango múltiple para el factor repetición.

Amonificantes.

Los datos obtenidos y recogidos en la **Gráfica 8** muestran que en todos los compost y en todas las repeticiones en mayor o menor nivel se detectó la presencia de microorganismos amonificantes. Para llevar a cabo la cuantificación de este parámetro, se utilizó la técnica del número más probable (NMP). En un principio, se utilizaron las diluciones -4, -5 y -6 para la lectura. Sin embargo, hubo muestras que tuvieron que ser más diluidas (Compost 3, Compost 4 y ambos sustratos comerciales) debido a que los datos que se obtuvieron con las diluciones mencionadas anteriormente no eran representativos, ya que todos los tubos fueron positivos por la alta carga microbiana y no se ajustaban a los valores de las tablas NMP. Por el contrario, en los Compost 1 y 2 se utilizaron diluciones menores porque todos los tubos fueron negativos.

Concretamente, los resultados obtenidos oscilaron entre 3,17 log (UFC/g) del recuento más bajo obtenido (Compost 1) y 7,54 log (UFC/g) del recuento más alto correspondiente al Sustrato comercial 1. La **Tabla 37** corrobora que existieron diferencias significativas entre las muestras

analizadas. Los valores más altos correspondieron a los Compost 3 y 4 y a los dos sustratos comerciales. En relación con la prueba de rango múltiple efectuada y representada junto a la **Gráfica 8**, los productos finales se agruparon en 6 grupos homogéneos, destacando que las muestras de jardinería se encuentran en el mismo grupo.



Gráfica 8. Resultados obtenidos del análisis de microorganismos amonificantes en las diferentes muestras.

Parámetro	Suma de cuadrados	GL	Cuadrado medio	F	P
A: Muestra	46,3637	9	5,15152	29,59	0,0000
B: Repetición	1,02876	2	0,514382	2,95	0,0777
Residuos	3,13426	18	0,174125		
Total	50,5267	29			

Tabla 37. Análisis de varianza para los valores de microorganismos amonificantes obtenidos en los diferentes muestreos, su correspondiente repetición analítica y las interacciones.

GL: Grados de libertad; F: Valor Crítico de la distribución de Fisher; P: Probabilidad (Nivel de significación). Se marcan en rojo los factores significativos.

Repetición	Media LS	Grupos Homogéneos
2	5,10113	A
3	5,33999	AB
1	5,55451	B

Tabla 38. Análisis de rango múltiple para el factor repetición.

Los valores obtenidos pueden compararse con los de estudios anteriores. Pepe et al. (2013) detectaron una disminución de microorganismos amonificantes desde 6 unidades logarítmicas en los primeros días de compostaje hasta dos unidades logarítmicas menos cuando incrementó la temperatura. En la fase de maduración, se observó un ligero aumento, pero sin alcanzar los valores iniciales probablemente por la falta de fuentes de energía (proteínas y aminoácidos) utilizadas por este grupo microbiano y que determina su predominancia en la fase mesófila. Comparado con los resultados aquí obtenidos, la mayoría de las muestras se encontraron en los valores esperados e incluso una de ellas (Sustrato comercial 1) fue una unidad logarítmica mayor. En cuanto al compost

formado por lodos de depuradora, Zhao et al. (2020) detectó un nivel de amonificantes de 6 unidades logarítmicas. Sin embargo, en este trabajo el valor obtenido fue de la mitad. Esto puede deberse a las diferencias en la composición de los compost. El Compost 1 está conformado por lodos de depuradora y restos de poda, mientras que el utilizado por Zhao et al. (2020) se compone de lodos de depuradora, paja de trigo y sustrato de hongos gastado.

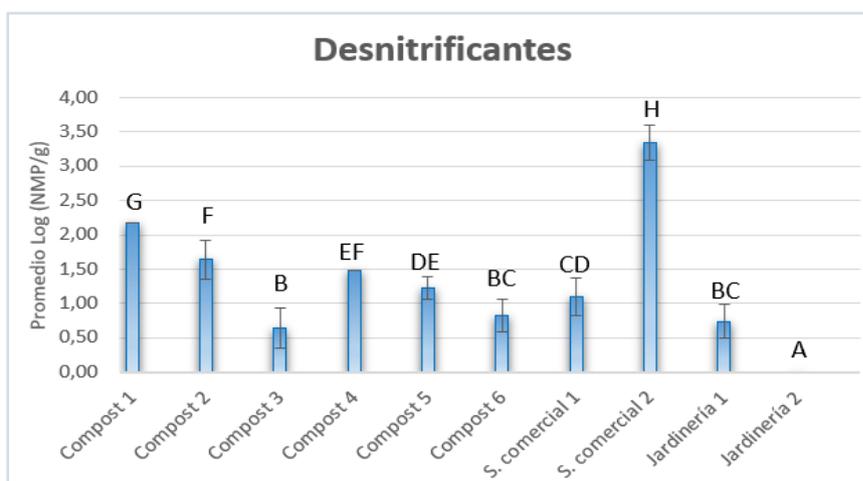
b. Nitrificantes.

En el caso del análisis de microorganismos nitrificantes en los diferentes productos finales, no pudo detectarse la presencia de este grupo microbiano mediante la técnica del número más probable. Las diluciones empleadas (-1, -2 y -3) resultaron en una lectura con todos los tubos negativos, cuyo resultado en el NMP es menor de 3. A pesar de que el proceso de nitrificación ocurre principalmente durante la fase de maduración, las altas temperaturas alcanzadas en las fases anteriores tienen efectos negativos sobre estos microorganismos, concretamente en aquellos encargados de la oxidación del amoníaco (López-González et al., 2013). Pepe et al. (2013) corroboraron este fenómeno observando un descenso desde las 5 unidades logarítmicas en los primeros días de compostaje hasta prácticamente cero según avanza el proceso. En ese mismo estudio, los microorganismos implicados en la oxidación del nitrito presentaron valores de 4 unidades logarítmicas al final del compostaje. Aunque el grupo microbiano de los nitrificantes es importante a la hora de obtener nitrógeno asimilable para las plantas, los nitratos se pierden fácilmente en los suelos por lixiviación.

c. Desnitrificantes.

La **Gráfica 9** recoge los resultados obtenidos del análisis de microorganismos desnitrificantes en los productos finales. A excepción de la muestra Jardinería 2 cuyo valor de la tabla del NMP corresponde a menor de 3, el resto mostraron recuentos en mayor o menor grado. Generalmente, se utilizaron las diluciones -1, -2 y -3 excepto para los Compost 2 y 4 que tuvieron que ser más diluidos debido a que los datos que se obtuvieron con las diluciones anteriormente mencionadas no eran representativos, ya que todos los tubos fueron positivos por la alta carga microbiana y no se ajustaban a los valores de las tablas NMP.

Los resultados obtenidos en el recuento de desnitrificantes oscilaron entre 0,64 log (UFC/g) del recuento más bajo obtenido en el Compost 3 hasta 3,34 log (UFC/g) obtenidos en el Sustrato comercial 2. La **Tabla 39** demuestra que existieron diferencias significativas entre los diferentes productos finales analizados. Generalmente, la mayoría de las muestras presentaron valores aproximados a 1 unidades logarítmicas. Sin embargo, los recuentos en el Compost 1 y en el Sustrato comercial 2 fueron más elevados. Esto resulta una desventaja para dichas muestras debido a que supone una pérdida de nitrógeno en el compost, lo cual ha sido siempre un grave problema para el compostaje (Shi et al., 2020). La presencia de microorganismos desnitrificantes es mayoritaria durante las etapas de enfriamiento y maduración debido al apropiado entorno para su crecimiento. La biodegradación de las fracciones orgánicas de carbono y el contenido de humedad consume una gran cantidad de oxígeno durante las fases anteriores, originando un microambiente anaeróbico favorable para las bacterias desnitrificantes (Zhong et al., 2020). Asimismo, el descenso de la temperatura también resulta favorable (Yang et al., 2020).



Gráfica 9. Valores obtenidos del análisis de microorganismos desnitrificantes en los diferentes productos finales.

Parámetro	Suma de cuadrados	GL	Cuadrado medio	F	P
A: Muestra	23,3619	9	2,59577	57,02	0,0000
B: Repetición	0,0704736	2	0,0352368	0,77	0,4759
Residuos	0,819419	18	0,0455233		
Total	24,2518	29			

Tabla 39. Análisis de varianza para los valores de microorganismos desnitrificantes obtenidos en las diferentes muestras, su correspondiente repetición y las interacciones.

GL: Grados de libertad; F: Valor Crítico de la distribución de Fisher; P: Probabilidad (Nivel de significación). Se marcan en rojo los factores significativos.

Repetición	Media LS	Grupos Homogéneos
1	1,27788	A
2	1,28751	A
3	1,38517	A

Tabla 40. Análisis de rango múltiple para el factor repetición.

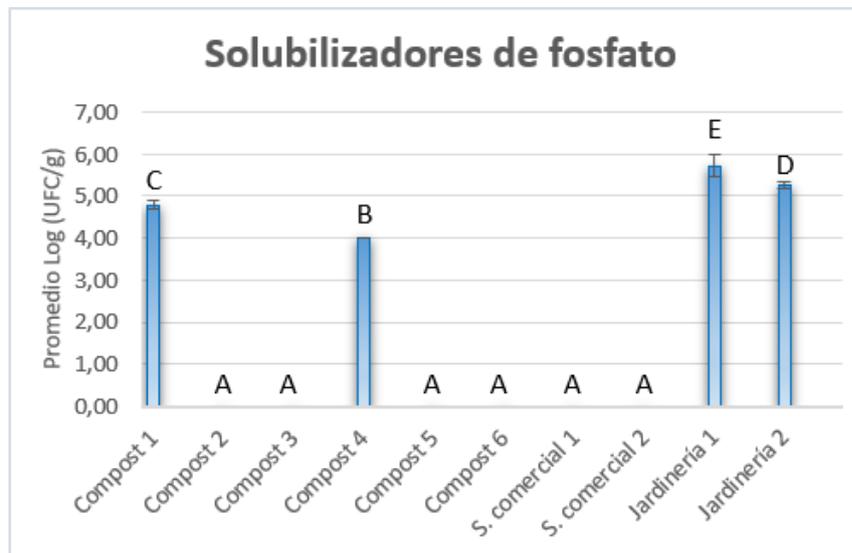
Estudio de la presencia de microorganismos con capacidad biofertilizante

a. Solubilizadores de fosfato.

Los resultados obtenidos de la cuantificación de microorganismos solubilizadores de fosfato quedan recogidos y reflejados en la **Gráfica 10**. Como puede verse, la presencia de este grupo microbiano quedó reducida a pocos de los productos finales y con un recuento de colonias bajo. Solamente se detectaron solubilizadores de fosfato en cuatro de las muestras, cuyos valores oscilaron entre las 4 unidades logarítmicas del Compost 1 hasta prácticamente 6 unidades logarítmicas en Jardinería 1. Asimismo, la **Tabla 41** demuestra que existieron diferencias significativas entre las muestras analizadas y la prueba de rango múltiple (**Gráfica 10**) clasificó los productos finales en cinco grupos homogéneos, cuatro de ellos para cada una de las muestras con resultados positivos. Resulta interesante destacar que en las dos muestras de jardinería estuvo presente dicho grupo microbiano

mientras que en los sustratos comerciales ocurrió todo lo contrario. Con relación a las muestras de compost, solo se obtuvieron resultados positivos en los Compost 1 y 4.

La escasa presencia de microorganismos solubilizadores de fosfato en los productos finales puede relacionarse con la evolución de dicho grupo microbiano a lo largo del proceso de compostaje. Wei et al. (2017) determinaron que estos microorganismos alcanzan su máxima concentración durante la etapa termófila, a partir de la cual los niveles disminuyen hasta el final del compostaje. Igualmente, Wickramatilake et al. (2011) reportaron resultados similares con unos niveles de solubilizadores de fosfato de 4×10^7 UFC/g durante la fase termófila, mientras que en etapas posteriores la cantidad disminuye en uno o incluso dos órdenes de magnitud, lo cual concuerda con los resultados obtenidos en este trabajo.



Gráfica 10. Resultados obtenidos del análisis de microorganismos solubilizadores de fosfato.

Parámetro	Suma de cuadrados	GL	Cuadrado medio	F	P
A: Muestra	181,172	9	20,1303	2278,16	0,0000
B: Repetición	0,0148722	2	0,00743611	0,84	0,4473
Residuos	0,159052	18	0,0088362		
Total	181,346	29			

Tabla 41. Análisis de varianza para los valores de solubilizadores de fosfato en las muestras, su correspondiente repetición analítica y las interacciones.

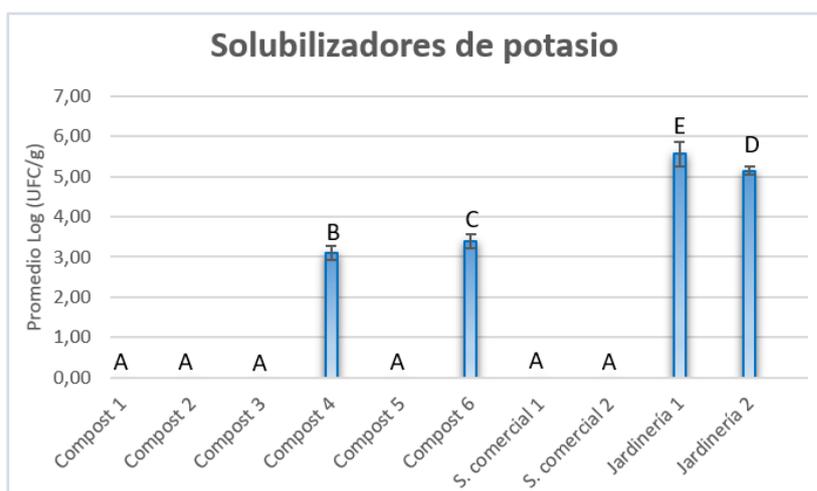
GL: Grados de libertad; F: Valor Crítico de la distribución de Fisher; P: Probabilidad (Nivel de significación). Se marcan en rojo los factores significativos.

Repetición	Media LS	Grupos Homogéneos
1	1,94771	A
2	1,99445	A
3	1,99542	A

Tabla 42. Análisis de rango múltiple para el factor repetición.

b. Solubilizadores de potasio.

La presencia de microbiota solubilizadora de potasio queda representada en la **Gráfica 11**, donde puede observarse que la presencia de este grupo microbiano fue limitada. Solamente se detectaron en cuatro de las muestras, las cuales pueden clasificarse en diferentes grupos homogéneos. Cabe destacar que la detección de solubilizadores de potasio se consiguió en diluciones bajas (-2, -3, -4) y con poca cantidad de colonias en cada uno de los recuentos. Los valores obtenidos oscilaron entre 3,10 log (UFC/g) del Compost 4 y 5,56 log (UFC/g) de Jardinería 1. Además, la **Tabla 43** demuestra que existieron diferencias significativas entre las muestras analizadas. Los productos finales donde se detectó microorganismos solubilizadores de fosfato fueron dos compost compuestos por residuos vegetales (Compost 4 y 6) y las dos muestras de jardinería. Al igual que en el indicador microbiano anteriormente comentado, en ninguno de los sustratos comerciales estuvieron presentes. Sánchez et al. (2017) declararon que entre los microorganismos solubilizadores de potasio se encuentran bacterias, actinobacterias y hongos. El problema de la poca cantidad encontrada en las muestras estudiadas puede deberse a que al igual que ocurre con los microorganismos encargados de solubilizar fosfato, su mayor tasa de crecimiento se encuentre en la etapa termófila.



Gráfica 11. Cuantificación de microorganismos solubilizadores de potasio en los diferentes productos finales.

Parámetro	Suma de cuadrados	GL	Cuadrado medio	F	P
A: Muestra	146,74	9	16,3045	892,09	0,0000
B: Repetición	0,00416258	2	0,00208129	0,11	0,8930
Residuos	0,328979	18	0,0182766		
Total	147,073	29			

Tabla 43. Análisis de varianza para los valores de recuento de solubilizadores de potasio obtenidos en los compost, su correspondiente repetición y las interacciones.

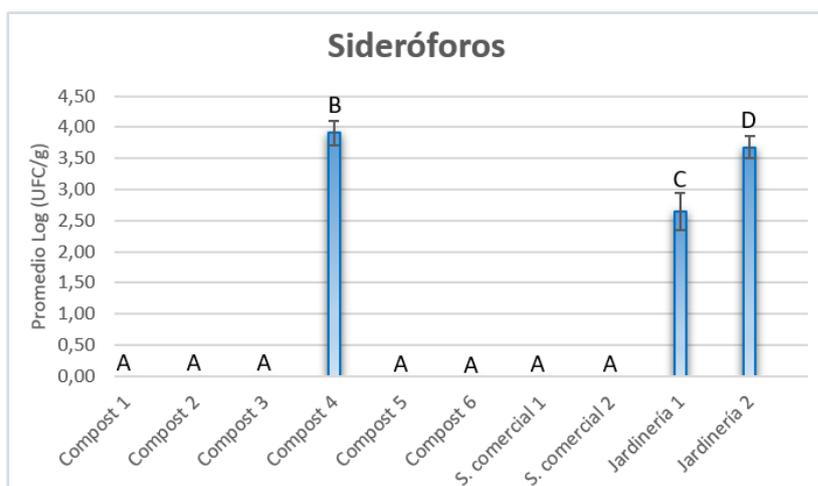
GL: Grados de libertad; F: Valor Crítico de la distribución de Fisher; P: Probabilidad (Nivel de significación). Se marcan en rojo los factores significativos.

Repetición	Media LS	Grupos Homogéneos
1	1,70334	A
2	1,72833	A
3	1,72833	A

Tabla 44. Análisis de rango múltiple para el factor repetición.

c. Producción de sideróforos.

La **Gráfica 12** recoge los resultados obtenidos del análisis de microorganismos productores de sideróforos en las diferentes muestras estudiadas. La presencia de este grupo microbiano fue detectada en tres de los productos finales, correspondientes a Jardinería 1 (2,64 log (UFC/g)), Jardinería 2 (3,68 log (UFC/g)) y el Compost 4 (3,91 log (UFC/g)) (**Figura 6**), cuyos resultados fueron ligeramente menores a los obtenidos en los otros dos indicadores microbianos con capacidad biofertilizante. Estas tres muestras pueden clasificarse en diferentes grupos homogéneos. Asimismo, entre los productos analizados existieron diferencias significativas (**Tabla 45**). Tal y como ocurrió con los microorganismos solubilizadores de potasio, los sideróforos se detectaron en diluciones bajas (-1 y -2) y con un recuento de colonias escaso. Por último, ninguno de los sustratos comerciales presentó microorganismos productores de sideróforos. Realmente, a pesar de que a lo largo de todo el proceso de compostaje existe microbiota encargada de solubilizar hierro, la mayor proporción de esta se detecta durante las fases bio-oxidativas del proceso de compostaje, cuando las temperaturas son más altas (Suárez-Estrella et al., 2019). Posteriormente, el número de especies detectadas es menor.



Gráfica 12. Presencia de microorganismos productores de sideróforos.

Parámetro	Suma de cuadrados	GL	Cuadrado medio	F	P
A: Muestra	75,9972	9	8,44413	497,10	0,0000
B: Repetición	0,00580572	2	0,00290286	0,17	0,8443
Residuos	0,305764	18	0,0169869		
Total	76,3087	29			

Tabla 45. Análisis de varianza para los valores de recuento de sideróforos en los productos finales, su correspondiente repetición y las interacciones.

GL: Grados de libertad; F: Valor Crítico de la distribución de Fisher; P: Probabilidad (Nivel de significación). Se marca en rojo los factores significativos.

Repetición	Media LS	Grupos Homogéneos
1	1,00334	A
2	1,03222	A
3	1,03345	A

Tabla 46. Análisis de rango múltiple para el factor repetición.



Figura 5. Fotografías de microorganismos productores de sideróforos en las diferentes repeticiones de Compost 4.

Una vez estudiados estos tres últimos parámetros, la capacidad biofertilizante de las diferentes muestras puede analizarse. En lo que se refiere a compost, el Compost 4 es el que mayor aptitud biofertilizante presenta. Dicha muestra contiene microorganismos solubilizadores de fosfato, de potasio y productores de sideróforos con niveles similares para los tres indicadores. Además, se trata de un compost bastante completo, ya que presenta el resto de los microorganismos estudiados a lo largo de este trabajo a excepción de los nitrificantes. En relación con los dos sustratos comerciales, ninguno de ellos presenta microbiota con dichas capacidades biofertilizantes. Esto resulta un problema, ya que este tipo de muestras son puestas en el mercado por su capacidad de aportar nutrientes a las plantas y favorecer su crecimiento. Por el contrario, en los dos productos de jardinería existen microorganismos que movilizan estos nutrientes. Encontrar microbiota capaz de llevar a cabo estas acciones en las muestras de jardinería es un indicio de la gran variedad de microorganismos presente en dichos tipos de sustratos, los cuales son fundamentales para mantener jardines y parques.

Los productos finales que contienen microorganismos con capacidad biofertilizante son una alternativa frente al uso de fertilizantes químicos. Igualmente, varios estudios (Bustamante et al., 2016; Estrada-Bonilla et al., 2017; Nishanth y Biswas, 2008) han demostrado que suplementar fósforo y potasio durante el proceso de compostaje incrementa los niveles de estos nutrientes en los productos finales, así como la presencia de microorganismos encargados de movilizarlos. Otra de las alternativas para mejorar la disponibilidad de estos elementos consiste en aplicar de manera conjunta compost e inóculos de bacterias promotoras del crecimiento y hongos micorrízicos arbusculares (Anli et al., 2020).

4.3. Estudio de la correlación entre las diferentes variables analizadas.

Bacterias mesófilas	X	0,76	0,51	0,43	X	X	X	X	0,55	0,59	X
Bacterias termófilas		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Hongos mesófilos			0,77	0,81	0,42	X	0,47	0,55	0,70	0,72	X
Hongos termófilos				0,68	0,81	X	X	0,43	0,59	0,65	X
Actinobacterias mesófilas					0,47	0,43	0,64	0,80	0,62	0,64	-0,47
Actinobacterias termófilas						X	X	X	X	0,45	X
Fijadores de nitrógeno							0,69	0,75	X	X	X
Amonificantes								0,77	0,42	X	-0,58
Desnitrificantes									0,60	X	X
Solubilizadores de fosfato										0,38	X
Solubilizadores de potasio											X
	Bacterias termófilas	Hongos mesófilos	Hongos termófilos	Actinobacterias mesófilas	Actinobacterias termófilas	Fijadores de nitrógeno	Amonificantes	Desnitrificantes	Solubilizadores de fosfato	Solubilizadores de potasio	Sideróforos

Tabla 47. Análisis de correlación de Spearman para las diferentes variables estudiadas en las muestras. La escala de color indica el índice de correlación de los parámetros desde los correlacionados negativamente (azul oscuro) hasta aquellos cuya correlación es positiva (rojo oscuro). El valor X indica que la correlación entre esos dos parámetros no es significativa.

Tal y como se mencionó en Materiales y Métodos, los parámetros analizados en las diferentes muestras fueron sometidos a un análisis multivariado con la finalidad de estudiar si existen o no asociaciones entre ellos a través de un gráfico de correlación de Spearman (**Tabla 47**) y obtener una mayor comprensión de los resultados obtenidos a lo largo de este trabajo fin de grado.

En el gráfico de Spearman pueden observarse correlaciones tanto positivas como negativas. En el caso de aquellos correlacionados positivamente, pueden destacarse algunos que pueden resultar de interés para entender la presencia de los diferentes grupos microbianos en los productos finales:

- La presencia de microorganismos solubilizadores de fosfato y potasio está relacionada con la presencia de hongos y actinobacterias mesófilas (relación de 0,70 y 0,62 respectivamente para los solubilizadores de fosfato y de 0,72 y 0,64 respectivamente en el caso de los de potasio), los cuales pueden ser los involucrados en la solubilización de estos nutrientes que se detectaron en las muestras. Sin embargo, cabe destacar que a su vez están correlacionados con hongos termófilos (relación de 0,59 y 0,65 respectivamente), corroborando la información obtenida en bibliografía (Wei et al., 2017) en la que se indica que la mayor solubilización de fosfato ocurre durante la etapa termófila.
- Existe relación entre las actinobacterias mesófilas con los microorganismos amonificantes (correlación de 0,64) y desnitrificantes (correlación de 0,80), lo que da lugar a pensar que son el principal grupo encargado de llevar a cabo estos procesos.
- Los niveles de fijadores de nitrógeno se relacionan de manera positiva con amonificantes y desnitrificantes (índices de correlación de 0,69 y 0,75 respectivamente), indicando que estos microorganismos interactúan unos con otros llevando a cabo el ciclo biogeoquímico del nitrógeno durante el compostaje.

En lo referente a los parámetros correlacionados de manera negativa, el análisis solo mostró dos casos, indicando que la presencia de actinobacterias mesófilas y microorganismos amonificantes afecta a los niveles de sideróforos encontrados en los productos finales (índice de correlación de -0,47 y -0,58 respectivamente). Como se ha mencionado en apartados anteriores, las actinobacterias mesófilas están presentes en las últimas etapas del compostaje, lo que puede relacionarse con los bajos niveles de sideróforos obtenidos en las muestras.

En resumen, la presencia de diferentes grupos microbianos a lo largo del proceso de compostaje concluye con la formación de un producto estable en el cual predominan una serie de microorganismos. Las diferencias encontradas entre las muestras analizadas permiten evaluar cuál de ellas resulta más adecuada como producto biofertilizante. Asimismo, existen grupos microbianos cuya implicación en la movilización de nutrientes es más importante que en otros.

5. Conclusiones

- 1- Los compost analizados en el presente estudio contuvieron una microbiota rica y diversa constituida por bacterias, de las que las actinobacterias constituyen un pilar fundamental y hongos que se desarrollaron tanto en condiciones mesófilas como termófilas, debido a la alta termotolerancia del microbioma del compostaje.
- 2- Los microorganismos amonificantes y las bacterias fijadoras de nitrógeno son los principales representantes del ciclo biogeoquímico del nitrógeno en los productos finales, resultando importantes a la hora de obtener formas de nitrógeno asimilables para los cultivos. El grupo de los desnitrificantes estuvo menos presente que los anteriores en la mayoría de las muestras, evitando así una pérdida excesiva de nitrógeno, problema grave del compost.
- 3- Pese a la importancia de los microorganismos solubilizadores de fosfato, potasio y hierro a la hora de movilizar estos nutrientes, su presencia en los productos finales es limitada. Dicho fenómeno se debe a que estos microorganismos están relacionados con las fases bio-oxidativas del compostaje. Sin embargo, existe microbiota mesófila capaz de llevar a cabo estas actividades.
- 4- Las muestras de jardinería comprenden aquellas con mayor capacidad biofertilizante, debido a la gran presencia de microorganismos solubilizadores de fosfato, solubilizadores de potasio y productores de sideróforos, consecuencia de la diversidad de microorganismos presentes en este tipo de productos. Por el contrario, los sustratos comerciales no presentaron microorganismos con estas capacidades, lo que supone una desventaja a la hora de comercializarlos.
- 5- De entre todas las muestras de compost, el Compost 4 fue el que mayor aptitud biofertilizante presenta. A su vez, se trata de un compost bastante completo, el cual contuvo todos los microorganismos beneficiosos estudiados a lo largo del trabajo y el que mayor nivel poblacional presentó.

6. Bibliografía

- Álvarez-Vera, M., Largo, A., Iglesias-Abad, S., & Castillo, J. (2019). Quality of compost obtained from hen manure, with application of beneficial microorganisms. *Scientia Agropecuaria*, 10(3), 353–361. <https://doi.org/10.17268/sci.agropecu.2019.03.05>
- Anli, M., Baslam, M., Tahiri, A., Raklami, A., Symanczik, S., Boutasknit, A., Ait-El-Mokhtar, M., Ben-Laouane, R., Toubali, S., Ait Rahou, Y., Ait Chitt, M., Oufdou, K., Mitsui, T., Hafidi, M., & Meddich, A. (2020). Biofertilizers as Strategies to Improve Photosynthetic Apparatus, Growth, and Drought Stress Tolerance in the Date Palm. *Frontiers in Plant Science*, 11(October). <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.516818>
- Asadu, C. O., Ike, I. S., Onu, C. E., Egbuna, S. O., Onoh, M. I., Mbah, G. O., & Eze, C. N. 2020. Investigation of the influence of biofertilizer synthesized using microbial inoculums on the growth performance of two agricultural crops. *Biotechnology Reports* 27, e00493. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2020.e00493>
- Awasthi, S. K., Sarsaiya, S., Awasthi, M. K., Liu, T., Zhao, J., Kumar, S., & Zhang, Z. 2020. Changes in global trends in food waste composting: Research challenges and opportunities. *Bioresource Technology* 299, 122555. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.122555>
- Bahadur, I., Meena, V. S., & Kumar, S. 2014. Importance and application of potassic biofertilizer in indian agriculture. *Research Journal of Chemical Sciences* 3(12), 80-85.
- Belyaeva, O. N., Haynes, R. J., & Sturm, E. C. 2012. Chemical, physical and microbial properties and microbial diversity in manufactured soils produced from co-composting green waste and biosolids. *Waste Management* 32(12), 2248–2257. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2012.05.034>
- Bian, B., Hu, X., Zhang, S., Lv, C., Yang, Z., Yang, W., & Zhang, L. 2019. Pilot-scale composting of typical multiple agricultural wastes: Parameter optimization and mechanisms. *Bioresource Technology* 287, 121482. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.121482>
- Bonito, G., Isikhuemhen, O. S., & Vilgalys, R. 2010. Identification of fungi associated with municipal compost using DNA-based techniques. *Bioresource Technology* 101(3), 1021–1027. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.08.109>
- Bustamante, M. A., Ceglie, F. G., Aly, A., Mihreteab, H. T., Ciaccia, C., & Tittarelli, F. 2016. Phosphorus availability from rock phosphate: Combined effect of green waste composting and sulfur addition. *Journal of Environmental Management* 182, 557-563. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2016.08.016>
- Chroni, C., Kyriacou, A., Manios, T., & Lasaridi, K.E. 2009. Investigation of the microbial community structure and activity as indicators of compost stability and composting process evolution. *Bioresource Technology* 100(15), 3745-3750. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2008.12.016>

- Duo, L. A., Liu, C. X., & Zhao, S. L. 2018. Alleviation of drought stress in turfgrass by the combined application of nano-compost and microbes from compost. *Russian Journal of Plant Physiology* 65(3), 419-426. <https://doi.org/10.1134/S102144371803010X>
- Enwall, K., Philippot, L., & Hallin, S. 2005. Activity and composition of the denitrifying bacterial community respond differently to long-term fertilization. *Applied and Environmental Microbiology* 71(12), 8335-8343. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.12.8335-8343.2005>
- Estrada-Bonilla, G. A., Lopes, C. M., Durrer, A., Alves, P. R. L., Passaglia, N., & Cardoso, E. J. B. N. 2017. Effect of phosphate-solubilizing bacteria on phosphorus dynamics and the bacterial community during composting of sugarcane industry waste. *Systematic and Applied Microbiology* 40(5), 308-313. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2017.05.003>
- Estrella-González, M. J., Jurado, M. M., Suárez-Estrella, F., López, M. J., López-González, J. A., Siles-Castellano, A., & Moreno, J. 2019. Enzymatic profiles associated with the evolution of the lignocellulosic fraction during industrial-scale composting of anthropogenic waste: Comparative analysis. *Journal of Environmental Management* 248, 109312. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2019.109312>
- Estrella-González, M. J., López-González, J. A., Suárez-Estrella, F., López, M. J., Jurado, M. M., Siles-Castellano, A. B., & Moreno, J. 2020a. Evaluating the influence of raw materials on the behavior of nitrogen fractions in composting processes on an industrial scale. *Bioresource Technology* 303, 122945. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.122945>
- Estrella-González, M. J., Suárez-Estrella, F., Jurado, M. M., López, M. J., López-González, J. A., Siles-Castellano, A. B., Muñoz-Mérida, A., & Moreno, J. 2020b. Uncovering new indicators to predict stability, maturity and biodiversity of compost on an industrial scale. *Bioresource Technology* 313, 123557. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.123557>
- Geethamani, R., Soundara, B., Kanmani, S., Jayanthi, V., Subaharini, T. R., Sowbiyalakshmi, V., & Sowmini, C. 2020. Production of cost affordable organic manure using institutional waste by rapid composting method. *Materials Today: Proceedings* S2214785320315935. <https://doi.org/10.1016/j.matpr.2020.02.803>
- Ghosh, S. K., Bera, T., & Chakrabarty, A. M. 2020. Microbial siderophore - A boon to agricultural sciences. *Biological Control* 144, 104214. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2020.104214>
- Goyal, S., Dhull, S., & Kapoor, K. 2005. Chemical and biological changes during composting of different organic wastes and assessment of compost maturity. *Bioresource Technology* 96(14), 1584-1591. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2004.12.012>
- Hassen, A., Belguith, K., Jedidi, N., Cherif, A., Cherif, M., & Boudabous, A. 2001. Microbial characterization during composting of municipal solid waste. *Bioresource Technology* 80(3), 217-225. [https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(01\)00065-7](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(01)00065-7)
- Insam, H., & de Bertoldi, M. 2007. Microbiology of the composting process. L.F. Díaz, M. de Bertoldi, W. Bidlingmaier, E. Stentiford (Eds.), *Waste Management Series No. 8, Compost*

- Science and Technology, Elsevier, Amsterdam, pp. 25-48. [https://doi.org/10.1016/S1478-7482\(07\)80006-6](https://doi.org/10.1016/S1478-7482(07)80006-6)
- Jiang, Z., Lu, Y., Xu, J., Li, M., Shan, G., & Li, Q. 2019. Exploring the characteristics of dissolved organic matter and succession of bacterial community during composting. *Bioresource Technology* 292, 121942. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.121942>
- Jurado, M., Suárez-Estrella, F., Vargas-García, M. C., López, M. J., López-González, J. A., & Moreno, J. 2014a. Evolution of enzymatic activities and carbon fractions throughout composting of plant waste. *Journal of Environmental Management* 133, 355–364. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2013.12.020>
- Jurado, M., López, M. J., Suárez-Estrella, F., Vargas-García, M. C., López-González, J. A., & Moreno, J. 2014b. Exploiting composting biodiversity: Study of the persistent and biotechnologically relevant microorganisms from lignocellulose-based composting. *Bioresource Technology* 162, 283-293. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.03.145>
- Jurado, M., Suárez-Estrella, F., Vargas-García, M. C., López, M. J., López-González, J. A., & Moreno, J. 2014c. Increasing native microbiota in lignocellulosic waste composting: Effects on process efficiency and final product maturity. *Process Biochemistry* 49(11), 1958–1969. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2014.08.003>
- Jurado, M., Suárez-Estrella, F., López, M. J., Vargas-García, M. C., López-González, J. A., & Moreno, J. 2015. Enhanced turnover of organic matter fractions by microbial stimulation during lignocellulosic waste composting. *Bioresource Technology* 186, 15-24. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.03.059>
- Jurado, M. M., Camelo-Castillo, A. J., Suárez-Estrella, F., López, M. J., López-González, J. A., Estrella-González, M. J., Síles-Castellano, A. B., & Moreno, J. 2020. Integral approach using bacterial microbiome to stabilize municipal solid waste. *Journal of Environmental Management* 265, 110528. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2020.110528>
- Khalil, A. I., Hassouna, M. S., El-Ashqar, H. M. A., & Fawzi, M. 2011. Changes in physical, chemical and microbial parameters during the composting of municipal sewage sludge. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 27(10), 2359-2369. <https://doi.org/10.1007/s11274-011-0704-8>
- López-González, J. A., López, M. J., Vargas-García, M. C., Suarez-Estrella, F., Jurado, M., & Moreno, J. 2013. Tracking organic matter and microbiota dynamics during the stages of lignocellulosic waste composting. *Bioresource Technology* 146, 574–584. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.07.122>
- López-González, J. A., Suárez-Estrella, F., Vargas-García, M. C., López, M. J., Jurado, M. M., & Moreno, J. 2015. Dynamics of bacterial microbiota during lignocellulosic waste composting: Studies upon its structure, functionality and biodiversity. *Bioresource Technology* 175, 406–416. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.10.123>

- Martínez-Espinosa, R. M. 2020. Microorganisms and their metabolic capabilities in the context of the biogeochemical nitrogen cycle at extreme environments. *International Journal of Molecular Sciences* 21(12), 4228. <https://doi.org/10.3390/ijms21124228>
- Melis, P., & Castaldi, P. 2004. Thermal analysis for the evaluation of the organic matter evolution during municipal solid waste aerobic composting process. *Thermochimica Acta* 413(1-2), 209-214. <https://doi.org/10.1016/j.tca.2003.09.026>
- Montoya, S., Ospina, D. A., & Sánchez, Ó. J. 2020. Evaluation of the Physical–Chemical and Microbiological Characteristics of the Phospho-Compost Produced Under Forced Aeration System at the Industrial Scale. *Waste and Biomass Valorization* 11(11), 5977–5990. <https://doi.org/10.1007/s12649-019-00813-8>
- Moreno, J., López-González, J. A., Arcos-Nievas, M. A., Suárez-Estrella, F., Jurado, M. M., Estrella-González, M. J., & López, M. J. 2021. Revisiting the succession of microbial populations throughout composting: A matter of thermotolerance. *Science of The Total Environment* 773, 145587. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.145587>
- Moreno, J. y Mormeneo, S. 2011. Microbiología y bioquímica del proceso de compostaje. En: Moreno, J. y Moral, R. Compostaje. pp. 111-140. Mundi-prensa, Madrid.
- Nakasaki, K., Hirai, H., Mimoto, H., Quyen, T. N. M., Koyama, M., & Takeda, K. 2019. Succession of microbial community during vigorous organic matter degradation in the primary fermentation stage of food waste composting. *Science of The Total Environment* 671, 1237-1244. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.03.341>
- Nishanth, D., & Biswas, D. R. 2008. Kinetics of phosphorus and potassium release from rock phosphate and waste mica enriched compost and their effect on yield and nutrient uptake by wheat (*Triticum aestivum*). *Bioresource Technology* 99(9), 3342-3353. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2007.08.025>
- Pepe, O., Ventorino, V., & Blaiotta, G. 2013. Dynamic of functional microbial groups during mesophilic composting of agro-industrial wastes and free-living (N₂)-fixing bacteria application. *Waste Management* 33(7), 1616-1625. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2013.03.025>
- Radzki, W., Gutierrez Mañero, F. J., Algar, E., Lucas García, J. A., García-Villaraco, A., & Ramos Solano, B. 2013. Bacterial siderophores efficiently provide iron to iron-starved tomato plants in hydroponics culture. *Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology* 104(3), 321–330. <https://doi.org/10.1007/s10482-013-9954-9>
- Rastogi, M., Nandal, M., & Khosla, B. 2020. Microbes as vital additives for solid waste composting. *Heliyon* 6(2), e03343. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e03343>
- 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.

- Sánchez, Ó. J., Ospina, D. A., & Montoya, S. 2017. Compost supplementation with nutrients and microorganisms in composting process. *Waste Management* 69(26), 136–153. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2017.08.012>
- Sánchez San Fulgencio, N., Suárez-Estrella, F., López, M. J., Jurado, M. M., López-González, J. A., & Moreno, J. 2018. Biotic aspects involved in the control of damping-off producing agents: The role of the thermotolerant microbiota isolated from composting of plant waste. *Biological Control* 124, 82-91. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2018.04.015>
- Sandhya, V., Ali, Sk. Z., Grover, M., Reddy, G., & Venkateswarlu, B. (2010). Effect of plant growth promoting *Pseudomonas* spp. On compatible solutes, antioxidant status and plant growth of maize under drought stress. *Plant Growth Regulation* 62(1), 21-30. <https://doi.org/10.1007/s10725-010-9479-4>
- Shen, T., Lei, Y., Pu, X., Zhang, S., & Du, Y. 2021. Identification and application of *Streptomyces microflavus* G33 in compost to suppress tomato bacterial wilt disease. *Applied Soil Ecology* 157, 103724. . <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2020.103724>
- Shi, M., Zhao, Y., Zhu, L., Song, X., Tang, Y., Qi, H., Cao, H., & Wei, Z. 2020. Denitrification during composting: Biochemistry, implication and perspective. *International Biodeterioration & Biodegradation* 153, 105043. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2020.105043>
- Siles-Castellano, A. B., López, M. J., López-González, J. A., Suárez-Estrella, F., Jurado, M. M., Estrella-González, M. J., & Moreno, J. 2020a. Comparative analysis of phytotoxicity and compost quality in industrial composting facilities processing different organic wastes. *Journal of Cleaner Production* 252, 119820. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2019.119820>
- Siles-Castellano, A. B., López, M. J., Jurado, M. M., Suárez-Estrella, F., López-González, J. A., Estrella-González, M. J., & Moreno, J. 2020b. Industrial composting of low carbon/nitrogen ratio mixtures of agri-food waste and impact on compost quality. *Bioresource Technology* 316, 123946. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.123946>
- Suárez-Estrella, F., Jurado, M. M., López, M. J., López-González, J. A., & Moreno, J. 2019. Role of bacteria isolated from a plant waste-based compost producing bioactive substances in the control of bacterial spot syndrome caused by *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology* 20, 101198. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2019.101198>
- Tortarolo, M. F., Pereda, M., Palma, M., & Arrigo, N. M. 2008. Influencia de la inoculación de microorganismos sobre la temperatura en el proceso de compostaje. *Ciencia Del Suelo* 26(1), 41-50.
- van Ewijk, S., & Stegemann, J. A. 2020. Recognising waste use potential to achieve a circular economy. *Waste Management* 105, 1-7. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2020.01.019>

- van Heerden, I., Cronjé, C., Swart, S. H., & Kotzé, J. M. 2002. Microbial, chemical and physical aspects of citrus waste composting. *Bioresource Technology* 81(1), 71-76. [https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(01\)00058-X](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(01)00058-X)
- Vargas-Garcia, M. D., Suárez-Estrella, F., López, M. J., & Moreno, J. 2006. Influence of microbial inoculation and co-composting material on the evolution of humic-like substances during composting of horticultural wastes. *Process Biochemistry* 41(6), 1438-1443. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2006.01.011>
- Voběrková, S., Maxianová, A., Schlosserová, N., Adamcová, D., Vršanská, M., Richtera, L., Gagić, M., Zloch, J., & Vaverková, M. D. 2020. Food waste composting - Is it really so simple as stated in scientific literature? - A case study. *Science of The Total Environment* 723, 138202. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.138202>
- Wei, H., Wang, L., Hassan, M., & Xie, B. 2018. Succession of the functional microbial communities and the metabolic functions in maize straw composting process. *Bioresource Technology* 256, 333–341. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.02.050>
- Wei, Y., Zhao, Y., Fan, Y., Lu, Q., Li, M., Wei, Q., Zhao, Y., Cao, Z., & Wei, Z. 2017. Impact of phosphate-solubilizing bacteria inoculation methods on phosphorus transformation and long-term utilization in composting. *Bioresource Technology* 241, 134-141. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.05.099>
- Wickramatilake, A. R. P., Munehiro, R., Nagaoka, T., Wasaki, J., & Kouno, K. 2011. Compost amendment enhances population and composition of phosphate solubilizing bacteria and improves phosphorus availability in granitic regosols. *Soil Science and Plant Nutrition* 57(4), 529-540. <https://doi.org/10.1080/00380768.2011.600243>
- Wu, S. C., Cao, Z. H., Li, Z. G., Cheung, K. C., & Wong, M. H. 2005. Effects of biofertilizer containing N-fixer, P and K solubilizers and AM fungi on maize growth: A greenhouse trial. *Geoderma* 125(1–2), 155-166. <https://doi.org/10.1016/j.geoderma.2004.07.003>
- Yang, Y., Kumar Awasthi, M., Wu, L., Yan, Y., & Lv, J. 2020. Microbial driving mechanism of biochar and bean dregs on NH₃ and N₂O emissions during composting. *Bioresource Technology* 315, 123829. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.123829>
- Zhao, Y., Li, W., Chen, L., Meng, L., & Zheng, Z. 2020. Effect of enriched thermotolerant nitrifying bacteria inoculation on reducing nitrogen loss during sewage sludge composting. *Bioresource Technology* 311, 123461. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.123461>
- Zhong, X., Z., Zeng, Y., Wang, S.-P., Sun, Z.-Y., Tang, Y.-Q., & Kida, K. 2020. Insight into the microbiology of nitrogen cycle in the dairy manure composting process revealed by combining high-throughput sequencing and quantitative PCR. *Bioresource Technology* 301, 122760. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.122760>
- Zhu, L., Wei, Z., Yang, T., Zhao, X., Dang, Q., Chen, X., Wu, J., & Zhao, Y. 2020. Core microorganisms promote the transformation of DOM fractions with different molecular weights to improve

the stability during composting. *Bioresource Technology* 299, 122575.
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.122575>