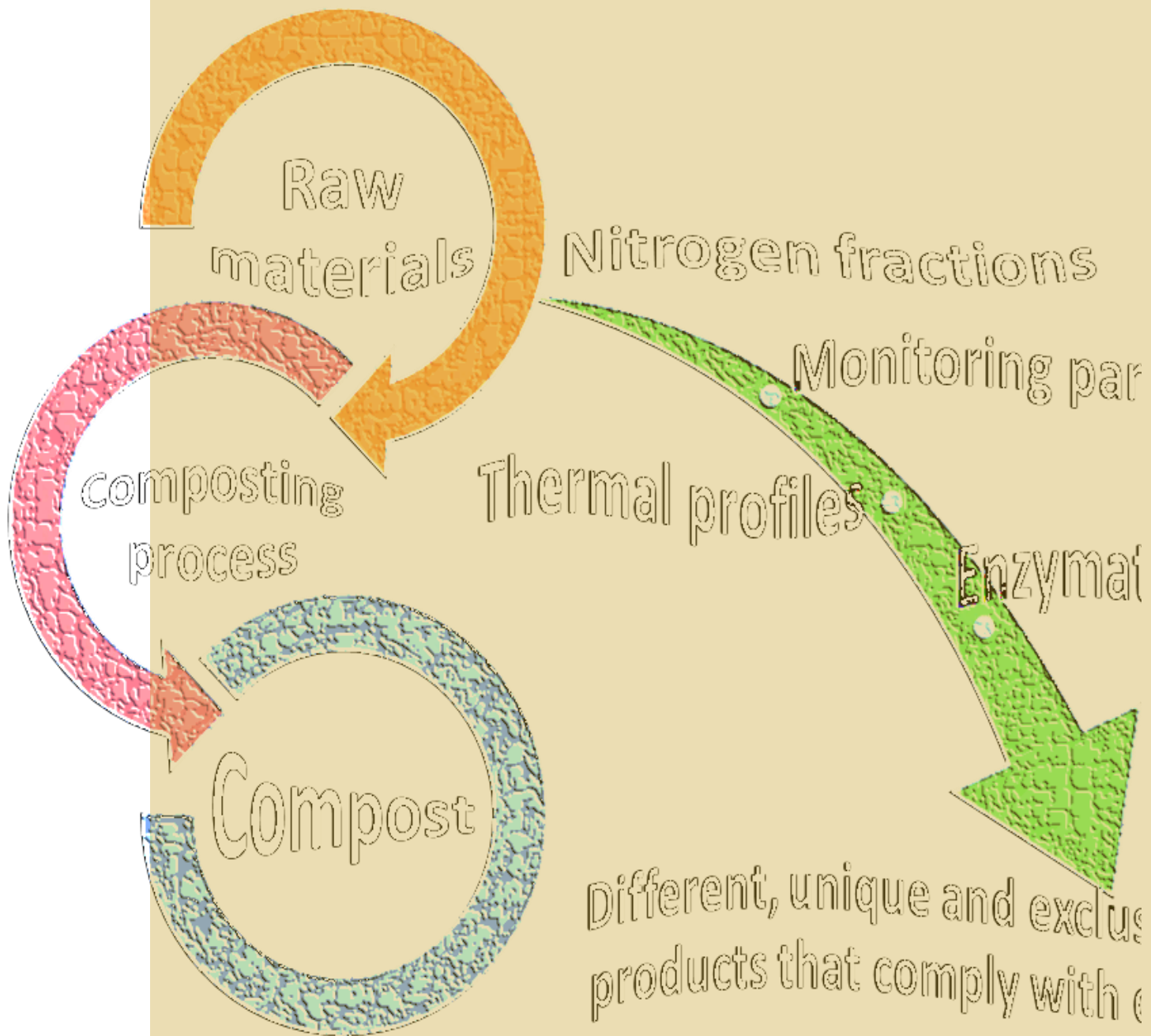


Tesis Doctoral



Estudio Comparativo del Proceso de Compostaje a Escala Industrial: Análisis Metagenómico y Vinculación con los Parámetros Críticos de Control del Proceso

María José Estrella González

Octubre de 2020



UNIVERSIDAD DE ALMERÍA

DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA Y GEOLOGÍA

PROGRAMA DE CIENCIAS APLICADAS AL MEDIO AMBIENTE

**"ESTUDIO COMPARATIVO DEL PROCESO DE COMPOSTAJE
A ESCALA INDUSTRIAL: ANÁLISIS METAGENÓMICO Y
VINCULACIÓN CON LOS PARÁMETROS CRÍTICOS DE
CONTROL DEL PROCESO"**

María José Estrella González

Tesis Doctoral. Almería, Octubre de 2020

UNIVERSIDAD DE ALMERÍA
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA Y GEOLOGÍA

PROGRAMA DE CIENCIAS APLICADAS AL MEDIO AMBIENTE

**ESTUDIO COMPARATIVO DEL PROCESO DE COMPOSTAJE A
ESCALA INDUSTRIAL: ANÁLISIS METAGENÓMICO Y VINCULACIÓN
CON LOS PARÁMETROS CRÍTICOS DE CONTROL DEL PROCESO.**

**COMPARATIVE STUDY OF THE INDUSTRIAL SCALE COMPOSTING
PROCESS: METAGENOMIC ANALYSIS AND LINKAGE WITH CRITICAL
CONTROL PARAMETERS.**

MEMORIA PARA OBTENER EL GRADO DE DOCTOR

Fdo.: María José Estrella González

Fdo.: Joaquín Moreno Casco
Catedrático de Universidad
Universidad de Almería

Fdo.: Francisca Suárez Estrella
Profesora Titular de Universidad
Universidad de Almería

LA PRESENTE TESIS DOCTORAL INCLUYE RESULTADOS OBTENIDOS DURANTE LA REALIZACIÓN DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN “ESTUDIO COMPARATIVO DEL MICROBIOMA DEL COMPOSTAJE: METAGENOMICA, ANALISIS FUNCIONAL Y VINCULACION CON LOS PARAMETROS CRITICOS DE CONTROL DEL PROCESO” SUBVENCIONADO POR LA DIRECCIÓN GENERAL DE PROGRAMAS Y TRANSFERENCIA DE CONOCIMIENTO DEL MINISTERIO DE ECONOMÍA Y COMPETITIVIDAD (AGL2015-64512-R)

AGRADECIMIENTOS

“Por encima de todo, mi vida es la investigación”. Creo que no hay frase que pueda definirme mejor. La investigación para mi no es un simple trabajo, o un mero medio con el que conseguir dinero. La vocación es algo esencial en profesiones como esta, donde no existe horario y donde, tras duros meses de trabajo, los resultados obtenidos pueden pasar a ser hojas en sucio, por eso es tan importante estar rodeado de motivación y positividad y, por suerte, durante estos años he estado rodeada de personas maravillosas, que han sabido ver siempre lo positivo de cada momento. Estaría mintiendo si dijera que después de tantos años no os considero como “mi familia microbiológica”. No sé qué me deparará el futuro, pero sí tengo claro que siempre os llevaré en mi corazón.

Me conformaría con tener una décima parte de los conocimientos que posee Joaquín Moreno. Dicen que la experiencia es un grado y, desde luego, a pocas personas he conocido como él. Siempre tiene una solución para todo, siempre está dispuesto a escucharte y a aconsejarte. Por desgracia no ha sido uno de mis profesores durante la carrera, pero he tenido la suerte de asistir a varias de sus charlas y poder comprobar por mí misma que se quedaban cortos con lo que me contaban. Me siento muy afortunada de tener a Joaquín Moreno Casco como mi mentor. No existen suficientes palabras en el diccionario de la R.A.E. para explicar lo agradecida que estoy por aquel día que entré a formar parte de mi pequeña microfamilia. Gracias porque, a día de hoy, sigo sintiendo que confías en mí.

De ella puedo decir infinidad de cosas, ya que compartimos algo más que trabajo. Ha sabido ubicarme a cada momento en el que me iba diluyendo, cual medicamento homeopático. Hemos descubierto juntas el apasionante mundo de los índices de biodiversidad y la metagenómica. Sin duda, de ti he aprendido la paciencia, el saber estar y la constancia. Paqui decirte solo gracias sería quedarme corta, al igual que me ocurre con María José. Cuando acabé la carrera no sabía muy bien donde ubicarme y decidí buscar en la página de la UAL. Fuiste la primera persona con la que contacté. Admiro tu dedicación, tu capacidad de llevar mil cosas a la vez y tu capacidad de resolución. Sois un claro ejemplo a seguir.

Me enseñaste todo lo que se a nivel de laboratorio, soy tu pequeña “padawan”. Has aguantado mi humor negro, mi terquedad y mi cara de “no me entero de nada”. Nuestro viaje a Glasgow con mi inglés “rajoniano”. Por un lado, “hiperemocionada” pensado en visitar un sitio nuevo, un congreso a nivel europeo, y por otro, con mil miedos, aunque en el fondo pensaba: “Macarena sabe bastante más inglés que yo, sino quizás termine debajo de un puente”. Aunque nuestros caminos se han separado un poco, siempre serás una de las personas más importantes.

Por motivos de la vida, te conocí más tarde que a los demás, pero ya sabía quien eras, Almería es demasiado pequeña. A pesar de lo que piense el resto, la magia de nuestra relación siempre ha sido que no nos hemos callado ni una y, a pesar de todo, cuando necesitamos ayuda el uno del otro siempre estamos ahí para echarnos una mano. Es raro no ver a Juan con una risa en la cara, y eso siempre se contagia. Cada vez estás más cerca de conseguir tus sueños, y espero poder estar ahí para seguir dándote el tostón como siempre.

A veces, a lo largo de la vida, tenemos la suerte de coincidir con gente maravillosa. He de decir que he sido muy afortunada. Con Isa Belda compartí aventura empresarial y aventura de laboratorio. Horarios de ocho a ocho, donde podíamos con todo, y siempre teníamos anécdotas que contar. Si algo me enseñaron, es que los sueños siempre se pueden cumplir. Enrique y Nieves un referente de que la edad es solo un número y de que hay que luchar por lo que uno realmente quiere. Ana "S", con sus locuras, sus frases que te dejan sin palabras, y su hiperactividad natural. Ana "T", quien tiene siempre algo de lo que hablar, un consejo sobre cualquier cosa, y siempre divina. María R. ¿qué puedo decir de ella?. Doña agobios (de forma cariñosa), trabajadora como ella sola, tenaz, insistente, una gran confidente y un gran hombro en el que apoyarse cuando parece que el mundo se cae. Y nuestra gran incorporación, Jesús, el chico de la risa eterna, que llena de felicidad el laboratorio. Tantas anécdotas en congresos, en comidas e incluso por whatsapp, que serían imposibles de olvidar. Gracias, gracias y mil gracias, hacéis que cada día sea único.

En su momento, fue ella el soporte del laboratorio, lo llevaba todo para adelante, y parecía tan sencillo desde la barrera... Me acuerdo tanto de ti Marisol, una persona tan competente, eficaz, ejemplar... Luego apareció María del Mar, con sus inmensas ganas de hablar y de no parar. No puede estar sentada dos segundos, como suelen decir, es una polvorilla. No te he dado suficiente las gracias por todo el trabajo que durante estos años me has ahorrado. Humilde, sencilla y de buen corazón, ¿qué mejor compañera de laboratorio se podría pedir?.

No toda mi vida laboral se resume a Almería. Tuve la gran suerte de poder ir a Porto, con una estancia de investigación. Ciudad que me tiene enamorada. Dar con gente tan competente como Antonio Muñoz Mérida es complicado, especialmente en temas tan complejos como la bioinformática. Casi medio año de mi vida pasé allí. Me llevé grandes recuerdos de CIBIO, por supuesto de Antonio, pero también tuve la suerte de coincidir con Lucia, Javi y Ángeles. Gracias por hacer más ameno vivir fuera de casa.

Formasteis parte de la primera promoción de Biotecnología y, sin duda, os marchasteis dejando una huella muy grande. Laura López, con su felicidad infinita y

su monería intrínseca. Dani, el “viejo ven” del grupo, con su hipocondría característica. Rous, con su “acentazo” sevillano, alegrando el día y siempre con sus mil historias que contar.

No puedo olvidarme de él, Pepe Gálvez. Si bien es cierto que hace muchos años que nos dejaste, siempre te hemos tenido muy presente. Saber lo orgulloso que estarías de que pudiera estar en un laboratorio, al cual podrías venir tantas veces como quisieras. Una persona con una vocación desmedida, en una época equivocada.

Aguantasteis las mil horas de ensayos de mi TFM, y vinisteis a verme. Esta vez no podrá ser, no solo por nuestro amigo COVID (sino supiera qué es, pensaría que se trata de un “perrete” adorable). Dicen que la distancia daña las relaciones, independientemente del tipo que sean, pero con vosotras no lo he sentido así. Cada vez que nos hemos visto, que hemos hablado, parecía que el tiempo no había pasado. Parecía que Sandra nunca se hubiera ido a Granada hace más de dos años. Recuerdo a su perra endemoniada ladrando solo cuando yo aparecía y, bueno, el resto de locuras que no se pueden contar. Y a ella, Encarni, mi persona, quién se fue a Gerona hace más de tres años. Allí ha conocido al amor de su vida, Aleix, con quien va a formar una familia en breve, con bebé incluido: mi pequeño Eidan, vas a tener una familia que te va a adorar, y un papa y una mama que te van a querer con locura y, por supuesto, tus titas, te vamos a traer a Almería más de lo que tus padres sospechan. Tus innumerables consejos hacen de ti una persona muy importante en mi vida. Siempre sabe que decir, como animarme y como hacerme reír de la manera más tonta, gracias por todo Carmen.

Los años que viví en Granada fueron inolvidables, no solo por lo hermosa que es la ciudad, sino por las personas tan maravillosas que conocí allí. Marina, que ahora está en Bélgica haciendo la tesis, mi malagueña poliglota, aún recuerdo cuando secuestrabas a Niebla y me ibas dejando notas por todos lados, o las mil horas hablando de “siensia”, o cantando temazos científicos... Mi otro gran apoyo por aquel entonces fue Belén, tan fina hablando como vistiendo. A pesar de las pruebas que nos ponga la vida, recuerda que tu puedes con todo porque tienes capacidad para hacer lo que te propongas. Y no puedo olvidar a Conchi, mi “nume” preferida. Me enseñaste tantas y tantas cosas que tu solo sabes. Me alegra que, poco a poco, vayas encauzando tu camino.

A mi enfermera personal, mi hermana, quien ha estado en los malos y en los buenos momentos. Quien ha aguantado mi mal humor y quien me agarró la mano cuando ni los médicos sabían lo que tenía. Porque, aunque es mi hermana, yo la considero mi mejor amiga, intensa como ella sola. Tengo una anécdota sobre ella...

Ella sabe cuál es solo diciendo eso. Y como un pack inseparable, a Javi, con su paciencia infinita, y quien me va a ayudar a tener los sobrinos más bonitos del mundo (guiño, guiño).

A mi compañero de batallas, al otro integrante de la banda del colchón (mejor no preguntar), dispuesto a todo siempre. Tantas horas de risas, de viajes a verte, de visitas a tiendas... Y mil historias más, que se resumen en gracias por estar siempre ahí.

¿Como puedo expresar con palabras lo eternamente agradecida que estoy a mis padres por todo el apoyo que me han dado? Creo que es algo imposible. Gracias a mi padre, que siempre ha estado dándome ideas, dándome ánimo cuando perdía el camino, y refunfuñando por las miles de horas que pasaba trabajando en el ordenador, y no lo dejaba usarlo. Obviamente, mi madre ha sido tan importante como él. Ella, con las mil historias que le pasaban en la tienda, siempre buscando que le hiciera compañía y despejara la mente, aunque solo fuera un rato. Sin vosotros, no habría llegado hasta aquí.

Dentro de unos años, todos recordaremos el 2020 por la pandemia que confinó a todo el Planeta, y atemorizo a los más fuertes. En mi caso, cuando eche la vista hacia atrás te recordaré a ti también. Has aparecido en mi vida como por arte de magia. Durante el confinamiento, los días se hacían tan cortos por las largas horas que pasábamos hablando, riendo... Me contagias tu energía, tus ganas de comerte el mundo, de crecer como persona, y lo más importante es que quieras hacerlo a mi lado. No se que nos deparará el futuro, pero sí lo que nos depara el presente, y cada día es un momento más para recordar. Gracias por tu apoyo incondicional mi amor. Te quiero.

ÍNDICE

ÍNDICE DE CONTENIDOS

INDICADORES DE CALIDAD	i
RESUMEN	i
ABSTRACT	iv
1. Introducción	2
1.1. Problemática global derivada de la generación de residuos en el siglo XXI	2
1.1.1. <i>Alternativas a la gestión de residuos orgánicos</i>	4
1.1.1.1. Tratamientos térmicos	7
1.1.1.2. Tratamientos biológicos	8
1.2. El compostaje: clave de la sostenibilidad	10
1.2.1. <i>Tipos de pilas de compostaje</i>	15
1.2.2. <i>Fases del proceso de compostaje</i>	16
1.2.3. <i>Parámetros de control al inicio del proceso</i>	19
1.2.3.1. Tamaño de partícula	19
1.2.3.2. Porosidad	20
1.2.3.3. El espacio de aire libre	20
1.2.4. <i>Parámetros básicos de control del proceso</i>	21
1.2.4.1. Temperatura	21
1.2.4.2. Humedad	22
1.2.4.3. Aireación	23
1.2.4.4. Materia Orgánica	23
1.2.4.5. Ratio C/N	23
1.2.4.6. pH	24
1.2.4.7. Conductividad eléctrica	25
1.2.5. <i>Parámetros de seguimiento relativos a estabilidad y madurez</i>	25
1.2.5.1. Fracciones lignocelulósicas	25
1.2.5.2. Indicadores de Humificación	26
1.2.5.3. Parámetros de nitrificación	27
1.2.5.4. Pérdidas de nitrógeno	28
1.2.6. <i>Indicadores microbianos de especial relevancia durante el proceso de compostaje</i>	28
1.2.6.1. Microbiota asociada al proceso de compostaje	28
1.2.6.2. Bioindicadores enzimáticos	35
1.2.6.3. Análisis metagenómico	40
1.2.6.4. Índices de Biodiversidad	43

1.2.7. <i>Calidad del producto final: estabilidad y madurez vs fitotoxicidad</i>	46
1.2.8. <i>Aplicaciones y opciones de mercado de los microorganismos procedentes del compost</i>	49
1.2.9. <i>Compostaje a escala industrial</i>	51
2. Hipótesis y Objetivos	69
3. Diseño Experimental	73
4. Resultados	76
ARTÍCULO 1	77
ARTÍCULO 2	110
ARTÍCULO 3	139
5. Discusión	172
6. Conclusiones	192

INDICADORES DE CALIDAD

La presente Tesis Doctoral se compone de 3 artículos que han sido publicados en revistas científicas con un importante Índice de impacto:

ARTÍCULO 1: 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.

Calidad de la revista

Índice de impacto (Thomson Reuters, Journal of Citation Reports[®], 2019): **4,865**

Categoría JCR	Cuartil en su categoría
BIOTECHNOLOGY & APPLIED MICROBIOLOGY	Q1

ARTÍCULO 2: 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.

Calidad de la revista

Índice de impacto (Thomson Reuters, Journal of Citation Reports[®], 2020): **6,669**

Categoría JCR	Cuartil en su categoría
AGRICULTURAL ENGINEERING	Q1
BIOTECHNOLOGY & APPLIED MICROBIOLOGY	Q1
ENERGY & FUELS	Q1

ARTÍCULO 3: 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, 123557.

Calidad de la revista

Índice de impacto (Thomson Reuters, Journal of Citation Reports[®], 2020): **6,669**

Categoría JCR	Cuartil en su categoría
AGRICULTURAL ENGINEERING	Q1
BIOTECHNOLOGY & APPLIED MICROBIOLOGY	Q1
ENERGY & FUELS	Q1

RESUMEN

El colapso ambiental provocado por numerosas actividades antropogénicas ha derivado en la acumulación masiva de residuos en vertederos o en la incineración descontrolada de los mismos. La gestión adecuada de este tipo de residuos pasa, irremediablemente, por la adaptación a un modelo de economía circular, mediante el cual se busca la conservación de los recursos naturales, el mantenimiento de la biodiversidad, el reciclaje y la reutilización de residuos, convirtiéndolos así en productos. Gran parte de estos residuos, a los que se les puede dar una segunda vida útil, se enmarcan dentro del grupo de los residuos biodegradables. Entre las alternativas más exitosas destinadas a la biotransformación de este tipo de residuos, destaca el compostaje por adecuarse a los conceptos actuales de sostenibilidad y bioeconomía, considerándose un proceso respetuoso con el medio ambiente y que no implica elevados costes.

El compostaje es un proceso de biotransformación aerobia de la materia orgánica durante el cual se suceden diversas fases térmicas caracterizadas principalmente por la acción de diferentes poblaciones microbianas. El resultado de este proceso es un producto estable y maduro, compost, cuya principal aplicación se realiza a modo de enmienda húmica en agricultura. En España está legislado su uso, así como las características físico-químicas básicas que un compost debe cumplir para su comercialización. Sin embargo, a pesar de la idoneidad del proceso, el control del mismo se complica cuando se trata de dar el salto a escala industrial, ya que ni los volúmenes de trabajo, ni las condiciones operacionales, ni las materias primas son iguales en las distintas instalaciones dedicadas a la gestión de residuos orgánicos mediante compostaje. Aún más difícil es, por tanto, encontrar algún tipo de indicador físico-químico o biológico, que permita evaluar el desarrollo de procesos que se muestran *a priori* tan heterogéneos.

El trabajo presentado en esta Memoria de Tesis Doctoral, se ha basado en el estudio exhaustivo de 15 procesos de compostaje a escala industrial, teniendo en cuenta la enorme diversidad en lo que se refiere a las materias primas originales (Residuo Vegetal, Residuos sólidos Urbanos, Lodos de Depuradora, Residuo Agroalimentario y Alpeorajo). Dicho estudio se llevó a cabo desde un punto de vista físico-químico, analizando múltiples parámetros relacionados con el ciclo del carbono y el nitrógeno, así como desde un punto de vista biológico, evaluando diversos indicadores enzimáticos y de biodiversidad. Destaca en este caso, el análisis metagenómico de los productos obtenidos a partir de los 15 procesos evaluados.

En términos globales, los resultados revelaron perfiles fisicoquímicos y enzimáticos muy diferentes, así como diferentes grados de humificación según el tipo de proceso y material de procedencia, lo que sugirió que la vía de transformación de las distintas

fracciones de carbono y nitrógeno podrían ser exclusivas de cada proceso y dependientes de las materias primas. Aun así, algunos parámetros estrechamente relacionados con el ciclo del carbono, como son las fracciones lignocelulósicas, la actividad amilolítica y β -glucosidasa, junto con algunos índices de humificación (HR y C_{AH}/C_{AF}) se posicionaron como buenos indicadores de la evolución óptima de un proceso de compostaje, ya que mostraron tendencias similares.

Además, gracias al análisis metagenómico realizado, se establecieron importantes relaciones entre los índices de biodiversidad Chao1 y Shannon, y ciertos parámetros relacionados con la madurez, estabilidad y toxicidad de las muestras, tales como índice de nitrificación, tasa de humificación, contenido en compuestos fenólicos, índice de germinación o consumo de oxígeno.

En conclusión, a pesar de la heterogeneidad y exclusividad de los procesos de compostaje estudiados, se puede afirmar que los microorganismos, mediante mecanismos diferentes, son capaces de llevar a cabo procesos adecuados de biotransformación de la materia orgánica, obteniéndose productos que cumplen, en términos generales, con los estándares de calidad agronómica. La conexión establecida entre parámetros de muy distinta naturaleza representa un avance en el conocimiento microbiano del compostaje y proporciona una nueva perspectiva para la mejor gestión y control del proceso a escala industrial.

ABSTRACT

The environmental collapse caused by numerous anthropogenic activities has resulted in the massive accumulation of waste in landfills or in the uncontrolled incineration of the same. The suitable management of this type of waste implies adaptation to a circular economy model. This type of model seeks the conservation of natural resources, the maintenance of biodiversity, recycling and reuse of waste, turning them into products. Most of this type of waste, biodegradable waste, can have a second useful life. Among the most successful alternatives for the biotransformation of this type of waste, composting stands out for adapting to current concepts of sustainability and bioeconomy, considering it an ecological process that does not imply high costs.

Composting is a process of aerobic biotransformation of organic matter during which various thermal phases follow, characterized mainly by the biotransformation of organic matter thanks to the action of different microbial populations. The result of this process is a stable and mature product, compost, whose main application is made as a humic amendment in agriculture. In Spain, its use is legislated, as well as the basic physical-chemical characteristics for its commercialization. However, despite the suitability of the process, its control is complicated when it comes to making the leap to an industrial scale. The main problem is that the work volumes, the operational conditions, and the raw materials are not the same in the different companies dedicated to the management of organic waste through composting. Therefore, it is even more difficult to find some type of physical-chemical or biological indicators that allow evaluating the development of processes *a priori* so heterogeneous.

The work presented in this Doctoral Thesis Memory has been based on the in-depth study of 15 composting processes on an industrial scale, also taking into account the enormous diversity in regard to the original raw materials (Vegetable Residue, Solid Residues Urban, Sewage Sludge, Agro-Food Waste and Alpeorujo). This study was carried out from a physical-chemical point of view, analyzing multiple parameters related to the carbon and nitrogen cycle, as well as from a biological point of view, evaluating various enzymatic and biodiversity indicators. In this case, the metagenomic analysis of the products obtained from the 15 evaluated processes stands out.

The results revealed very different physical-chemical and enzymatic profiles, as well as different degrees of humification according to the type of process and source material, which suggested that the transformation pathway of the different carbon and nitrogen fractions could be unique to each process and dependent of raw materials. Even so, some parameters closely related to the carbon cycle, such as lignocellulosic fractions, amylolytic and β -glucosidase activity, together with some humification indices (HR and C_{HA} / C_{FA}) were positioned as good indicators of the optimal evolution of a composting process, as they showed similar trends over time. In addition, thanks to the

metagenomic analysis carried out, important relationships were established between the Chao1 and Shannon biodiversity indices, and certain parameters related to the maturity, stability and toxicity of the samples, such as nitrification index, humification rate, content of phenolic compounds, germination rate or oxygen consumption.

In conclusion, despite the heterogeneity and exclusivity of the composting processes studied, it can be affirmed that microorganisms, through different mechanisms, are capable of carrying out adequate processes of biotransformation of organic matter, obtaining products that comply, in terms general, with agronomic quality standards. The connection established between parameters of a very different nature represents an advance in the microbial knowledge of composting and provides a new perspective for better management and control of the process on an industrial scale.

INTRODUCCIÓN

1. Introducción

1.1. Problemática global derivada de la generación de residuos en el siglo XXI

En la actualidad, la conciencia social y ambiental se ha hecho eco en todo el planeta, llegando a centrar gran parte de su atención en la búsqueda de soluciones al cataclismo ambiental que se prevé a corto plazo. Durante las últimas décadas, el empeño por alcanzar una mejor calidad de vida ha derivado en el uso excesivo e inadecuado de recursos, materiales y energía. Este hecho ha provocado la generación y acumulación de grandes cantidades de residuos orgánicos que, junto a otros problemas ambientales, como son la contaminación del agua, el aire y el suelo, la pérdida de biodiversidad, o el agotamiento de los recursos, ponen cada vez más en peligro los sistemas de soporte vital de la Tierra (Chu et al., 2017) (Figura 1). En 2014, los estados miembros de la Unión Europea generaron en torno a 2500 millones de toneladas de residuos de los cuales el 1% procedía de actividades agrícolas, silvicultura y pesca, 8% de residuos domésticos, 10% de manufacturación, 30% de minas y canteras, 34% de la construcción y 17% de otras actividades. Tales cifras requieren de una gestión adecuada, en la que se apliquen estrategias respetuosas con el medio ambiente, sostenibles y, en la medida de lo posible, que pongan en valor el residuo transformado. En este sentido, la UE en su reciente “Nuevo Plan de acción para la economía circular por una Europa más limpia y más competitiva (European Commission, 2020), se plantea serios objetivos a corto-medio plazo en lo que respecta a la gestión de residuos orgánicos, entre los cuales se encuentra llegar a un porcentaje de reutilización y reciclado de residuos domésticos en torno al 55% en el año 2025, e incluso superior al 65% en 2035.

Según datos de 2016, el 47% de los residuos municipales generados en la UE se recicla o composta. Sin embargo, tanto las cantidades generadas como la gestión de los mismos son muy variables entre los distintos países miembros. Por ejemplo, los vertederos son prácticamente inexistentes en Europa noroccidental, donde la incineración controlada y el reciclaje suponen las principales estrategias de gestión. También Alemania y Austria se encuentran a la cabeza de la lista de países europeos que reciclan una gran proporción de los residuos generados. Los vertederos, en cambio, siguen siendo imprescindibles en, al menos, 12 países del este y sur de Europa. Así, más del 50% de los residuos acaban en vertederos en Croacia, Letonia, Eslovaquia, Bulgaria, España, Hungría, Chequia y Portugal, superando incluso el 80% en el caso de Malta, Grecia, Chipre y Rumanía.



Figura 1. Problemas derivados de la contaminación de origen antropogénico
(<https://www.contaminaciondelagua.net/ambiental/>).

Hasta mediados del siglo XX, el modelo de economía lineal jugaba un papel esencial en el desarrollo económico a nivel mundial. Sin embargo, dicho modelo ha provocado una presión sin precedentes sobre el agotamiento de los recursos naturales, derivando además en la generación y acumulación masiva de residuos de distinta naturaleza. Desafortunadamente, la gestión de residuos y recursos, según el modelo de producción lineal, no sigue un enfoque holístico, hecho que se ve reflejado en una clara saturación de los vertederos, y en la pérdida de valor de muchos residuos que aún podrían ser transformados y reutilizados.

En este contexto, la economía circular surge como un modelo viable que tiene como objetivo el uso responsable de los recursos naturales, la disminución al máximo de la generación de residuos, y la “circularización” (del inglés *circularization*) de los procesos productivos desde un punto de vista económico y ecológico, dando lugar, de este modo, a la prolongación de la vida útil de las materias primas (Geissdoerfer et al., 2017; Malinauskaite et al., 2017). En economía circular, el reciclaje y la reutilización son el principio básico para el diseño y la optimización de los procesos productivos (Figura 2). A medida que las naciones y autoridades de todo el mundo adopten gradualmente el concepto de economía circular e intenten llevarlo a la práctica, la gestión de recursos y

residuos podrá considerarse sostenible y útil para promover un crecimiento económico eficiente, pero al mismo tiempo, respetuoso con el medio ambiente.

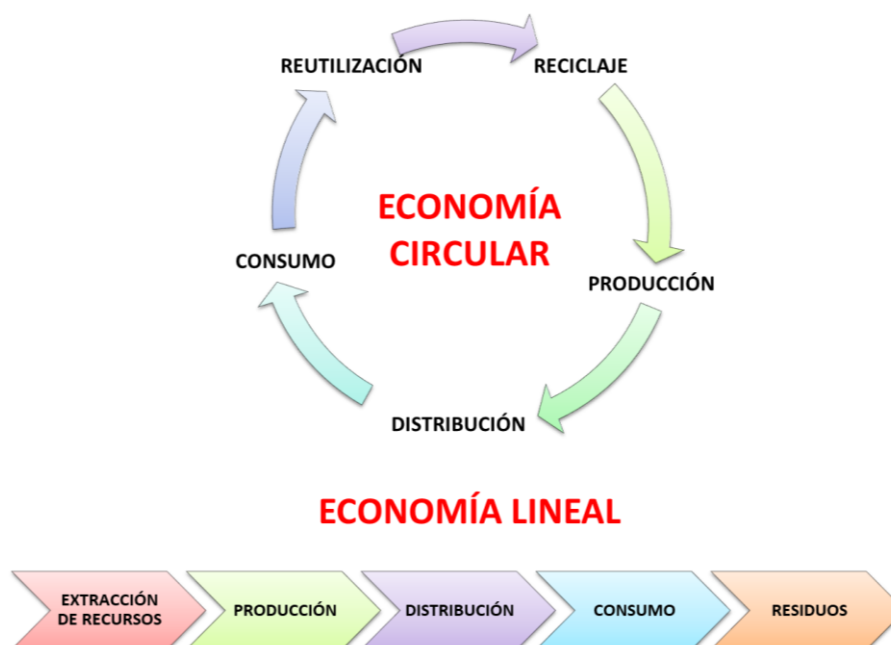


Figura 2. Economía circular vs economía lineal.

1.1.1. Alternativas a la gestión de residuos orgánicos

Desde un punto de vista sanitario y ambiental, la gestión de residuos abarca el conjunto de operaciones encaminadas a dar a los residuos producidos en una zona, el destino más adecuado. Estas operaciones son seleccionadas teniendo en cuenta la procedencia, las características del residuo y el volumen, los costes de tratamiento, así como las posibilidades de recuperación y de comercialización de los productos generados; todo ello, sin perder de vista las directrices administrativas.

Las alternativas de gestión más desfavorables serían aquellas que conducen a la eliminación del residuo, tales como el depósito en vertedero controlado y la incineración sin aprovechamiento energético. Por el contrario, son recomendables, y han de considerarse prioritarios, procesos de tratamiento que generan valor añadido o que permiten el reciclado de la materia orgánica contenida en los residuos, como es el caso del compostaje.

Actualmente, la Ley 22/2011, de 28 de julio, recoge todo aquello que atañe a la gestión de residuos y suelos contaminados. El objeto de la ley es “regular la gestión de los residuos, impulsando medidas que prevengan su generación y mitiguen los impactos

adversos sobre la salud humana y el medio ambiente, asociados a su generación y gestión, y que mejoren la eficiencia en el uso de los recursos". Según lo descrito en el Artículo 3 de dicha Ley, el concepto de "Eliminación" incluye "cualquier operación que no sea la valorización, incluso cuando la operación tenga como consecuencia secundaria el aprovechamiento de sustancias o energía. Por otro lado, esta misma Ley define la "Valorización" como "cualquier operación cuyo resultado principal sea que el residuo sirva a una finalidad útil al sustituir a otros materiales, que de otro modo se habrían utilizado para cumplir una función particular, o que el residuo sea preparado para cumplir esa función en la instalación o en la economía en general. Los Anexos I y II de la Ley 22/2011 enumeran, respectivamente, las principales operaciones de eliminación y valorización de residuos, las cuales se indican a continuación:

➤ Operaciones de eliminación, según Ley 22/2011 de residuos y suelos contaminados:

D1 Depósito sobre el suelo o en su interior (por ej., vertido, etc.)

D2 Tratamiento en medio terrestre (por ej., biodegradación de residuos líquidos o lodos en el suelo, etc.)

D3 Inyección en profundidad (por ej., inyección de residuos "bombeables" en pozos, minas de sal o fallas geológicas naturales, etc.)

D4 Embalse superficial (por ej., vertido de residuos líquidos o lodos en pozos, estanques o lagunas, etc.)

D5 Depósito controlado en lugares especialmente diseñados (por ej., colocación en celdas estancas separadas, recubiertas y aisladas entre sí y el medio ambiente)

D6 Vertido en el medio acuático, salvo en el mar

D7 Vertido en el mar, incluida la inserción en el lecho marino

D8 Tratamiento biológico no especificado en otros apartados del presente anexo que dé como resultado compuestos o mezclas que se eliminen mediante cualquiera de las operaciones numeradas de D1 a D12

D9 Tratamiento fisicoquímico no especificado en otro apartado del presente anexo y que dé como resultado compuestos o mezclas que se eliminen mediante uno de los procedimientos numerados de D1 a D12 (por ej., evaporación, secado, calcinación, etc.)

D10 Incineración en tierra

D11 Incineración en el mar (esta operación está prohibida por la normativa de la UE y por los convenios internacionales)

D12 Almacenamiento permanente (por ej., colocación de contenedores en una mina, etc.)

D13 Combinación o mezcla previa a cualquiera de las operaciones numeradas de D1 a D12

D14 Reenvasado previo a cualquiera de las operaciones numeradas de D1 a D13

D15 Almacenamiento en espera de cualquiera de las operaciones numeradas de D1 a D14 (excluido el almacenamiento temporal previsto, en espera de recogida, en el lugar donde se produjo el residuo)

➤ Operaciones de valorización, según Ley 22/2011 de residuos y suelos contaminados:

R1 Utilización principal como combustible u otro modo de producir energía (se incluyen en este apartado las prácticas de incineración controlada)

R2 Recuperación o regeneración de disolventes

R3 Reciclado o recuperación de sustancias orgánicas que no se utilizan como disolventes (incluidos el **compostaje** y otros procesos de transformación biológica, como la gasificación y la pirólisis)

R4 Reciclado o recuperación de metales y de compuestos metálicos

R5 Reciclado o recuperación de otras materias inorgánicas (esto incluye la limpieza del suelo que tenga como resultado la valorización del suelo y el reciclado de materiales de construcción inorgánicos)

R6 Regeneración de ácidos o de bases

R7 Valorización de componentes utilizados para reducir la contaminación

R8 Valorización de componentes procedentes de catalizadores

R9 Regeneración u otro nuevo empleo de aceites

R10 Tratamiento de los suelos que produzca un beneficio a la agricultura o una mejora ecológica de los mismos

R11 Utilización de residuos obtenidos a partir de cualquiera de las operaciones numeradas de R1 a R10

R12 Intercambio de residuos para someterlos a cualquiera de las operaciones enumeradas entre R1 y R11. Quedan aquí incluidas operaciones previas a la valorización incluido el tratamiento previo, operaciones tales como el desmontaje, la clasificación, la trituración, la compactación, la peletización, el secado, la fragmentación, el acondicionamiento, el reenvasado, la separación, la combinación o la mezcla, previas a cualquiera de las operaciones enumeradas de R1 a R11

R13 Almacenamiento de residuos en espera de cualquiera de las operaciones numeradas de R1 a R12 (excluido el almacenamiento temporal previsto, en espera de recogida, en el lugar donde se produjo el residuo)

Por otra parte, el concepto tradicional de “vertedero ideal”, implica que, tras el vertido de los residuos, éstos se compactan y se cubren con suelo limpio, con objeto de evitar malos olores y plagas de insectos. Sin embargo, a partir de la publicación de la Orden AAA/661/2013, de 18 de abril, por la que se modifican los anexos I, II y III del Real Decreto 1481/2001, de 27 de diciembre, por el que se regula la eliminación de residuos mediante depósito en vertedero, se restringen notablemente las condiciones permitidas para el vertido de residuos, estableciéndose límites sobre el contenido en materia orgánica contenida en los mismos. Teniendo en cuenta dicho escenario, se describen a continuación algunas de las estrategias actuales más utilizadas como tratamiento de residuos orgánicos de forma previa a su entrada a vertedero. Tales estrategias se clasificarán en dos grupos fundamentales: **tratamientos térmicos** y **tratamientos biológicos**. Se excluyen las estrategias de **aplicación directa**, las cuales aprovechan los nutrientes presentes en los residuos sin alterar su composición química o estructura. Entre estos se encuentran alternativas tan diversas como el empleo directo de los residuos vegetales como enmienda orgánica, alimento y cama para ganado, biofiltros o empleo en el cultivo de champiñón (Ripoll y Mauri, 2008).

1.1.1.1. *Tratamientos térmicos*

Las alternativas de valorización incluidas en este grupo incluyen varios procedimientos en los que se genera energía. En este caso, los residuos se someten a elevadas temperaturas, bien en presencia de oxígeno (incineración), o bien en atmósferas deficientes o exentas de agente oxidante (pirólisis y gasificación) (Ripoll y Mauri, 2008). A continuación se describen brevemente cada uno de ellos.

Incineración controlada: es la técnica más extendida y puede generar energía térmica en función del poder calorífico de cada tipo de residuo. El principal problema de la incineradora está en las restricciones de la legislación europea (Directiva 2000/76/CE) referentes a emisiones, y a sus elevados costes. Por otra parte, aunque la incineración reduce en gran medida el volumen de residuos a tratar, genera otros subproductos difíciles de gestionar (Ripoll y Mauri, 2008).

Gasificación: en este proceso se utiliza el 25-30% del oxígeno necesario para llevar a cabo la combustión completa de la materia orgánica. Las temperaturas de tratamiento alcanzan los 1000°C, generando el denominado gas de síntesis o *Sintegas*, (también

denominado *Syngas*), que está compuesto por CO₂, H₂, CH₄, H₂O, N₂ y CO. Los gases CO, H₂ y CH₄ contenidos en el gas resultante confieren poder calorífico al *Sintegas*, y pueden reaccionar con oxígeno en un motor de combustión, una turbina o una caldera (Ripoll y Mauri, 2008).

Pirólisis: proceso altamente endotérmico que se realiza en ausencia de oxígeno, lo que facilita la separación de las sustancias orgánicas y su repolimerización mediante fenómenos de condensación, logrando así la separación de las fracciones gaseosa, líquida y sólida, cuya proporción dependerá de la temperatura del proceso. Uno de los productos de interés generado en este proceso es el sólido denominado *biochar* (o carbón vegetal, si las materias primas son de origen vegetal), que posee un poder calorífico mayor que el residuo de partida, lo que permite un transporte más eficiente. El *biochar* puede quemarse para producir energía en sustitución del carbón pulverizado. Los *biochars* con bajo contenido en cenizas se utilizan para la producción de carbón activo, que puede ser aplicado en distintos campos como agente absorbente en filtros, para eliminar olores o contaminantes en aire y aguas (Ripoll y Mauri, 2008).

Combustión incompleta: es el resultado de la combinación de un proceso de pirólisis e incineración, obteniéndose en este caso gases combustibles, aceites y carbón vegetal de alto poder calorífico (Ripoll y Mauri, 2008).

1.1.1.2. Tratamientos biológicos

Los tratamientos incluidos en este grupo se basan en la biotransformación de los residuos orgánicos mediante el empleo de microorganismos. Las principales alternativas aplicadas en este campo se describen a continuación de forma independiente, aunque es habitual la combinación de alguna de ellas para conseguir un aprovechamiento integral del residuo.

Compostaje: son numerosos los trabajos que se han centrado en este proceso, ya sea desde el punto de vista físico-químico (Said-Pullicino et al., 2007), como microbiológico (Moreno et al., 2013). En esencia, el compostaje es un tratamiento natural consistente en la biotransformación de residuos orgánicos, gracias a la acción de diversos grupos microbianos que conforman un complejo ecosistema en las pilas de compostaje. De este modo, y bajo condiciones aeróbicas controladas, la materia orgánica se transforma y estabiliza generando un producto al que se le atribuye la capacidad de mejorar las características físico-químicas y biológicas del suelo en el que es aplicado. Debido a la elevada porosidad, capacidad esponjante y relación C/N, los residuos vegetales son perfectos para ser compostados, por sí solos o junto a otros residuos que no poseen tan buenas características. Además, la presencia de compuestos lignocelulósicos

proporciona el componente básico para la formación de ácidos húmicos durante el compostaje (Lewis y Yamamoto, 1990).

El trabajo presentado en esta Memoria de Tesis se basa fundamentalmente en la caracterización de procesos de compostaje a escala industrial, por lo que más adelante se analizarán las distintas fases del proceso, así como los factores que determinan la idoneidad del mismo (Apartado 1.2.)

Digestión anaerobia: proceso biológico, también conocido como biometanización, caracterizado por desarrollarse en ausencia de oxígeno. La transformación de parte de la materia orgánica de los residuos orgánicos se produce por la acción de los diferentes grupos microbianos en una mezcla de gases (biogás), constituidos principalmente por CO_2 y CH_4 y otros en pequeñas cantidades (NH_3 , H_2 , SH_2 , etc.). Los principales productos obtenidos tras el proceso de digestión anaerobia son el biogás y una fracción sólida llamada digestato, el cual, si es de calidad y lo permite la legislación vigente, puede ser usado como fertilizante orgánico. Los principales intermediarios y moduladores del proceso son los ácidos grasos volátiles, que se forman a partir de los compuestos más sencillos obtenidos durante la degradación de la materia orgánica. Los microorganismos metanogénicos son los encargados de consumir estos primeros productos de degradación, generando CO_2 y CH_4 . Todos estos procesos tienen lugar de forma simultánea en un reactor. La temperatura a la cual suele producirse el proceso suele tener lugar en torno a los 35°C (régimen mesofílico) o cerca de los 55°C (régimen termofílico). Una parte de la energía que se obtiene del biogás producido se utiliza para mantener esta temperatura y el resto se emplea como fuente de energía renovable (electricidad, calor y/o combustible). La humedad es un factor de gran peso durante la digestión anaerobia, la cual favorece el proceso, con rangos entre 60 y 99%, siendo en ocasiones necesaria la adición de agua. La presencia de altas concentraciones de metales pesados en los materiales de partida, en cambio, puede ser tóxica para las bacterias metanogénicas (Lorenzo y Obaya, 2005), y por tanto se vería afectado el proceso.

Biocombustibles: la producción de biocombustibles a partir de la lignocelulosa contenida en los residuos vegetales es una alternativa que en los últimos años ha despertado gran interés (Batstone y Viridis, 2014; Latif et al., 2014). Hasta el momento, productos como el bioetanol o el biodiesel se han obtenido de forma rentable mediante bioconversión de productos ricos en almidón y aceites vegetales, aunque la tendencia actual es utilizar materiales residuales (residuos vegetales) o cultivos energéticos, en sustitución de otros más tradicionales. Los cultivos energéticos, como la soja o algunos cereales, destacan mundialmente por su interés para la producción de biocombustibles.

Sin embargo, existen críticas en algunos sectores por el hecho de estar utilizando un exceso de superficie agraria que podría ser destinada a la alimentación.

En la Tabla 1 se describen las principales ventajas e inconvenientes derivados de la aplicación de distintos tratamientos de transformación de la materia orgánica.

1.2. El compostaje: clave de la sostenibilidad

En lo que respecta a la gestión de residuos orgánicos, el compostaje se posiciona actualmente como una de las alternativas más cercanas al concepto de economía sostenible, lo cual se puso de manifiesto en el paquete integral de economía circular europea publicado en diciembre de 2015.

A pesar de que la Ley 22/2011, de residuos y suelos contaminados, no hace referencia específica a la definición de proceso de compostaje, si incluye en su Apartado 3, la definición de compost, como aquella “enmienda orgánica obtenida a partir del tratamiento biológico aerobio y termófilo de residuos biodegradables recogidos separadamente”. Añade también dicha definición que “no se considerará compost, el material orgánico obtenido de las plantas de tratamiento mecánico biológico de residuos mezclados, el cual se denominará material bioestabilizado”.

Tabla 1. Principales ventajas e inconvenientes derivados de algunos de los tratamientos que se utilizan para transformar la materia orgánica.

TRATAMIENTO	VENTAJAS	INCONVENIENTES
Compostaje	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Tecnología simple, barata y robusta. ✓ Recuperación del 50% de la masa (peso) y de nutrientes. ✓ Producción de sustancias húmicas, microorganismos beneficiosos y nitrógeno de liberación lenta. ✓ Elimina semillas y patógenos. ✓ Oportunidad de controlar el proceso. 	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Requiere separación en origen. ✓ Se necesita desarrollar y mantener un mercado para el compost. ✓ Emisión de olores, especialmente en el caso de Residuos Sólidos Urbanos. ✓ Pérdida de 20-40% de nitrógeno en forma de amoníaco, y de 40-60% de carbono en forma de dióxido de carbono.
Digestión Anaerobia	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Posibilidad de recuperación de nutrientes. ✓ Producción de energía. ✓ Reducción de olores. 	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Requiere separación en origen. ✓ La fracción sólida requiere compostaje o tratamiento adicional. ✓ Se necesita desarrollar y mantener un mercado para el fertilizante líquido.
Incineración	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Proceso muy conocido y de elevada implantación. ✓ Recuperación energética de hasta el 85%. ✓ Cualquier tipo de residuo municipal puede ser tratado. ✓ Se reduce el volumen del residuo al 5-10%. ✓ Producción de energía neutral para CO₂, sustitución de combustibles fósiles. 	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Inversiones muy elevadas. ✓ Necesidad de un sistema de tratamiento de gases de elevado coste. ✓ Generación de cenizas y productos de la limpieza de gases que deben ser llevados a vertedero. ✓ Generación de NOx y otros gases.
Pirólisis	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Mejor retención de metales pesados. ✓ Menor cantidad de gas residual que en la incineración. ✓ Sin formación de dioxinas o furanos. ✓ Adecuado para fracciones de residuos difíciles. ✓ Producción de energía neutral con CO₂, sustitución de combustibles fósiles. 	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Requerida trituración para evitar bloqueos de los sistemas de alimentación y transporte. ✓ Los aceites pirolíticos contienen componentes tóxicos y cancerígenos, que normalmente se descomponen durante el proceso. ✓ El residuo sólido contiene 20-30% del poder calorífico. ✓ Elevados costes.
Gasificación	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Alto grado de recuperación (85%) y buen uso del residuo como fuente energética. ✓ Producción de energía neutral con CO₂, sustitución de combustibles fósiles. ✓ Mejor retención de metales pesados que otros procesos. ✓ Menor cantidad de gas residual que en la incineración. 	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Requerida trituración para evitar bloqueo de los sistemas de alimentación y transporte. ✓ La limpieza del gas para uso de motor es complicada. ✓ El residuo sólido puede contener carbono no procesado ✓ Generación de NOx. ✓ Elevados costes. ✓ Baja implantación.

De dicha definición se deduce que sólo los residuos potencialmente biodegradables serán susceptibles de ser compostados. El Real decreto 1481/2001, de 27 de diciembre, por el que se regula la eliminación de residuos mediante depósito en vertedero, considera residuos biodegradables, todos aquellos que, en condiciones de vertido, pueden descomponerse de forma aerobia o anaerobia, tales como residuos de alimentos y de jardín, papel y cartón. Sin embargo, la actual Ley 22/2011 de residuos, amplía dicha consideración, y define el término “biorresiduo” como aquel residuo biodegradable de jardines y parques, residuos alimenticios y de cocina, procedentes de hogares, restaurantes, servicios de restauración colectiva y establecimientos de venta al por menor, así como, residuos comparables procedentes de plantas de procesado de alimentos.

Según Bernal y Gondar (2008), entre los residuos que más se emplean como materias primas en compostaje destacan (Figura 3):

- **Residuos ganaderos:** estiércol, purines y residuos de matadero.
- **Residuos agrícolas:** restos de cosecha de cereales tales como paja, tallos, cáscaras y mazorcas, restos de poda en frutales y herbáceas, restos de cosechas de hortícolas y leguminosas, algas, etc.
- **Residuos urbanos:** materia orgánica procedente de los residuos sólidos urbanos y los residuos sólidos de la depuración de aguas residuales.
- **Residuos agroindustriales:** residuos procedentes de la industria vitivinícola tales como raspón, orujo y lías, los residuos del lúpulo y la malta de la industria cervecera, el alpeorujo procedente de la industria olivarera, residuos de la preparación de zumos y conservas vegetales serrín o virutas de aserraderos, orujo de uva de bodegas, desechos de pasta de celulosa de industrias papeleras, etc.



Figura 3. Residuos compostables.

La importancia de regular mediante la normativa vigente los residuos que pueden ser empleados en el proceso de compostaje radica en el control de la calidad del producto final obtenido y el contenido en nutrientes de los distintos tipos de compost. El Real Decreto 999/2017, de 24 de noviembre, modifica el Real Decreto 506/2013 sobre productos fertilizantes, el cual establece la normativa básica en materia de productos fertilizantes, no considerados como abonos CE. Algunas de las modificaciones más importantes se dirigen a contemplar los aspectos relacionados con microorganismos que pueden formar parte de un fertilizante. En este sentido, la evolución del progreso técnico y científico ha facilitado el desarrollo de nuevos productos fertilizantes para los que hay que adaptar el marco legislativo vigente. En concreto, el desarrollo de productos fertilizantes que incorporan microorganismos cuya acción es facilitar la disponibilidad de nutrientes para la planta, ha obligado a una revisión en profundidad del Real Decreto 506/2013, de 28 de junio, para su incorporación al Registro de productos fertilizantes. Además, en el Real Decreto 999/2017 también se modifican algunos anexos con respecto al Real Decreto 506/2013, en concreto el anexo I, que incluye nuevos tipos de productos, forma de obtención, componentes esenciales, contenido máximo y mínimo de ciertos parámetros físico-químicos, la denominación o el etiquetado.

El Real Decreto 999/2017 clasifica el compost dentro del Grupo 6 de su Anexo I, el cual incluye distintos tipos de Enmiendas orgánicas. En la **Tabla 2** se indican los tipos de enmiendas a los que hace referencia dicha normativa.

Tabla 2. Clasificación de las enmiendas orgánicas según Anexo I del Real Decreto 999/2017.

DENOMINACIÓN		DEFINICIÓN	REQUISITOS PARTICULARES
Enmienda húmica	orgánica	Producto de origen animal o vegetal, o por tratamiento de leonardita, lignito o turba, con un contenido mínimo en materia orgánica parcialmente humificada.	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Materia orgánica total: 25%. ✓ Extracto húmico total (ácidos húmicos + ácidos fúlvicos): 5%. ✓ Ácidos húmicos: 3%. ✓ Humedad máxima: 40%.
Enmienda Compost	orgánica	Producto higienizado y estabilizado, obtenido mediante descomposición biológica aeróbica (incluyendo fase termofílica), bajo condiciones controladas, de materiales orgánicos biodegradables del anexo IV, recogidos separadamente.	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Materia orgánica total: 35%. ✓ Humedad máxima: 40%. ✓ C/N < 20. ✓ Las piedras y gravas eventualmente presentes de diámetro superior a 5 mm, no superarán el 2%. ✓ Las impurezas (metales, vidrios y plásticos) eventualmente presentes de diámetro superior a 2 mm, no superarán el 1,5%. ✓ El 90% de las partículas pasarán por la malla de 25 mm.
Enmienda Compost vegetal	orgánica	Producto higienizado y estabilizado, obtenido mediante descomposición biológica aeróbica (incluyendo fase termofílica), exclusivamente de hojas, hierba cortada y restos vegetales o de poda, bajo condiciones controladas.	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Materia orgánica total: 40%. ✓ Humedad máxima: 40%. ✓ C/N < 15. ✓ No podrá contener impurezas ni inertes de ningún tipo tales como piedras, gravas, metales, vidrios o plásticos.
Enmienda Compost de estiércol	orgánica	Producto higienizado y estabilizado, obtenido mediante descomposición biológica aeróbica (incluyendo fase termofílica), exclusivamente de estiércol, bajo condiciones controladas.	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Materia orgánica total: 35%. ✓ Humedad máxima: 40%. ✓ C/N < 20. ✓ No podrá contener impurezas ni inertes de ningún tipo tales como piedras, gravas, metales, vidrios o plásticos.
Enmienda Vermicompost	orgánica	Producto estabilizado obtenido a partir de materiales orgánicos, por digestión con lombrices, bajo condiciones controladas.	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Materia orgánica total: 30%. ✓ Humedad máxima: 40%. ✓ C/N < 20. ✓ El 90% de las partículas pasarán por la malla de 25 mm.
Compost de alperujo		Producto obtenido por descomposición biológica y estabilización de la materia orgánica procedente del alperujo, bajo condiciones que permitan un desarrollo de temperaturas termofílicas.	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Materia orgánica total: 45%. ✓ Humedad máxima: 40%. ✓ Relación C/N < 20. ✓ Contenido máximo en polifenoles: 0,8% ✓ No podrá contener impurezas ni inertes de ningún tipo tales como piedras, gravas, metales, vidrios o plásticos.

1.2.1. Tipos de pilas de compostaje

Para obtener un compost de calidad es imprescindible facilitar el control y la optimización de los diversos parámetros operacionales durante el proceso de compostaje. Por otra parte, gracias al empleo de los distintos sistemas de compostaje se pretende acortar el tiempo que dura cada proceso, disminuir los requisitos de espacio y energía, así como la seguridad higiénica de la planta de tratamiento de residuos. Los sistemas de compostaje se clasifican, en términos generales, en dos grandes grupos:

- **Sistemas abiertos:** son los sistemas tradicionales de compostaje. Los sustratos a compostar se disponen en montones o pilas que pueden estar en naves o al aire libre. Para proporcionar las condiciones aeróbicas que necesita el proceso se realizan volteos mecánicos o ventilación forzada de manera que el proceso tenga una correcta oxigenación. El sistema de compostaje abierto más empleado suele ser en hileras con volteos, los cuales se realizan para evitar la falta de oxígeno y para contrarrestar las altas temperaturas que se pueden alcanzar en el interior de las pilas. Tras cada volteo, la temperatura de la pila puede disminuir entre 5 y 10°C. Los volteos se repiten periódicamente, puesto que la temperatura puede ascender a los pocos días. En lo que respecta a las pilas estáticas con aireación activa, la aportación externa de aire se produce cuando el termostato, al que se encuentra conectado el sistema de ventilación, alcanza una determinada temperatura. Un problema derivado de este proceso puede ser la generación de olores de las pilas, dicho problema puede mitigarse cubriendo estas con cubiertas de diferentes materiales. En las pilas estáticas con aireación pasiva se produce el intercambio de gases mediante evaporación o difusión. Dicha evaporación pasiva se da gracias a procesos de convección natural, viéndose favorecido por la estructura de la pila y la porosidad de la matriz. El proceso activo de degradación puede durar entre 4-6 semanas. La aireación forzada, sin embargo, tiene la ventaja de permitir el control del nivel de oxígeno, así como de la humedad y de la temperatura. Además, En ocasiones la aireación forzada podría evitar los inconvenientes del volteo de las pilas (Negro et al., 2000).
- **Sistemas cerrados:** o compostaje en cámara cerrada. El intenso control de los parámetros operacionales permite la reducción del tiempo de compostaje, de los olores producidos durante el proceso de una forma adecuada y de la superficie empleada para dicho fin. La fase inicial se realiza en reactores que pueden ser horizontales o verticales, mientras que la fase final de maduración se hace en naves abiertas o al aire libre. Este tipo de sistemas también son conocidos como sistemas industrializados ya que son los empleados principalmente tanto por entidades públicas o privadas. Normalmente son utilizados para compostar residuos en las proximidades de ciudades de tamaño medio o grande. A pesar de los elevados costes de instalación, presentan la ventaja de ser más

rápidos y por tanto requerir menos espacio que los sistemas abiertos (Negro et al., 2000).

1.2.2. Fases del proceso de compostaje

A lo largo del proceso de compostaje se pueden distinguir dos etapas globales que se diferencian en los niveles de actividad microbiana y sustratos disponibles: en primer lugar, la etapa biooxidativa, en la que existe una elevada disponibilidad de nutrientes y, por tanto, se detecta un crecimiento activo de los microorganismos, lo que conduce a la elevación de la temperatura interna de los materiales. A continuación, una segunda etapa de maduración o estabilización, en la que los nutrientes están más limitados y los microorganismos muestran niveles de actividad más bajos, por lo que la temperatura prácticamente no varía con respecto a la ambiental. Es en esta etapa donde se forman las sustancias húmicas y el compost adquiere las propiedades que lo caracterizan (Moreno y Mormeneo, 2008).

Durante el compostaje, en presencia de oxígeno, los microorganismos quimiheterótrofos utilizan como fuente de carbono y energía los sustratos orgánicos, que convergen en el ciclo de Krebs a través de distintas rutas metabólicas. Parte de la energía generada se disipa en forma de calor. Una característica del proceso de compostaje es el aumento de temperatura tan acusado debido a que la energía generada se disipa peor que en los líquidos y a la elevada concentración de nutrientes. Así, para que el calor producido tenga cierto impacto en el proceso, los sustratos deben estar dispuestos de tal forma que impidan su disipación. Por esta razón, es imprescindible desarrollar el proceso con un mínimo de material apilado, y no excediendo alturas superiores a dos metros. En estas condiciones, parte del calor queda atrapado en el material y se produce un efecto de retroalimentación (Guo et al., 2012). Atendiendo a la temperatura y a la actividad microbiana que se genera durante el proceso de compostaje podemos diferenciar cuatro fases térmicas: Fase Mesófila, Fase Termófila, Fase de Enfriamiento y Fase de Maduración (Insam et al., 1996; Boulter et al., 2000). Las dos primeras fases, e incluso el inicio de la fase de enfriamiento, se incluyen en la etapa biooxidativa, y durante las mismas la actividad microbiana es intensa. Estas fases se repiten de forma recurrente cuando se efectúa un proceso de compostaje mediante pilas volteadas, de modo que, en cada volteo, se introduce material no biodegradado en el interior de la pila y se reactiva el proceso. En la Figura 4 se muestra la evolución del proceso de compostaje según las diferentes fases térmicas indicadas previamente. Se muestra en esta misma figura, el perfil térmico típico que se obtendría en pilas volteadas (línea naranja punteada), así como la evolución de parámetros como el pH, la relación C/N, y las poblaciones microbianas predominantes en cada fase.

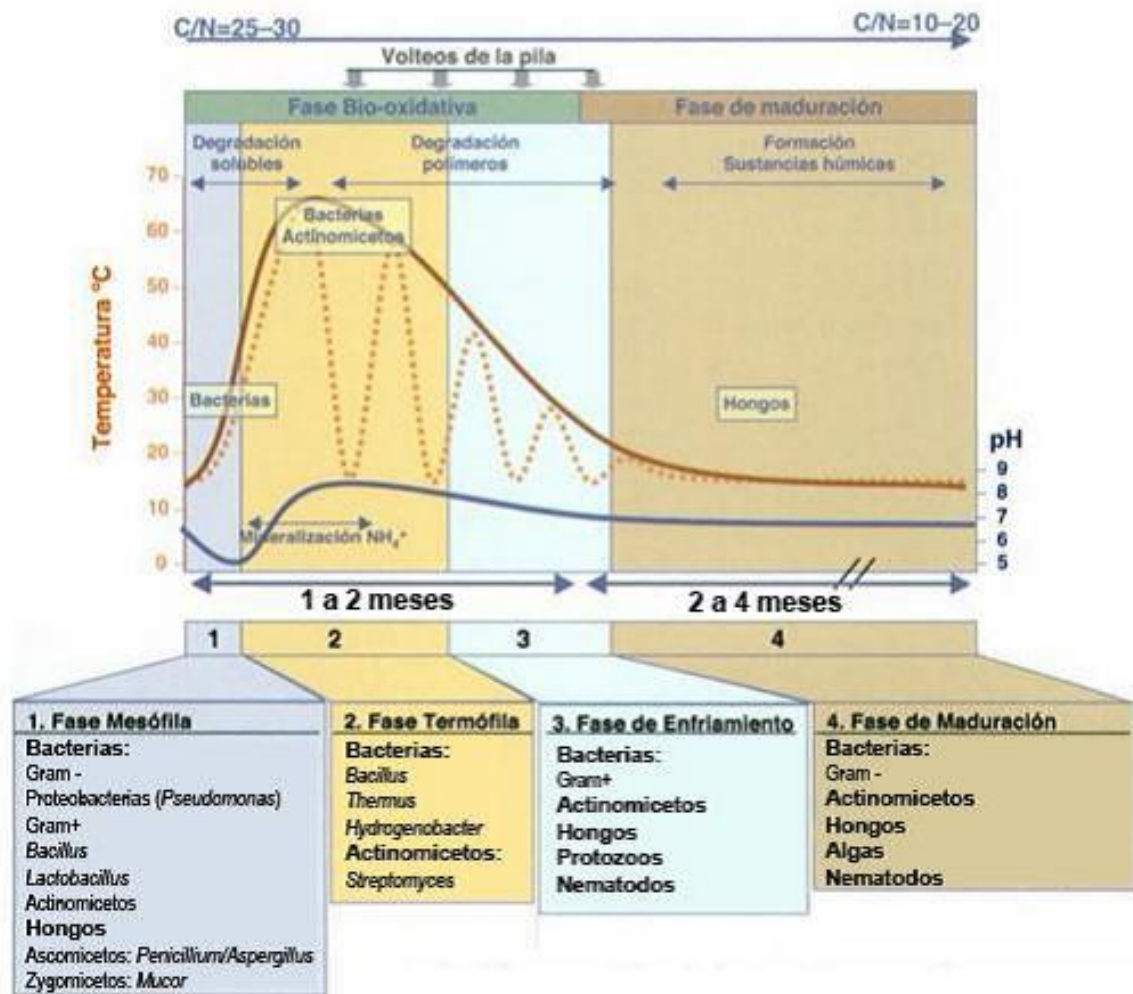


Figura 4. Evolución del proceso de compostaje (Moreno y Mormeneo, 2008).

A continuación, se describen de forma detallada las características que definen cada una de las fases térmicas del proceso de compostaje:

1. **Fase mesófila ($T^a < 45^{\circ}\text{C}$):** el proceso se inicia a temperatura ambiente, con una inmediata degradación microbiológica de la materia orgánica, gracias a la actuación de bacterias y hongos mesófilos y termotolerantes, que metabolizan y mineralizan los compuestos orgánicos carbonados simples (azúcares y aminoácidos). La intensa actividad metabólica de estos microorganismos ocasiona una disminución del pH, debido a la formación de ácidos orgánicos, lo que favorece la aparición de hongos mesófilos más tolerantes a las variaciones del pH y humedad (Tuomela et al., 2000). Al final de esta primera etapa, de corta duración, llega a incrementarse la temperatura hasta valores que alcanzan los $45\text{-}50^{\circ}\text{C}$, lo que supone el tránsito a la fase termófila del proceso (Domsch et al., 1993).

2. **Fase termófila ($T^{\circ} > 45^{\circ}\text{C}$):** el aumento de la temperatura sufrido en la anterior fase permite a los microorganismos comenzar a metabolizar proteínas, incrementando la liberación de amoníaco con la consiguiente alcalinización del medio (Thambirajah et al., 1995). Además, se ha comprobado que, junto a sustancias de fácil degradación, en esta fase se metaboliza la fracción más accesible de la lignocelulosa (Tuomela et al., 2000). Toda esta liberación de compuestos monoméricos simples permite que hongos, bacterias y actinomicetos termófilos dispongan de una fuente de nutrientes nuevamente disponible para proliferar y tener una intensa actividad metabólica. La temperatura continúa ascendiendo hasta, aproximadamente, $65\text{-}70^{\circ}\text{C}$. A esta temperatura, lignina y celulosa son débilmente degradadas, mientras que ceras, proteínas y hemicelulosas, continúan descomponiéndose rápidamente. A causa del calor generado en esta etapa, junto con la existencia de microorganismos termotolerantes productores de compuestos con actividad antimicrobiana, se produce la destrucción de gérmenes patógenos, parásitos y larvas de insectos presentes en los residuos compostados (Moreno, 2005). Según la EPA (2003) es necesario que la pila de compostaje alcance una temperatura mínima de 55°C , al menos durante tres días, para asegurar la correcta higienización de los materiales.

3. **Fase de enfriamiento:** la actividad microbiana es menor en esta etapa, debido a que la fuente de carbono disponible comienza a ser un factor limitante y a que, después de las altas temperaturas alcanzadas en la fase termófila, la población microbiana disminuye en número y diversidad. Vuelven a crecer entonces microorganismos mesófilos, mayoritariamente hongos cuyas esporas permanecían en la pila o bien otras que recolonizan las pilas desde el exterior (Fogarty y Tuovinen, 1991). En esta etapa, los sustratos fácilmente asimilables han sido metabolizados y solo queda la parte de materia orgánica químicamente más compleja, la cual es degradada por actinomicetos y hongos. Durante esta fase de enfriamiento, se voltean y mezclan los materiales de la pila, produciéndose nuevos ciclos termófilos tantas veces como sea necesario, hasta conseguir la degradación total de los materiales poco descompuestos. Cuando la temperatura no se incrementa por encima del valor ambiental, se considera entonces finalizada la fase biooxidativa del proceso. En esta fase, el pH prácticamente permanece invariable.

4. **Fase de maduración:** se caracteriza por una menor actividad microbiana respecto a las fases anteriores, pero no ausente y, a ella contribuye la presencia de protozoos, nematodos y miriápodos. Durante esta etapa, se producen una gran cantidad de reacciones de condensación y polimerización molecular que conducen a la formación de compuestos muy estables y no biodegradables, denominados complejos lignina-humus. Esta fase puede durar varios meses, durante los cuales la biodegradación de

moléculas recalcitrantes, o poco biodegradables, se produce de forma muy lenta, mientras que la materia orgánica parcialmente degradada se reestructura para dar lugar a la formación de sustancias húmicas (García et al., 1990)

1.2.3. Parámetros de control al inicio del proceso

Para que el producto obtenido durante el proceso de compostaje reúna las propiedades estipuladas en el Real Decreto 999/2017, de 24 de noviembre, se deben controlar ciertos parámetros físico-químicos que aluden fundamentalmente a la fase de acondicionamiento previo de los materiales de partida, y suelen considerarse como **parámetros relativos a la naturaleza del sustrato**. Éstos deben ser adecuados fundamentalmente al inicio del proceso (Madejón et al., 2001). Entre ellos se encuentran aquellos relacionados con el tamaño de partícula, la humedad, la relación C/N, el contenido en materia orgánica o el pH.

En la Tabla 3 se indican algunos de los parámetros relativos al acondicionamiento de los materiales, así como los rangos considerados como óptimos al inicio del proceso de compostaje.

Tabla 3. Control de los parámetros físico-químicos en las materias primas a compostar.

PARÁMETRO	RANGO RAZONABLE	RANGO PREFERIDO
Relación C/N	20-40	25-30
Contenido de Humedad	40-65%	50-60%
Tamaño de partícula (cm)	1-3 cm	Variable*
pH	5,5-9,0	6,5-8,0

**Depende del material a utilizar*

1.2.3.1. Tamaño de partícula

Una de las variables más importantes al inicio del proceso de compostaje es el tamaño de partícula relativo a las materias primas empleadas. Las dimensiones consideradas óptimas son distintas según los criterios de distintos autores, variando entre 1 y 5 cm. Esto implica una mayor superficie expuesta, lo que facilita una completa transformación de ésta y mayor rapidez del proceso (Bueno et al., 2008). Una disminución del tamaño indicado anteriormente puede provocar problemas en la transferencia de oxígeno y, por tanto, una reducción en la velocidad de degradación de los residuos a compostar (Haug, 1993)

1.2.3.2. Porosidad

Se define como el espacio libre entre las partículas sólidas y está estrechamente relacionado con el tamaño de partícula. Es un factor muy importante al inicio del proceso ya que los poros proveen al sistema de conductos a través de los cuales se transportan los nutrientes, imprescindibles para el crecimiento de los microorganismos y, además, sirven como almacén de humedad (Haug, 1993). Cuando se trabaja con un material poco poroso como los purines es necesario mezclarlos con materiales que confieran una estructura apropiada para la aireación y la capacidad de retención hídrica, y que además serán preferentemente inertes, desde el punto de vista químico (Costa et al., 1991).

1.2.3.3. El espacio de aire libre

Este parámetro se define como el porcentaje de poros ocupados por la fase gaseosa. La eficacia y la rapidez del proceso dependen de las limitaciones por falta de oxígeno o en la transferencia de oxígeno a la fase líquida. El espacio de aire libre y la porosidad pueden controlarse adicionando materiales que reducen la densidad de los materiales, incrementando ambos factores. Este tipo de materiales son denominados agentes estructurantes (Tseng et al., 1995).

El espacio de aire libre tiene en cuenta la estructura física de los residuos y relaciona el contenido de humedad, porosidad, densidad aparente y densidad real. El valor ideal óptimo fue calculado por Jeris y Regan (1973), y oscila entre 30-50%, independientemente de la naturaleza del residuo.

1.2.4. Parámetros básicos de control del proceso

Parámetros que deben ser medidos y monitorizados a lo largo de todo el proceso y que deben ser corregidos en caso de ser necesario (Bueno et al., 2008). Muchos de ellos, son considerados también de enorme importancia en la fase de acondicionamiento de los materiales, mencionada previamente. Entre los parámetros de control más relevantes se encuentran la temperatura, la humedad, el pH y la aireación, aunque otros parámetros físico-químicos como son la relación C/N, materia orgánica y conductividad, aportan información muy valiosa para decidir si el proceso evoluciona de forma adecuada (Figura 5). Otros indicadores enzimáticos o microbiológicos pueden ser útiles a la hora de controlar el proceso de compostaje y prever la idoneidad del producto final. Todos ellos serán descritos en apartados posteriores.

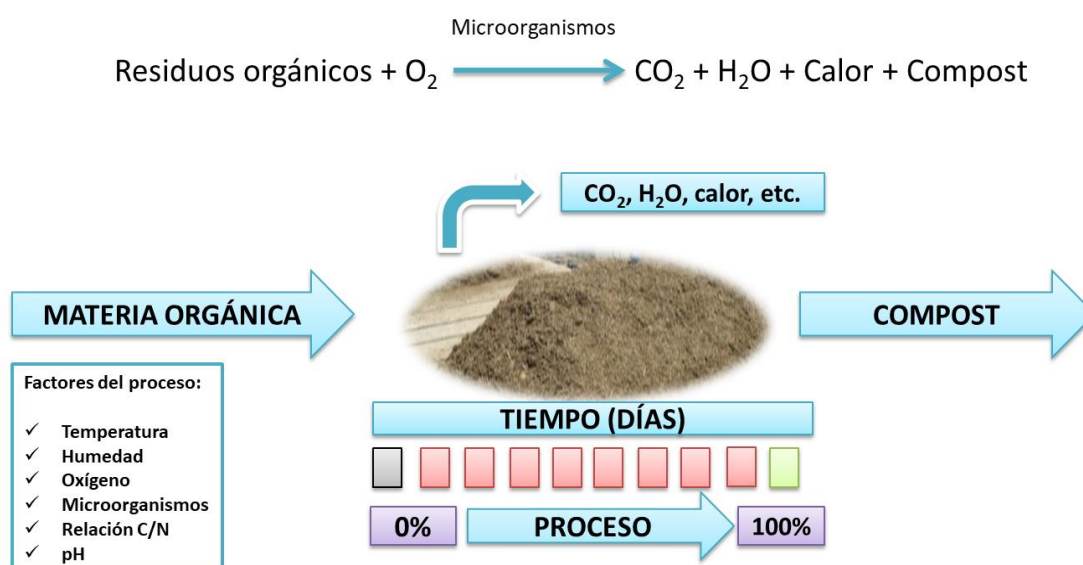


Figura 5. Parámetros de control del proceso de compostaje.

1.2.4.1. Temperatura

La temperatura es uno de los parámetros más importantes de control durante el proceso de compostaje, ya que para obtener un producto que cumpla con los estándares de calidad, el perfil térmico del proceso debe evolucionar de forma adecuada. Las variaciones térmicas observadas en el interior de las pilas de compostaje están directamente relacionadas con la actividad microbiana (Liang et al., 2003; Miyatake et al., 2006), la cual dirige el proceso de compostaje generando energía que se transforma en calor (Díaz y Savage, 2007). Así, la temperatura en la pila de compostaje asciende hasta valores que pueden alcanzar los 70-80°C. Dicho ascenso se produce de forma más o menos rápida, dependiendo de la naturaleza del material

compostado y del sistema de compostaje aplicado. Además, las altas temperaturas alcanzadas en las pilas son imprescindibles para la eliminación de microorganismos patógenos, parásitos y semillas de malas hierbas, los cuales suelen ser inactivados en el rango de temperatura de 35 a 55°C (Sztern y Pravia, 2002). Algunos de los patógenos más comunes que se pueden encontrar en una pila de compostaje, y que podrían afectar a la salud en humanos se muestran en la Tabla 4.

Es importante tener en cuenta que la temperatura óptima de cada proceso va a depender, principalmente, del tipo de materia prima que se utilice. De manera que va a depender de la máxima tasa de producción de dióxido de carbono, que está relacionada con la velocidad de degradación de la materia orgánica y, por tanto, con el consumo de oxígeno en función del metabolismo microbiano. De ahí surge la importancia del control de la temperatura durante la fase biooxidativa del proceso.

Tabla 4. Microorganismos patógenos y temperaturas de inactivación (Jones y Martin, 2003).

MICROORGANISMOS	TEMPERATURA	TIEMPO DE EXPOSICIÓN
<i>Salmonella</i>	55°C	1 hora
	65°C	15 minutos
<i>Escherichia coli</i>	55°C	1 hora
	65°C	15 minutos
<i>Brucella abortus</i>	55°C	1 hora
	65°C	3 minutos
<i>Parvovirus bovino</i>	55°C	1 hora
Huevos de <i>Ascaris lumbricoides</i>	55°C	3 días

1.2.4.2. Humedad

Al contrario de lo que ocurre con la temperatura, es complicado dar un valor estándar para este parámetro ya que muestra una gran dependencia con respecto a las propiedades del material compostado (tamaño de partícula, composición, capacidad de retención de agua, etc.) y a las condiciones operacionales aplicadas en cada caso (aireación forzada, tipo de pila, etc.). Al igual que ocurre con la temperatura, el grado óptimo de humedad va a depender del tipo de materia prima empleada, generalmente oscila entre el 50 y 60% (Bueno et al., 2008). No obstante, niveles en torno al 60% se reconocen como adecuados para la mayoría de los procesos. Los problemas asociados al contenido incorrecto de humedad incluyen ralentización e incluso inhibición de la actividad microbiana debido a bajos niveles de humedad, o condiciones de anaerobiosis cuando la humedad es excesiva.

1.2.4.3. Aireación

El compostaje es un proceso aerobio, lo cual implica que es necesaria la aireación correcta de los materiales para que ocurra el crecimiento óptimo de los microorganismos responsables del proceso (Moreno y Mormeneo, 2008). Las pilas de compostaje presentan porcentajes variables de oxígeno, en función de la compactación de los materiales y del contenido en humedad de las pilas. La parte externa contiene la misma cantidad de oxígeno que el aire (18-20%) mientras que, a mayor profundidad, éste disminuye en beneficio del dióxido de carbono (Ekinci et al., 2004). Cuando la concentración de oxígeno es inferior al 15%, la proporción de microorganismos aerobios disminuye a favor de los microorganismos anaerobios, ocasionando retardo en la descomposición de materia orgánica y, con ello, la producción de malos olores (metano, sulfuro de hidrógeno, etc.) (Bidlingmaier, 1996). Al contrario, un exceso de ventilación provocaría el enfriamiento de la masa y una alta desecación, lo cual se vería reflejado en la reducción de la actividad metabólica microbiana (Zhu, 2006; Bueno et al., 2008).

1.2.4.4. Materia Orgánica

Durante el proceso de compostaje se produce la mineralización de la materia orgánica gracias a la actividad microbiana, con la consiguiente pérdida de carbono. Dicha pérdida, que transcurre en dos etapas, puede suponer un 20% del peso del material compostado. Algunos de los compuestos que forman la materia orgánica sirven a los microorganismos para formar tejidos nuevos y otros se transforman en CO₂ y H₂O. La primera etapa se caracteriza por la rápida disminución de los carbohidratos. Las cadenas carbonadas más cortas pueden transformarse en compuestos más simples o, por el contrario, pueden reagruparse y formar moléculas más complejas, las cuales pueden ser metabolizadas por los microorganismos para dar CO₂ y H₂O como productos finales, además de biomasa celular, o compuestos húmicos. Tras el consumo de los compuestos lábiles, otros materiales más resistentes comienzan a degradarse lentamente en etapas posteriores, constituyendo el núcleo de los compuestos húmicos junto a productos de degradación de la etapa anterior (Tomati et al., 2000; Castaldi et al., 2005). Los nuevos compuestos formados durante la degradación de la materia orgánica poseen propiedades físico-químicas diferentes a los materiales de partida (Haug, 1993).

1.2.4.5. Ratio C/N

La concentración de carbono y de nitrógeno en la relación C/N resulta determinante a la hora de establecer la velocidad con la que tiene lugar el proceso de biotransformación, así como el potencial de pérdida de amonio. Una correcta relación

C/N al inicio del proceso se sitúa en el margen comprendido entre 25 y 30 (Zhang et al., 2020). Valores excesivamente bajos propician pérdidas de nitrógeno en forma de amoníaco mientras que los anormalmente altos provocan que el proceso transcurra de forma más lenta de lo deseado (Gao et al., 2010, Guo et al., 2012). Además de su importancia inicial, la ratio C/N también informa sobre la correcta evolución del proceso (Figura 6), ya que la acción microbiana a lo largo de éste tiende a provocar la pérdida de carbono en forma de CO_2 y, por tanto, a propiciar la caída de la relación (Vergara y Silver, 2019).

Los microorganismos utilizan 2/3 de C para la obtención de energía (respiración) y combinan 1/3 de éste con N para la formación de nuevas células. La actividad biológica se reduce si el material contiene mucho más C que N. Cuando ocurre lo contrario, el nitrógeno es eliminado en forma de amoníaco, lo que podría además derivar en olores desagradables, así como en productos finales pobres en nitrógeno.

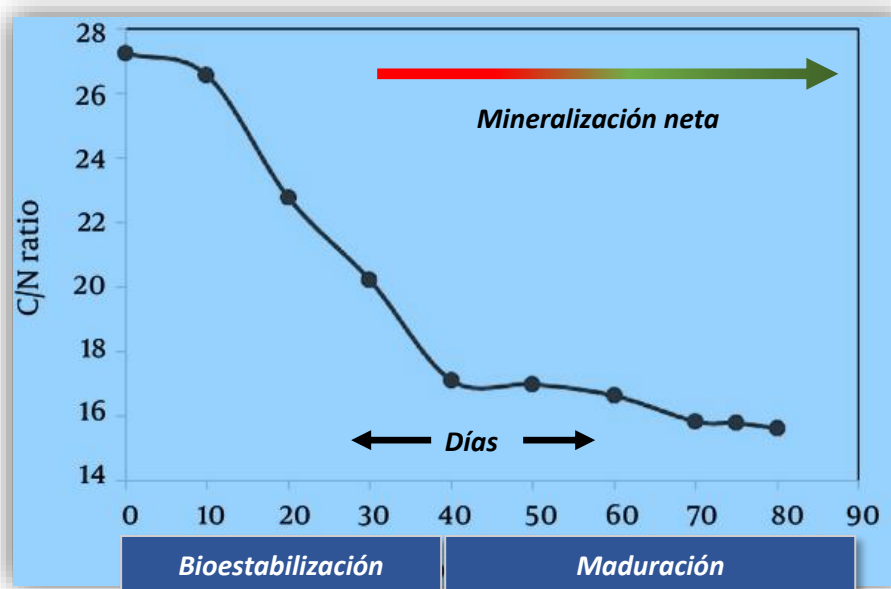


Figura 6. Evolución característica de la relación C/N durante el proceso de compostaje (adaptado de Bazrafshan et al., 2016)

1.2.4.6. pH

El pH evoluciona a lo largo del proceso de compostaje en paralelo a la biodegradación de las distintas fracciones de la materia orgánica, de forma que el protagonismo alcanzado por diferentes grupos microbianos dependerá, en parte, de la mayor o menor tolerancia de estos a los valores de pH alcanzados en cada fase del proceso. En este sentido, las bacterias requieren valores entre 6 y 7,5 mientras que los hongos se desarrollan mejor a valores de pH entre 5 y 8. Estos valores coinciden con el rango de

pH que se alcanza a lo largo del proceso, lo que permite la existencia de grupos microbianos muy diversos (Bueno et al., 2008).

1.2.4.7. Conductividad eléctrica

Otro de los parámetros que debe tenerse en cuenta como parámetro básico de control es la conductividad eléctrica. Ésta, refleja el contenido en sales, el cual depende, en parte, del estado de mineralización de la materia orgánica, y por tanto tiende a incrementarse durante el proceso de compostaje. En algunos casos se han detectado descensos debido a fenómenos de lixiviación provocados por una humectación excesiva de la misma, lo que puede provocar contaminación ambiental y fitotoxicidad. Este parámetro también puede afectar de manera considerable a la inhibición de la microbiota presente en los materiales que se están compostando (Bueno et al., 2008; Komilis y Tziouvaras, 2009).

1.2.5. Parámetros de seguimiento relativos a estabilidad y madurez

1.2.5.1. Fracciones lignocelulósicas

La lignocelulosa es el componente principal de los residuos vegetales. Está constituida por tres macromoléculas principales: celulosa, hemicelulosa y lignina. Aunque los tres polímeros tienen entidad propia, la asociación que existe entre ellos es tan elevada que, en la práctica, se puede considerar la existencia de una matriz compleja en la que se entrecruzan redes polisacáridicas de holocelulosa (hemicelulosa y celulosa) y lignina. Esta estrecha unión se debe a que la lignina es capaz de actuar como un factor de protección para las otras fracciones. En concreto, existe una fuerte interacción entre lignina y hemicelulosa, favorecida por la presencia de compuestos fenólicos (Malherbe y Cloete, 2002). Esta asociación intrincada dificulta el acceso a las enzimas implicadas en el proceso de biodegradación (Barrington et al., 2002).

Es evidente el interés que despierta la biotransformación de las fracciones más recalcitrantes durante el proceso de compostaje de residuos orgánicos. Sin embargo, dada la gran diversidad de materiales que se pueden compostar y su composición en relación con el contenido lignocelulósico, no es sorprendente que la bibliografía ofrezca datos tan heterogéneos e incluso contradictorios, relacionados con la tasa de degradación de las fracciones lignocelulósicas, así como respecto a las etapas del proceso que mejor reflejan la biotransformación de las mismas (Francou et al., 2008). Se han desarrollado diferentes índices que permiten una mejor interpretación del proceso de biotransformación. Este es el caso del índice Lignina/Holocelulosa, que

implica la previa determinación de las concentraciones de lignina, celulosa y hemicelulosa y que, según afirman algunos autores, permite una observación más precisa de la transformación de la biomasa vegetal (Franco et al., 2008).

1.2.5.2. Indicadores de Humificación

Las sustancias húmicas son muy importantes en el suelo ya que favorecen la retención de nutrientes vegetales en formas disponibles gracias a procesos de intercambio catiónico; intervienen en el transporte de metales hacia las raíces vegetales; participan en la formación y mantenimiento de la estructura del suelo; permiten la liberación lenta de nitrógeno, azufre, fósforo y algunos elementos traza; generan un efecto estimulante sobre el crecimiento vegetal y pueden inmovilizar sustancias nocivas, como es el caso de algunos pesticidas presentes en el suelo (Hayes et al., 1988). De hecho, cuando se añade al suelo carbono orgánico no humificado, éste es convertido finalmente en sustancias húmicas y energía, hecho que repercute positivamente sobre la microbiota y microfauna del entorno (Schnitzer, 1978; Suárez-Estrella et al., 2008 a, b).

La madurez del compost ha sido reconocida como uno de los problemas más importantes relacionados con su aplicación agronómica, ya que la aplicación de un compost inmaduro a los suelos de cultivo puede ocasionar un fracaso en el rendimiento final de los mismos. En este sentido, la determinación correcta del grado de madurez de la materia orgánica (estabilidad biológica y humificación) supone hoy día un problema en el control del proceso. Se han propuesto diversos métodos físicos, químicos y biológicos pero no son del todo satisfactorios, teniendo en cuenta la diversidad de compost existentes en función de las materias primas constituyentes (Chikae et al., 2006). Por tanto, es recomendable la aplicación combinada de determinados parámetros indicadores de humificación. De forma tradicional, el contenido de Carbono Extraíble Total (Extracto Húmico total), la concentración de ácidos fúlvicos, ácidos húmicos o incluso la suma de ambos, se han considerado parámetros suficientes a la hora de determinar el grado de humificación de un material. El principal problema reside en la complejidad de las sustancias tipo-húmico así como en la heterogeneidad de las materias primas de naturaleza orgánica ya que se puede sobreestimar el contenido de sustancias húmicas de estos, sobre todo en fases iniciales, ya que parte de los materiales no humificados interfieren con el fraccionamiento de sustancias húmicas (Ciavatta et al., 1990).

En función del tipo de materiales, puede ser conveniente considerar uno u otro indicador de humificación. Algunos de los índices más utilizados son los denominados

como Grado de Humificación, Proporción de Humificación o Proporción de sustancias no humificadas, entre otros (Sequi et al., 1986; Ciavatta et al., 1988). Por otro lado, los trabajos de Roletto et al. (1985) e Iglesias-Jiménez y Pérez-García (1992) también aportan diversos indicadores interesantes para medir el grado de humificación, entre ellos, la relación húmicos / fúlvicos, el porcentaje de ácidos húmicos o el índice de humificación.

Los ácidos húmicos (C_{AH}) y fúlvicos (C_{AF}) representan el contenido de sustancias húmicas en un compost maduro. Hay diferencias muy importantes entre ellos. Los ácidos húmicos son moléculas de mayor peso molecular, relacionadas con la fertilidad del suelo y el rendimiento del cultivo, y suponen un aporte importante de C, N, P, K y S al suelo. Los C_{AH} se encuentran en mayor concentración en el compost maduro, mientras que los C_{AF} , con un peso molecular menor que los C_{AH} , muestran una mayor concentración en los compost aún inmaduros (Mindari et al., 2014; Zhang et al., 2017). Ambas fracciones se caracterizan por su alto nivel de oxidación (Li et al., 2017). Por lo tanto, para conocer el grado de polimerización en materiales humificados, es muy útil calcular la relación C_{AH}/C_{AF} . Según Iglesias-Jiménez et al. (2008), los valores de C_{AH}/C_{AF} superiores a 1 indican que se está produciendo un proceso de humificación adecuado, de forma que se puede considerar que un compost está madura cuando los valores de C_{AH}/C_{AF} son superiores a 1,6. Por otra parte, la tasa de humificación (HR) se considera un indicador importante de la formación de sustancias húmicas durante el compostaje, ya que se puede establecer con precisión si la humificación se está llevado a cabo con éxito. Se considerando que el valor mínimo de HR de un compost maduro debe ser de 7 (Roletto et al., 1985; Tittarelli et al., 2002).

1.2.5.3. *Parámetros de nitrificación*

Durante el compostaje, el nitrógeno se distribuye entre distintas fracciones insolubles y solubles. Esta última comprende una mezcla de amonio, NO_2^- , NO_3^- , aminoácidos y péptidos. Durante el proceso de compostaje, los microorganismos proteolíticos y amonificantes prevalecen durante las etapas iniciales, dando lugar a la liberación de amonio y proteínas solubles, mientras que los nitrificantes suelen predominar durante la fase de maduración (Guardia et al., 2010).

De acuerdo con Sánchez-Monedero et al. (2001) el nivel de $N-NH_4^+$ puede usarse, junto con otros parámetros, como un indicador de estabilidad del compost. Así, deberían detectarse bajas concentraciones de $N-NH_4^+$ en muestras de compost consideradas como completamente maduras. En lo que se refiere al $N-NO_3^-$, durante el

proceso de compostaje se va incrementando con respecto a los valores detectados en las materias primas (Tognetti et al., 2007).

En los últimos años, se han estudiado muchos parámetros físico-químicos y bioquímicos asociados al proceso de compostaje. Este estudio ha tratado principalmente de combinar diferentes criterios para establecer indicadores adecuados de madurez y estabilidad para el producto final. Uno de estos criterios se basa en el cálculo de la relación $N-NH_4^+ / N-NO_3^-$, también denominada como índice de nitrificación (Onwosi et al., 2017). Dicho índice debe ser lo más bajo posible al final del proceso de compostaje. El valor de índice de nitrificación se usa generalmente para clasificar los compost como completamente maduro (índice de nitrificación de 0,5); maduro (entre 0,5 y 3,0) e inmaduro (por encima de 3,0). Sin embargo, de acuerdo con los otros autores (Bernal et al., 1998), la relación $N-NH_4^+ / N-NO_3^-$ debe ser inferior a 0,16 para considerar que un compost está completamente maduro.

1.2.5.4. Pérdidas de nitrógeno

El nitrógeno es uno de los nutrientes más importantes que controlan la producción primaria neta en los ecosistemas (Jones et al., 2004). Por tanto, es lógico pensar que las poblaciones microbianas presentes en las pilas de compostaje dependen en gran medida de la relación C/N disponible (Sepelri y Sarrafzadeh, 2018). Por otra parte, hay que tener en cuenta que la transformación de las fracciones de nitrógeno durante el compostaje es muy compleja, lo que sumado al manejo inadecuado del proceso, podría ir acompañado de pérdidas significativas de nitrógeno (Bao et al., 2008; Zhu et al., 2019). Tales pérdidas pueden producirse debido a la volatilización del amoníaco o a fenómenos de lixiviación (Zhang et al., 2016). De acuerdo con Sánchez-Monedero et al. (2001) el porcentaje de pérdida de nitrógeno depende de la composición inicial de la materia prima utilizada. Las pérdidas de N podrían reducir el valor de nutrientes del compost final y también causar problemas de contaminación atmosférica (Zhang y Sun, 2015). La mayor parte del N generalmente se pierde por la volatilización del NH_3 cuando el pH y las temperaturas son elevados, lo que ocurre particularmente durante la fase termófila del proceso de compostaje.

1.2.6. Indicadores microbianos de especial relevancia durante el proceso de compostaje

1.2.6.1. Microbiota asociada al proceso de compostaje

Durante el compostaje, los microorganismos llevan a cabo la descomposición biológica de la materia orgánica (Wang et al., 2016; Zhou et al., 2017), lo que da como resultado un producto estable y humificado. A lo largo del proceso, la diversidad microbiana (bacterias, actinobacterias, levaduras y hongos) varía en función de la sucesión de distintas fases térmicas. Este fenómeno está directamente influenciado por una amplia variedad de factores fisicoquímicos, como la humedad, el pH, la conductividad eléctrica, la disponibilidad de nutrientes o el consumo de oxígeno (Wang et al., 2015). Además, las materias primas y los acondicionadores utilizados para la constitución inicial de las pilas también influyen de forma significativa en la evolución de la biodiversidad a lo largo del proceso (Tiquia, 2005; Partanen et al., 2010; Jurado et al., 2020). Existen, en este sentido, claras evidencias de que la transformación adecuada de la materia orgánica y la calidad del compost final dependen en gran medida de la composición cualitativa y cuantitativa de los microorganismos asociados a los materiales compostados (Pepe et al., 2013).

Es difícil generalizar en cuanto al número total de microorganismos que se pueden encontrar durante el compostaje, así como a la diversidad de especies identificadas, ya que cada proceso de compostaje podría considerarse único (Estrella-González et al., 2020). No obstante, se estima que la biomasa bacteriana pueda estar en torno a 10^9 - 10^{13} células / g de peso fresco durante la fase mesófila y de 10^8 - 10^{12} células / g durante la fase termófila (Ryckeboer et al., 2003). La estructura y diversidad de la comunidad microbiana del compostaje cambia para adaptarse a los cambios ambientales que ocurren durante el mismo, tales como incremento de la temperatura, evaporación del agua, y condiciones limitantes de oxígeno. En términos generales, se puede considerar que al inicio del proceso predomina la actividad de bacterias mesófilas y termotolerantes, que utilizan sustancias carbonadas solubles y de fácil degradación (azúcares y aminoácidos), ocasionando una disminución del pH, como consecuencia de la producción de ácidos orgánicos. La actividad metabólica de estos grupos microbianos en esta fase da lugar a un aumento de la temperatura de la pila, dando paso a la etapa termófila, en la que bacterias Gram positivas, tales como *Bacillus spp.* y Actinobacterias, llegan a ser dominantes (Partanen et al., 2010). Durante la transición entre fase mesófila y termófila también aparecen hongos, pero con un menor peso específico en el desarrollo del proceso, como consecuencia de su menor tolerancia a las elevadas temperaturas que se alcanzan (Peters et al., 2000). Al final del proceso, durante las etapas de enfriamiento y maduración, aparecen en mayor cantidad los hongos que han sido capaces de persistir gracias a la producción de estructuras de resistencia, o bien aquellos que han colonizado las pilas desde el exterior, aprovechando la bajada de temperatura. En las Tablas 5 y 6 se enumeran los géneros procariotas y eucariotas tradicionalmente detectados en procesos de compostaje.

A continuación, se describe de forma detallada aquellos grupos microbianos de mayor relevancia en función de las fases térmicas del proceso de compostaje:

- **Fase mesófila ($T^a < 45\text{ }^{\circ}\text{C}$):** al inicio del proceso, los residuos se encuentran a temperatura ambiente y con un pH ligeramente ácido, por lo que cobrarán especial protagonismo los microorganismos mesófilos y termotolerantes (Riddech et al., 2002). El tiempo medio de generación de las bacterias es mucho más corto que el de hongos y actinobacterias, lo que les proporciona una ventaja competitiva. Como resultado, el número de bacterias es normalmente más alto, siendo éstas responsables de la mayor parte de la descomposición inicial y la generación de calor en las pilas, siempre que se cubran las necesidades básicas de crecimiento. Las bacterias descritas en esta fase pertenecen a diferentes familias, entre las que destacan, *Alcaligenaceae*, *Alteromonadaceae*, *Bacillaceae*, *Burkholderiaceae*, *Bradyrhizobiaceae*, *Caryophanaceae*, *Caulobacteraceae*, *Cellulomonadaceae*, *Clostridiaceae*, *Comamonadaceae*, *Corynebacteriaceae*, *Enterobacteriaceae*, *Flavobacteriaceae*, *Flexibacteraceae*, *Hyphomicrobiaceae*, *Intrasporangiaceae*, *Methylobacteriaceae* o *Microbacteriaceae*. Uno de los géneros bacterianos predominantes en esta etapa es *Bacillus*. La diversidad de especies de este género es alta a temperaturas de hasta $50\text{ }^{\circ}\text{C}$, dando paso a las formas típicas de resistencia bacteriana (endosporas), las cuales sobreviven gracias al mantenimiento de un metabolismo basal. Por otro lado, una alta diversidad de especies fúngicas pueden detectarse en el rango de temperaturas mesófilas (Hansgate et al., 2005), predominando los géneros *Aspergillus* y *Penicillium*, seguidos de *Trichoderma*, *Mucor*, *Rhizopus*, *Cladosporium*, *Backusella*, *Ulocladium*, *Acremonium*, *Fusarium*, *Scopulariopsis* y *Geotrichum*. Por su parte, las actinobacterias (bacterias filamentosas) se desarrollan a tasas de crecimiento inferiores a la mayoría de bacterias y hongos, y por tanto compiten ineficientemente cuando el nivel de nutrientes es alto (Hoitink y Boehm, 1999). En esta fase predominan géneros pertenecientes a la familia *Nocardiaceae*.

Tabla 5. Géneros procarioritas detectados en compostaje (Modificado de Ryckeboer et al., 2003; Fracchia et al., 2006; Cayuela et al., 2009; Partanen et al., 2010; Ohnishi et al., 2011; Xiao et al., 2011a y 2011b; Karadag et al., 2013; Tian et al., 2013).

○

Dominio Bacteria									
Phylum Proteobacteria									
α-proteobacterias									
Azospirillum	Brevundimonas	Maricaulis	Nitrobacter	Phyllobacterium	Xanthobacter				
Bradyrhizobium	Caulobacter	Methylobacterium	Paracoccus	Rhodovulum					
β-proteobacterias									
Achromobacter	Alcaligenes	Chromobacterium	Janthinobacterium	Paucimonas					
Acidovorax	Burkholderia	Comamonas	Nitrosomonas	Variovorax					
γ-proteobacterias									
Acinetobacter	Citrobacter	Escherichia	Lysobacter	Pantoea	Pseudomonas	Salmonella	Xantomonas		
Aeromonas	Enterobacter	Haemophilus	Methylocaldum	Proteus	Pseudoxanthomonas	Serratia	Xylella		
Azotobacter	Erwinia	Klebsiella	Moraxella	Pseudoalteromonas	Psychrobacter	Stenoprophomonas	Yersinia		
ε-proteobacterias									
Campylobacter	Helicobacter								
Phylum Firmicutes									
Bacilli									
Amphibacillus	Brevibacillus	Geobacillus	Paenibacillus	Sporosarcina	Thermoactinomyces	Vagococcus			
Aneurinibacillus	Caryophanon	Laceyella	Planococcus	Sthaphilococcus	Trichococcus				
Bacillus	Enterococcus	Lactobacillus	Solibacillus	Streptococcus	Ureibacillus				
Clostridia									
Acetobacterium	Clostridium	Desouifotomaculum	Tissierella						
Phylum Bacteroidetes									
Bacteroides	Chryseobacterium	Flexibacter	Symbiobacterium						
Cytophaga	Flavobacterium	Sphingobacterium							
Phylum Actinobacteria									
Actinomadura	Brachybacterium	Curtobacterium	Micrococcus	Propionibacterium	Saccharopolyspora	Thermopolyspora			
Actinomycetes	Brevibacterium	Dietzia	Microbiospora	Pseudonocardia	Streptomyces	Yaniella			
Aeromicrobium	Cellulomonas	Georginia	Micromonospora	Rathayibacter	Terrabacter				
Amycolatopsis	Cellulosimicrobium	Kocuria	Nocardia	Rhodococcus	Thermobifida				
Arthrobacter	Corunebacterium	Microbacterium	Planomonospora	Saccharomonospora	Thermobispora				
Phylum Deinococcus-Thermus									
Thermus									
Phylum Aquificae									
Hydrogenobacter									
Dominio Archaea									
Methanothermobacter									

Tabla 6. Géneros eucariotas detectados en compostaje (Modificado de Ryckeboer et al., 2003; Langarica-Fuentes et al., 2014a y 2014b).

○

Reino Fungi										
Clase Ascomycetes										
Acremonium	Botryotinia	Doratomyces	Gliocladium	Metarhizium	Papulaspora	Scoleobasidium	Torulopsis			
Acremonium	Botryotrichum	Emericella	Gliomastix	Microascus	Penicillium	Scopulariopsis	Trichocladiu			
Acrophialophora	Botrytis	Engyodontium	Graphium	Myriococcum	Peziza	Scytalidium	Trichoderm			
Aleurisma	Candida	Epicoccum	Gymnoascacea	Mollisia	Phialemonium	Sepedonium	Trichophae			
Alternaria	Cephalophora	Eremascus	Harpographium	Monilia	Phoma	Sordaria	Trichotheciu			
Aphanoascus	Cephalosporium	Eurotium	Heterosporium	Monotospora	Phomopsis	Spicaria	Trichurus			
Apiospora	Chaetomium	Eutypella	Hormiscium	Myceliophthora	Pichia	Sporothrix	Ulocladium			
Arthrinium	Chrysosporium	Exophiala	Humicola	Mycogone	Pithomyces	Stachybotrys	Verticillium			
Arthrotrichy	Cladosporium	Fennellia	Hypocrea	Myrothecium	Plectosporium	Staphylotrichum	Volutella			
Arthrographis	Clonostachys	Fusarium	Hypomyces	Nectria	Preussia	Stemphylium	Westerdykella			
Ascodesmis	Coniothyrium	Gelasinospora	Kernia	Neosartorya	Pseudallescheria	Talaromyces				
Ascotricha	Coenomeria	Geomyces	Kluyveromyces	Nigrospora	Pseudogymnoascus	Thermoascus				
Aspergillus	Corynascus	Geosmithia	Leptographium	Oedocephalum	Pullularia	Thermomyces				
Aureobasidium	Curvularia	Geotrichum	Macrosporium	Oidiodendron	Rhinocladiella	Thielavia				
Beauveria	Cylindrocarpum	Gilmaniella	Malbranchea	Oidium	Rollandina	Thielaviopsis				
Botryosporium	Dactylaria	Gliobotrys	Melanocarpus	Pacilomyces	Scedosporium	Thysanophora				
Phylum Basidiomycota										
Agaricus	Coprinopsis	Gloeophyllum	Moniliella	Panaeolus	Sistotrema	Trametes				
Armillaria	Coprinus	Lentinus	Mycena	Pleurotus	Sporotrichum	Trichosporon				
Clitopilus	Fomes	Lenzites	Oospora	Rhodotorula	Stereum					
Phylum Zygomycota										
Absidia	Cirrinella	Mortierella	Piptocephalis	Rhizopus	Syncephalis					
Actinomucor	Cunninghamella	Mucor	Rhizomucor	Stylopage	Zygorhynchus					
Reino Chromista										
Phylum Oomycota										
Pythium										

○ **Fase termófila ($T^a > 45\text{ °C}$):** al inicio de esta fase, debido a que las sustancias fácilmente degradables se agotan, se observa un predominio del grupo de las actinobacterias, que junto con algunas especies de *Bacillus* comienzan a metabolizar proteínas, incrementándose la liberación de amoníaco con la consiguiente alcalinización del medio (Tuomela et al., 2000). El incremento de la temperatura provoca una aceleración de la degradación, asociada a la rápida transición de la microbiota mesófila a termófila. En general, la diversidad de especies bacterianas disminuye significativamente durante esta fase (Hansgate et al., 2005). Así, las bacterias pertenecientes al género *Bacillus*, muy activas en la fase anterior, sólo sobreviven formando endosporas que, posteriormente, les permitirán “reactivarse” cuando las condiciones ambientales sean óptimas (Beffa et al., 1996; Ryckeboer et al., 2003). Por tanto, a temperaturas superiores a 60 °C , el proceso de degradación es llevado a cabo principalmente por bacterias termófilas que no forman esporas, como es el caso de *Hydrogenobacter spp.* y *Thermus spp.*, que son las descomponedoras dominantes a temperaturas superiores a 70 °C , llegando a encontrarse incluso a temperaturas de hasta 82 °C (Blanc et al., 1999). Los hongos también disminuyen en número y diversidad durante esta etapa, ya que el rango de termofilia en este caso es generalmente menor, siendo su temperatura óptima de 40 a 55 °C , con un máximo de 60 a 62 °C . Si la temperatura supera dicho valor, los hongos mueren o permanecen transitoriamente inactivos en forma de esporas (Beffa et al., 1996; Ryckeboer et al., 2003; Van Gestel et al., 2003). Es difícil encontrar levaduras durante esta fase, pero cuando la temperatura desciende hasta los 50 - 55 °C , pueden observarse de nuevo en el proceso (Choi y Park, 1998; Ryckeboer et al., 2003). Algo diferente ocurre con las actinobacterias termófilas o termotolerantes, ya que este grupo microbiano soporta mejor que los hongos las temperaturas altas. El predominio de las actinobacterias se ve además favorecido por la disminución de la humedad y el aumento del pH durante esta fase. Son, además, responsables del olor característico a tierra mojada típico del compost, debido a la producción de geosmina, un sesquiterpenoide. Las actinobacterias compiten con otros microorganismos por los nutrientes, además de inhibir el crecimiento de otras especies mediante la producción de antibióticos, enzimas líticas o incluso por parasitismo (Trillas-Gay et al., 2014). Este grupo microbiano juega un papel fundamental en el proceso de compostaje al degradar polímeros naturales y colonizar la materia orgánica después de que las bacterias y los hongos hayan consumido las fracciones fácilmente degradables. Los sistemas enzimáticos que presentan les permiten degradar materiales de difícil metabolización, además de compuestos de carácter xenobiótico (Steger et al., 2007; Huang et al., 2010; Kawai, 2010). Las actinobacterias más comunes aisladas durante el proceso de compostaje pertenecen a la familia *Streptomycetaceae*.

- **Fase de enfriamiento:** la actividad microbiana es menor durante esta etapa, debido a que la fuente de carbono directamente disponible comienza a ser un factor limitante y a que, después de las altas temperaturas alcanzadas en la fase termófila, la población microbiana disminuye en número y diversidad. En esta fase, vuelven a desarrollarse microorganismos mesófilos, mayoritariamente hongos, aunque también bacterias y actinobacterias capaces de formar estructuras de resistencia, cuyas esporas permanecían en la pila, o bien otras que recolonizan las pilas desde el exterior (Fogarty y Tuovinen, 1991).

- **Fase de maduración:** durante esta fase se observa un incremento de la diversidad de actinobacterias mesófilas y termotolerantes, igual que ocurre con los hongos filamentosos. Esto se debe a su capacidad para degradar polímeros naturales complejos (lignina, hemicelulosa, celulosa). La mayoría de los microorganismos presentes en esta fase poseen actividad celulolítica, amilolítica, amonificante y /o proteolítica (Moreno, 2005). Asimismo, se han descrito especies fijadoras libres de nitrógeno, desnitrificadoras y sulfato reductoras. Además, en esta fase las bacterias representan el 80% del recuento total de microorganismos y una pequeña proporción corresponde a bacterias esporuladas. En definitiva, como consecuencia del tipo de complejos que se forman a partir de este momento, el material de la pila de compostaje, así como la diversidad taxonómica y metabólica de la misma se ven notablemente modificados, lo cual es fundamental a la hora de conseguir un compost estable y de calidad (Beffa et al.,1996; Neklyudov et al.,2008).

Sin embargo, el conocimiento profundo de los microorganismos que componen una pila de compost no es tarea fácil debido a las limitaciones que tienen determinados grupos microbianos para crecer bajo condiciones de laboratorio, fuera de su entorno natural (Ogino et al., 2001; Chandna et al., 2013). De hecho, se estima que sólo entre el 1 y el 10% de los microorganismos implicados en un proceso de compostaje son cultivables, lo que dificulta el conocimiento integral de los mismos mediante este tipo de procedimientos. En este sentido, los avances relacionados con la metagenómica del proceso de compostaje (ver, más adelante, apartado 1.2.5.3.), han proporcionado información muy valiosa en lo que se refiere a la presencia de grupos microbianos que nunca antes se habían detectado debido, fundamentalmente, a su limitación para crecer en medios de cultivo comúnmente utilizados en el laboratorio.

1.2.6.2. Bioindicadores enzimáticos

En paralelo al seguimiento de parámetros fisicoquímicos durante el proceso de compostaje, la caracterización enzimática de las distintas fases del mismo ha servido de herramienta para evaluar la estabilidad y madurez de un compost. La evolución de parámetros como la relación C/N, relación húmicos/fúlvicos (Iglesias-Jiménez y Pérez-García, 1992), relación amonio/nitrato (Bernal et al., 1998), índice de germinación (Emino y Warman 2004) o determinados índices respirométricos (AT₄ o DRI₂₄) (Barrena-Gómez et al., 2006), así como las actividades deshidrogenasa, glucosidasa, fosfatasa, esterasa, proteasa o ureasa (Tiquia, 2002, 2005), pueden resultar válidos a la hora de evaluar la idoneidad de un proceso de compostaje.

La eficiencia del compostaje como proceso biodegradativo depende de la composición microbiana de los materiales y de su actividad metabólica, ya que de ello dependerá la velocidad a la que los sustratos serán degradados (Estrella-González et al., 2020). Las enzimas implicadas en la biotransformación de la materia orgánica durante el compostaje pueden diferenciarse en función del elemento en cuyo ciclo están implicadas: Carbono, Nitrógeno y Fósforo. Las principales formas del carbono en la materia orgánica se encuentran en forma de polisacáridos, como la celulosa, hemicelulosa y almidón, así como de otras moléculas más complejas como la lignina, o en forma de ésteres de ácidos grasos. Por su parte, la mayor parte del nitrógeno orgánico se encuentra en forma de amidas enlazadas mediante uniones peptídicas (proteínas) o no peptídicas (urea) (Knicker et al., 1997), mientras que el fósforo orgánico se encuentra mayoritariamente en forma de mono o di-ésteres (Dalal, 1977). Para cada uno de estos polímeros principales existen enzimas microbianas capaces de romper los enlaces y liberar compuestos oligo- o monoméricos, mediante despolimerización extracelular. Estos productos de degradación, a su vez, podrán ser incorporados por los microorganismos como fuente de energía o nutrientes. Por este motivo, caracterizar y cuantificar las distintas actividades enzimáticas que participan en el proceso de compostaje puede ser reflejo de la dinámica del proceso en lo que respecta a la degradación de la materia orgánica (De La Horra et al., 2005; Goyal et al., 2005) y a las distintas transformaciones que experimentan las fracciones nitrogenadas (Saviozzi et al., 2004; Benítez et al., 2005), proporcionando así, una valiosa información acerca de la estabilidad (Mondini et al., 2004) y madurez de los productos obtenidos (Cunha-Queda et al., 2002; Tiquia, 2005).

A continuación, se tratarán individualmente los aspectos relacionados con la biotransformación de la materia orgánica, en función de las distintas fracciones que la componen y teniendo en cuenta que gran parte del material destinado a su revalorización en procesos de compostaje, tiene su origen en material vegetal:

Biodegradación de la lignina: La lignina es una de las moléculas naturales más difíciles de degradar. El número de especies microbianas genéticamente dotadas para llevar a cabo su degradación completa es insignificante, siendo los hongos de la podredumbre blanca los que muestran un mayor grado de eficacia (Couto et al, 2002). Proteobacterias y actinobacterias congregan el mayor porcentaje de procariontes involucrados en el proceso de degradación de la lignina (Castillo et al., 2013). Las dos grandes familias de enzimas que intervienen en la despolimerización de la lignina son las lacasas, que poseen actividad polifenol oxidasa, y las peroxidasas, capaces de oxidar sustratos fenólicos y no fenólicos.

Biodegradación de celulosa: Como se ha referido con anterioridad, su transformación se encuentra limitada por la asociación que esta macromolécula presenta de forma natural con otros polímeros (Pérez et al., 2002). A pesar de que la celobiosa es su única unidad estructural, son necesarios distintos tipos de enzimas para la hidrólisis, cuya funcionalidad se diferencia de acuerdo con la zona de actuación y el tipo de molécula diana (Levy et al., 2002).

Biodegradación de hemicelulosa: Bajo el nombre de hemicelulosa se agrupan un conjunto de polímeros altamente variables en su composición química, y cuya degradación implica hasta 24 tipos de enzimas. Al igual que las celulasas, éstas son enzimas de carácter hidrolítico que actúan sobre enlaces β -glucosídicos, generando azúcares sencillos (Perez et al., 2002). Las más estudiadas son las responsables de la hidrólisis del xilano, xilanasas, dado que es el tipo más común de hemicelulosa (Ahmed et al., 2001). Además de las endoxilanas y xilosidasas, que componen el sistema enzimático de las xilanasas, participan también diversas enzimas auxiliares que poseen gran importancia en la degradación del xilano (Xiong, 2004).

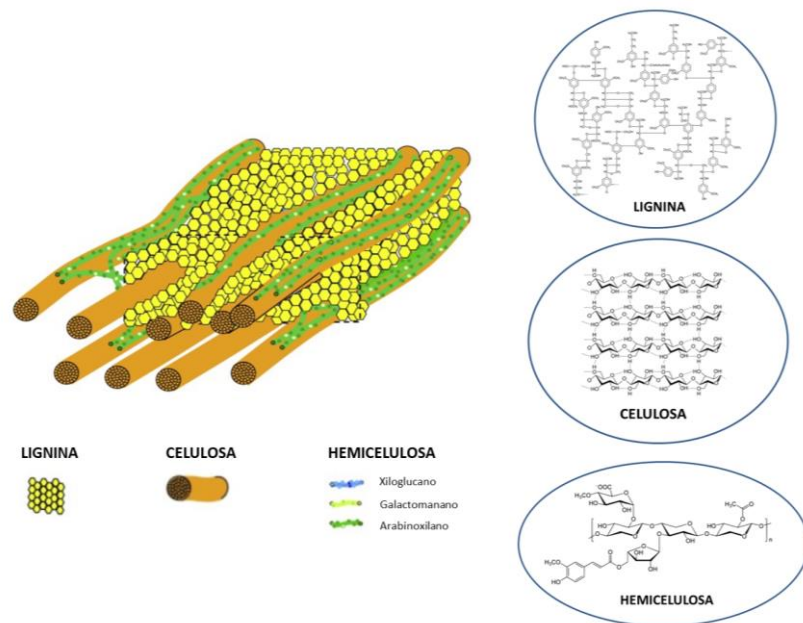


Figura 7. Estructura y composición de la pared celular vegetal (Adaptado de Loqué et al., 2015).

Biodegradación de almidón: Los componentes principales del almidón son la amilopectina y la amilosa, formadas por unidades de glucosa, pero en el caso de la amilosa, unidas por enlaces α -(1,4), generan una cadena lineal, mientras que en el caso de la amilopectina se trata de una estructura ramificada en la que los monómeros de glucosa se enlazan mediante uniones α -(1,6) (Figura 8). Las enzimas encargadas de la degradación de esta molécula son las amilasas, que se dividen en α -amilasas, β -amilasas, amiloglucosidas y pululanasa. Actúan sobre el almidón hidrolizando enlaces glucosídicos α -(1,4) y α -(1,6).

Biodegradación de pectinas: Las sustancias pécticas conforman un amplio grupo de polímeros de naturaleza mayoritariamente sacarídica, cuya principal característica es la heterogeneidad, tanto en lo que concierne a unidades monoméricas constituyentes, como con respecto a los enlaces mediante los que se unen (Ridley et al., 2001; O'Neill et al., 2004). No obstante, todas tienen el nexo común de presentar hasta un 70% de subunidades de ácido D-galacturónico (Mohnen, 2008). Se encuentran altamente interconectadas con la matriz lignocelulósica (Zykwinska et al., 2005), por lo que su degradación tampoco ha de considerarse como un proceso aislado. De hecho, la relajación de las pectinas permite el acceso de enzimas hasta el resto de polisacáridos de la pared celular (Lagaert et al., 2009) (Figura 9).

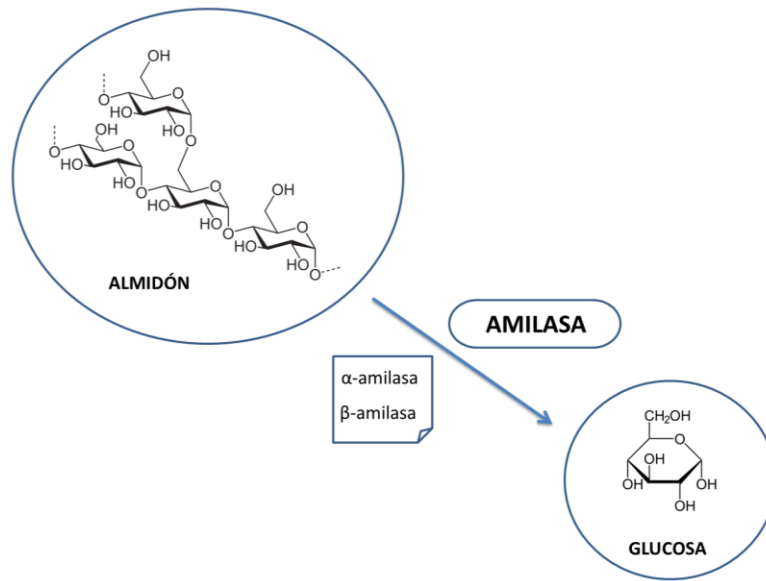


Figura 8. Degradación del almidón.

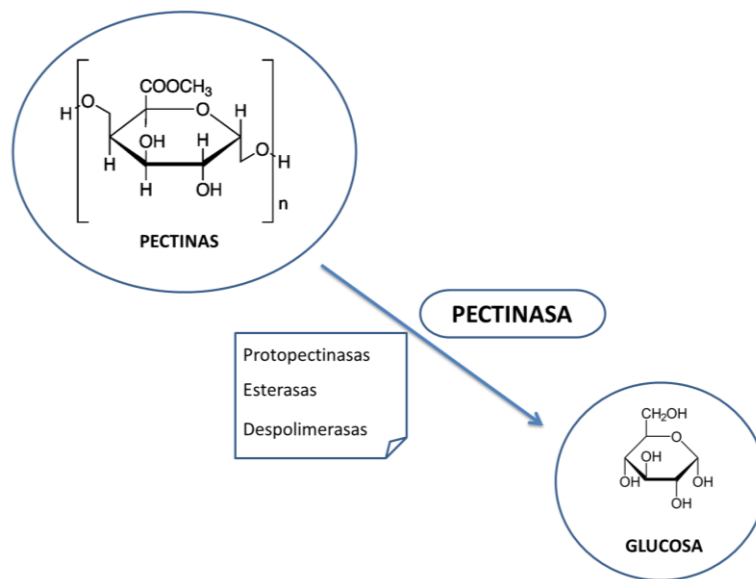


Figura 9. Degradación de la pectina.

Biodegradación de proteínas: Las enzimas responsables de la degradación de estas macromoléculas son las proteasas, que presentan un alto grado de especificidad y que catalizan la rotura de los enlaces peptídicos en péptidos y/o aminoácidos. El proceso de hidrólisis ocurre en tres pasos consecutivos. Primero se forma el complejo sustrato-enzima, después se produce la rotura del enlace peptídico y, por último, el ataque nucleofílico de una molécula de agua, liberándose de esta manera un péptido o un aminoácido (Adler-Nissen, 1993). En términos generales, las proteasas se subdividen en exopeptidasas y endopeptidasas, dependiendo de la zona de la proteína en la que actúen (Figura 10).

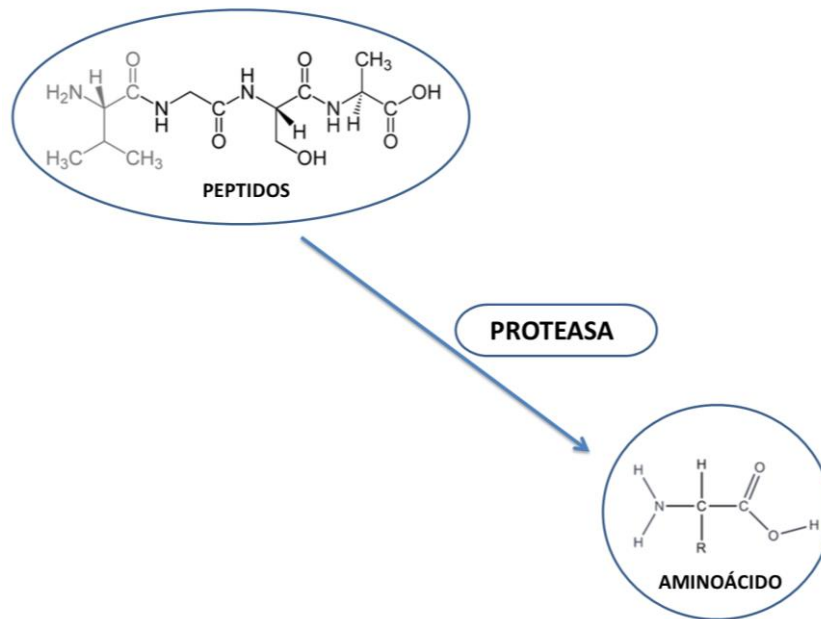


Figura 10. Degradación de proteínas.

Biodegradación de lípidos: Los lípidos constituyen un grupo estructuralmente diverso, por lo que no se puede hablar de un único proceso transformativo mediante el cual se pueda llevar a cabo la transformación de todas y cada una de las distintas formas lipídicas existentes en los materiales que sufren un proceso de compostaje. Por otra parte, su degradación se encuentra limitada como consecuencia del efecto antimicrobiano que algunos de los compuestos intermedarios generados en el proceso pueden ejercer (Desbois y Smith, 2010), así como los valores de pH, atribuibles en parte a la propia actividad lipolítica (Sugimori et al., 2002). En el caso de los lípidos más comunes, los glicerolípidos, y en concreto, los triglicéridos y fosfolípidos, las lipasas (ester-hidrolasas carboxílicas), enzimas muy versátiles, rompen los enlaces de los acilglicéridos mediante la adición de una molécula de agua, dando lugar a ácidos grasos libres y glicerol (Bornscheuer, 2002; Gupta et al, 2004).

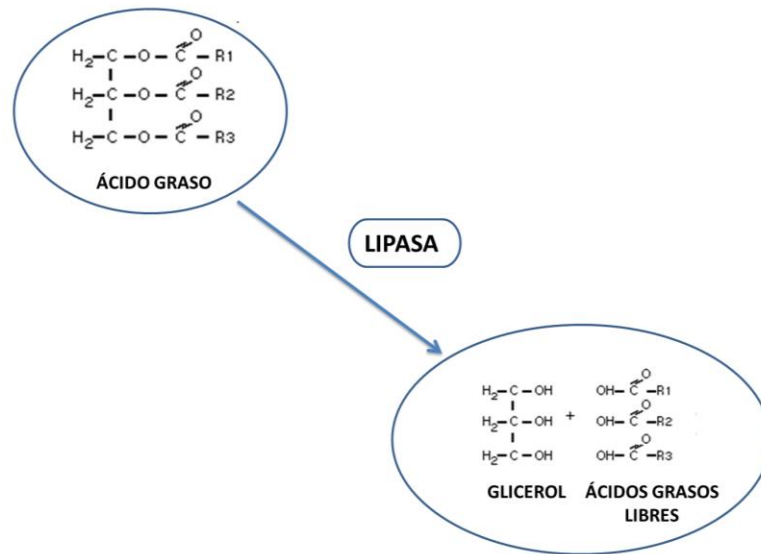


Figura 11. Degradación de lípidos.

1.2.6.3. Análisis metagenómico

Resulta imposible detectar mediante técnicas tradicionales dependientes de cultivo la enorme diversidad de microorganismos existentes en un proceso de compostaje (Tyson y Banfield, 2005). Existen diferentes razones por las que es imposible cultivar y aislar la mayor parte de los microorganismos hasta el momento desconocidos. El motivo más importante es la incapacidad de muchos de ellos para crecer de forma aislada, ya que establecen consorcios con otros microorganismos. Otros motivos son la exigencia de determinados nutrientes, la presencia de inhibidores o la acumulación de productos de desecho tóxicos, derivados del propio metabolismo microbiano, entre otros (Handelsman 2004; Simu y Hagstrom, 2004). Para evitar el crecimiento de especies microbianas de crecimiento rápido, los medios ricos en nutrientes, se sustituyen por medios más pobres como estrategia para identificar microorganismos oligotrofos hasta el momento desconocidos (Connon y Giovannoni, 2002; Zengler et al., 2002). En el caso de microorganismos procedentes de hábitats muy complejos, se han desarrollado técnicas más sofisticadas (Kaeberlein et al., 2002; Wery et al., 2003), entre ellas la encapsulación de células en microgotas de gel (Zengler et al., 2002).

En los últimos años, ha cobrado fuerza el estudio de las comunidades de microorganismos no cultivables, debido al extraordinario interés que ello supone en distintos ecosistemas. Para ello, se utiliza la metagenómica, que permite el estudio de los microorganismos a partir de su material genético, accediendo de este modo tanto a los microorganismos susceptibles de ser cultivados en un laboratorio como a aquellos

imposibles de cultivar, al menos con las técnicas tradicionales. La metagenómica permite, además, abarcar el estudio de los microorganismos desde dos perspectivas:

- ✓ Análisis filogenético: permite analizar la diversidad de una muestra.
- ✓ Análisis funcional y metabólico: se emplea la asociación con enzimas y otros productos metabólicos de interés.

La metagenómica ha permitido avanzar en el conocimiento que se posee sobre las comunidades microbianas conocidas, a una velocidad muy superior a la que permiten las técnicas de cultivo *in vitro*. Sin embargo, presenta limitaciones, entre las que destacan la dificultad para realizar un rastreo adecuado para obtener un material genético de calidad a partir de muestras ambientales (lo que repercute en una baja representatividad de la genoteca), o para identificar actividades de interés, gracias a la expresión de los genes en hospedadores heterólogos.

Los términos microbioma y microbiota se usan indistintamente para describir la comunidad de microorganismos que viven en un ambiente dado. Las tecnologías de secuenciación de ADN de alto rendimiento han impulsado la investigación del microbioma al permitir el estudio global del genoma de una población de microorganismos en un entorno dado, así como una cuantificación más precisa de la abundancia y funcionalidad del microbioma. La Figura 12 indica de forma esquemática los pasos principales de un estudio metagenómico: (1) Extracción y secuenciación de los amplicones de ADN microbiano, (2) Procesamiento de la secuencia bioinformática, y (3) Análisis estadístico.

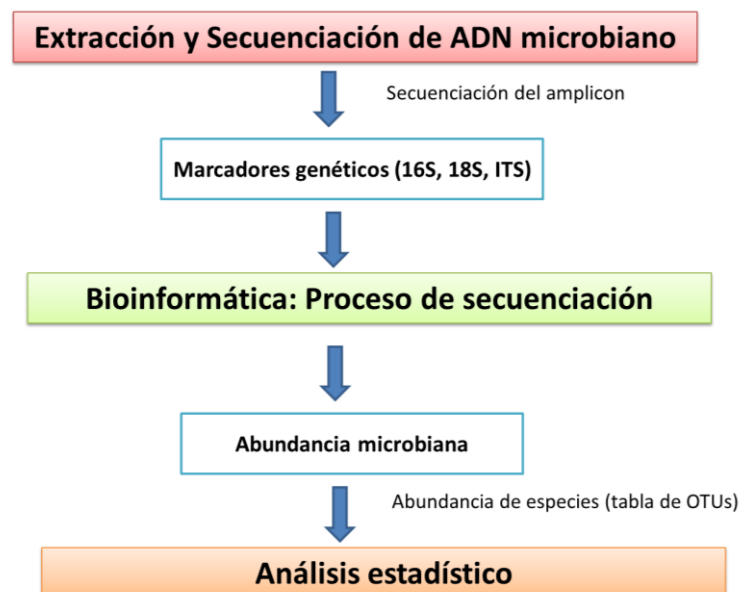


Figura 12. Secuencia de pasos en un estudio metagenómico.

Fue Woese quien propuso el uso de los ARNr como cronómetros moleculares universales. Posteriormente, se establecieron como marcadores filogenéticos que hoy día son ampliamente utilizados. Los principales marcadores filogenéticos son, en el caso de procariontes, el gen ARNr 16S, mientras que para eucariotas se emplea la región ITS (Internal Transcribed Spacer). Las razones por las que se usan dichas regiones son las siguientes:

- ✓ Están presentes en todas las especies.
- ✓ Son lo suficientemente informativas.
- ✓ Contienen regiones muy conservadas.

En el ARNr 16S, correspondiente a procariontes, la variabilidad genética entre secuencias se encuentra distribuida de forma heterogénea a lo largo de todo el gen, como se muestra en la Figura 13. Además, algunas de estas regiones presentan mayor variabilidad que otras y permiten obtener una asignación taxonómica más precisa.

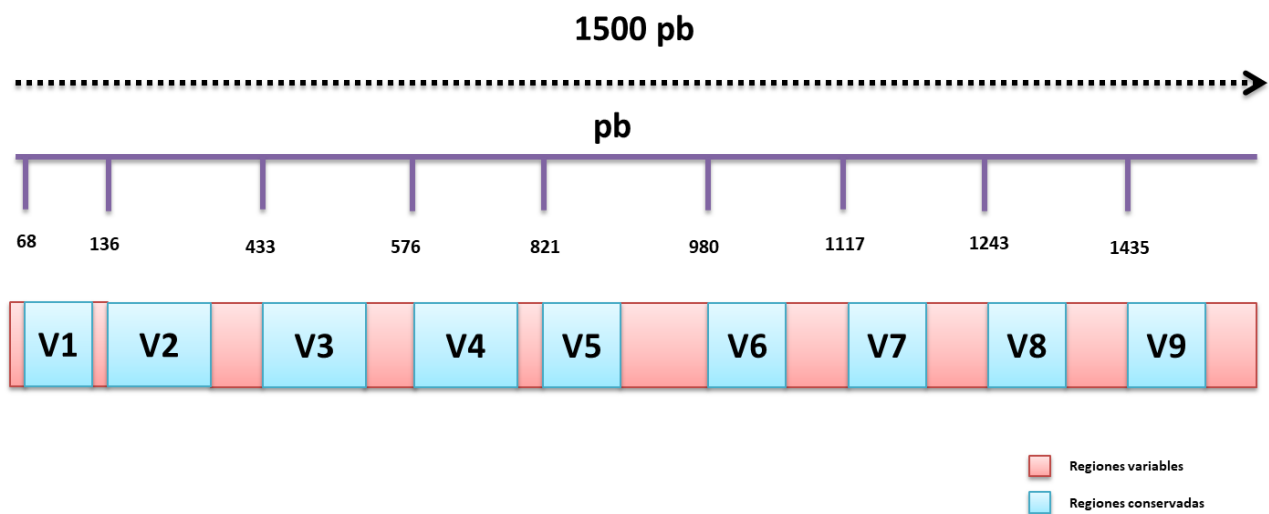


Figura 13. Esquema de las regiones del gen ARNr 16S de bacterias.

Por otro lado, en eucariotas, la región ITS incluye las regiones ITS1 e ITS2, separadas por el gen 5.8S, y está situada entre los genes 18S (SSU, small subunit) y 28S (LSU, large subunit) en la unidad de repetición de ADN (Figura 14). El motivo por el cual se emplea la región ITS es debido a que supone una huella genómica para cada hongo o levadura. La gran cantidad de copias de ITS por célula (hasta 250) hace de la región un objetivo atractivo para la secuenciación de sustratos ambientales donde la cantidad de ADN presente es baja. Mediante la secuenciación de alto rendimiento, se pueden analizar

miles de secuencias de una sola muestra ambiental, lo que permite un análisis en profundidad de la diversidad fúngica. Se usan varios cebadores para amplificar la totalidad o partes de la región ITS. Los cebadores más utilizados se publicaron a principios de la década de 1990 cuando solo se conocía una pequeña fracción de la variación molecular en la repetición del ADNr en todo el reino fúngico.



Figura 14. Esquema del ARNr fúngico.

Por lo tanto, gracias a los avances en metagenómica se ha podido conocer la existencia de microorganismos que hasta ahora no se habían aislado en este proceso mediante técnicas tradicionales (Nakasaki et al., 2019). En los últimos años, gracias a las técnicas de secuenciación genómica y al análisis filogenético de comunidades, se ha podido correlacionar sucesión y funcionalidad microbiana con degradación de la materia orgánica durante el proceso de compostaje (Martins et al., 2013; Yang et al., 2018; Wang et al., 2018). Sin embargo, son escasas las investigaciones en las que se han podido establecer claras relaciones entre calidad de un compost (estabilidad-madurez) y su nivel de biodiversidad fúngica y bacteriana.

Existen diversos programas bioinformáticos (p.ej. QIIME1, QIIME2, DADA2, KRAKEN, etc.), así como bases de datos procariontas (GREENGENES y SILVA) o fúngicas (UNITE), muy útiles para la realización de comparativas entre secuencias. No obstante, a pesar de la ventana de conocimiento que nos brinda el uso de la metagenómica para el estudio de la microbiota del proceso de compostaje, surgen nuevos problemas e inconvenientes derivados no sólo de las propias herramientas bioinformáticas, sino también de la complejidad de los procedimientos de extracción del material genético, así como de la heterogeneidad de los materiales analizados y de la reproducibilidad de los resultados obtenidos (Sczyrba et al., 2017).

1.2.6.4. Índices de Biodiversidad

Para interpretar correctamente los resultados obtenidos en cualquier estudio en el que se analicen las poblaciones presentes en un hábitat y su distribución, se requieren artificios matemáticos e informáticos que permitan describir la heterogeneidad del sistema. Con ellos se pretende conseguir una estimación de la biodiversidad en función,

por ejemplo, de la evolución temporal de un proceso o de la posible incidencia de factores ambientales.

La biodiversidad, o diversidad biológica, fue definida por Naciones Unidas en 1992 como “la variabilidad entre los organismos vivos, incluyendo ecosistemas terrestres, marinos y otros ecosistemas acuáticos, y los complejos ecológicos de los cuales forman parte. Esto incluye la diversidad dentro de las especies, entre las especies y entre ecosistemas”. Dicha definición es muy amplia, y abarca desde variabilidad genética hasta diferentes niveles en comunidades de un mismo hábitat. Para discernir de forma clara entre dichos niveles, se han establecido diferentes tipos de diversidad (Whittaker, 1960). La diversidad alfa contempla, en general, la riqueza de especies presentes en una determinada comunidad, mientras que la diversidad beta hace referencia al grado de variabilidad de especies entre comunidades diferentes. Por otro lado, la diversidad gamma, engloba las diferentes diversidades alfa detectadas en un área de estudio completo. Para la expresión de los distintos tipos de diversidad mencionados se utilizan diferentes indicadores, que permiten extraer la información más adecuada en cada uno de los casos.

En el caso de la **diversidad alfa**, los índices o expresiones comúnmente consideradas son:

- **Índices de riqueza**

- *Riqueza (S)*: número de especies por zona de muestreo.

- *Margalef (DMg)*: relación del número de especies en función del número total de individuos (Magurran, 1988).

- *Rarefacción (E(S))*: estimación del número esperado de especies en una muestra concreta cuando no existe homogeneidad en el número de individuos entre las muestras (Sanders, 1968; Simberloff, 1978).

- *Coleman*: ponderación de la riqueza de especies asociada a una muestra en relación al total de especies (Coleman, 1981).

- *Michaelis-Menten*: similar al anterior (Clench, 1979).

- *Curva de acumulación de especies*: estimación del número de especies esperado para un muestreo en función de los datos obtenidos en muestras previas. Se diferencian distintos métodos de acuerdo al tipo de distribución estadística que se asigne a los datos.

- **Índices de abundancia proporcional**

- *Índices de dominancia*: dan preponderancia a las especies presentes en mayor proporción. Destaca el de *Simpson* (λ), que estima la probabilidad de que dos individuos tomados al azar pertenezcan a una misma especie (Simpson, 1949), aunque también se encuadra en esta categoría el índice de *Hill* (NA) (Hill, 1973).

- *Índices de equidad*: consideran la abundancia de cada especie y la uniformidad de su distribución. El más reconocido es el de *Shannon-Wiener* (H'), (Shannon y Weaver, 1949), con el que se expresa el grado de uniformidad con el que están representadas las distintas especies en una muestra teniendo en cuenta el total de especies en las muestras. Otros índices de este tipo son los de *Pielou* (J') (Pielou, 1976) y *Brillouin* (HB) (Brillouin, 1956).

- Relación entre abundancia/número de especies, en el caso de modelos paramétricos.

- Índice *CHAO 1*, para modelos no paramétricos: estimación del número de especies esperadas en función de la relación existente entre el número de especies representadas por uno y dos individuos (Chao, 1984).

En el caso de la **diversidad beta**, los índices o expresiones más utilizadas son las que se describen a continuación:

- **Índices de similitud/disimilitud**

- *Métodos cualitativos*: expresan el grado de similitud entre dos muestras considerando exclusivamente la composición de especies. Destacan el índice de *Jaccard* (IJ), como relación entre el número de especies compartidas y el total de especies exclusivas (Jaccard, 1901), y el de *Sorensen* (IS), como relación entre el número de especies compartidas y la media de ambas muestras (Magurran, 1988).

- *Métodos cuantitativos*: expresan el grado de similitud entre dos muestras considerando la composición de especies y sus abundancias. Se encuentran en esta categoría los índices de *Sorensen cuantitativo* (IS_{cuant}), como la relación entre las abundancias de especies compartidas y la abundancia total en las dos muestras, el de *Morisita-Horn* (IMH), como la relación entre las abundancias específicas y las relativas y total (Magurran, 1988), y el de *Bray-Curtis* (IBC), como la estimación de la diferencia entre la abundancia de cada una de las especies (Bray y Curtis, 1957).

- **Índices de recambio/reemplazo de especies (β)**

- Índices de *Whittaker*, *Cody* y *Magurran*: determinan el grado de complementación entre dos o más muestras tomando en consideración las especies exclusivas y su relación con el número promedio o total.

Finalmente, la **diversidad gamma**, considera conjuntamente la diversidad alfa (diversidad dentro de una única comunidad) y la beta (diversidad entre comunidades), y se calcula en función de la diversidad alfa promedio, la diversidad beta promedio y el tamaño de la muestra, el cual es considerado como el número de comunidades estudiadas.

1.2.7. Calidad del producto final: estabilidad y madurez vs fitotoxicidad

Durante el compostaje se pretende obtener un producto final estabilizado y humificado (Bazrafshan et al., 2016). Por tanto, estabilidad y madurez, definen la calidad del compost. La estabilidad está muy relacionada con la actividad biológica de los materiales y, esencialmente se basa en alcanzar la transformación de un material orgánico inicialmente inestable en un producto final estable (Martínez et al., 2016). Por otro lado, la madurez se refiere a la ausencia de sustancias fitotóxicas, es decir, de todo aquello que sea negativo para el desarrollo vegetal, como pueden ser los elevados niveles de ácidos orgánicos de cadena corta y el amoníaco (Wichuk y McCartney, 2010). Ambos criterios avanzan en paralelo durante el proceso de compostaje y de algún modo están correlacionados, ya que la fitotoxicidad puede derivar en gran parte de la propia actividad microbiana presente en compost inmaduros. La estabilidad y la madurez del compost se evalúan a través de diferentes indicadores físicos, químicos y bioquímicos (Castaldi et al., 2008), sin embargo, muy pocos pueden considerarse universales debido a la enorme heterogeneidad de los materiales de partida y de las condiciones operacionales de las distintas instalaciones destinadas a compostaje (Lim et al., 2016).

Existe un importante vínculo entre “compostaje” y “agricultura sostenible” ya que la aplicación al suelo de un compost estable y maduro permite contrarrestar la escasez de materia orgánica, y además aportar sustancias húmicas que contribuyen a la salud y fertilidad del mismo (Sudkolai y Nourbakhsh, 2017; Meng et al., 2020). Por tanto, para evitar los efectos nocivos que puede tener un compost inmaduro cuando se aplica al suelo, éste debe estar ausente de compuestos tóxicos (amoníaco, ácidos orgánicos de cadena corta, metales pesados, etc.) y de agentes patógenos (humanos y vegetales); además, debe ser estable desde un punto de vista microbiológico (baja biodegradabilidad) y, en la medida de lo posible, debe haber alcanzado el grado óptimo de humificación.

Por tanto, es imprescindible evaluar la calidad de un compost desde ambos puntos de vista –madurez y estabilidad–, de modo que ello nos permita prever posibles efectos adversos con antelación suficiente a su aplicación. Así, son muy variados los parámetros físicoquímicos y biológicos que se utilizan para tal fin. La selección de los más apropiados en cada caso puede variar en función de las condiciones operacionales o del tipo de materiales de partida (Bernal et al., 1996; Silva et al., 2013; Martínez et al., 2016).

Algunos autores consideran el Índice de Germinación (IG) como un parámetro de enorme relevancia para determinar el grado de estabilidad biológica y el carácter fitotóxico de un compost. Según Aguerre y Gavazzo (2012), la fitotoxicidad de un compost podría clasificarse según su Índice de Germinación (IG). Mientras que los valores de IG inferiores al 50% se consideran un signo de fitotoxicidad e inmadurez, un valor de IG alrededor del 50-80% puede catalogarse como moderado. Por otra parte, un compost podría considerarse no fitotóxico (neutro) cuando el valor de se encuentra entre el 80-100%, mientras que los valores de IG superiores al 100% se interpretan como un signo de potencial efecto fitoestimulante.

Los estudios respirométricos, por su parte, hacen referencia al nivel de actividad microbiana con respecto al consumo de oxígeno y en función del tiempo. Cuando el metabolismo microbiano es intenso significa que hay abundancia de compuestos fácilmente biodegradables, lo que provoca una fuerte demanda de oxígeno y elevadas tasas de producción de dióxido de carbono. Por esta razón, la tasa de consumo de O_2 a lo largo de un proceso de compostaje podría ser indicativo del estado, más o menos avanzado, en que se encuentra el proceso (Hue y Liu, 1995).

Iannotti et al. (1993) propusieron el término de respirometría estática para referirse a los cambios de concentración de oxígeno, registrados a través de un electrodo de oxígeno, en un espacio de aire dentro de un recipiente cerrado herméticamente que, a una determinada temperatura, contiene una muestra de compost de peso, volumen y humedad conocidos. Por otro lado, el índice respirométrico dinámico (IRD) se determina usando el método DiProVe propuesto por Adani et al. (2001). Con este parámetro se mide la diferencia de concentración de oxígeno ($mL L^{-1}$) de un caudal de aire a la entrada y a la salida de un reactor, tras haber pasado a través de biomasa. Para conocer su valor es necesario realizar medidas continuas del consumo de oxígeno, de forma que se representen finalmente las 24 horas de máxima actividad durante un periodo de observación de 4 días. En función de las condiciones de operación escogidas, los autores definen el IRD real (IRD_R), realizando el análisis sobre la muestra de compost tal cual llega al laboratorio, y el IRD potencial (IRD_P) referido a la actividad respirométrica de una muestra de compost después de ajustar al óptimo su contenido en humedad. Otro de los parámetros respirométricos más relevantes es el índice acumulado AT_4 , gracias al

cual se calcula el consumo de oxígeno acumulado durante 4 días. Este parámetro puede considerarse como un parámetro de estabilidad directamente relacionado con la actividad microbiana dentro de las pilas de compostaje (Aguerre y Gavazzo, 2012; Gomez et al., 2006). Los valores de AT₄ excesivamente altos podrían repercutir en una mayor toxicidad del compost y afectar negativamente al Índice de Germinación. Dicho efecto se ha descrito también por parte de algunos autores cuando el contenido en compuestos fenólicos de un compost es demasiado alto (Said-Pullicino et al., 2007).

Mientras que la estabilidad ocurre de forma continuada y en paralelo a la progresión del proceso de compostaje, la humificación ocurre principalmente durante las etapas finales de enfriamiento y maduración del mismo. El proceso de formación de sustancias húmicas durante el proceso de compostaje simula lo observado de forma natural en suelos. Tales sustancias son especialmente responsables de la capacidad fertilizante del compost, y, en consecuencia, de la aportación del mismo al concepto de gestión agrícola sostenible. Así, según lo indicado por Brown y Cotton (2001), la aplicación del compost al suelo como enmienda orgánica o fertilizante, siempre que las características de estabilidad y madurez de éste sean las adecuadas, mejora las propiedades físico-químicas del mismo, así como el nivel de desarrollo y producción vegetal. Algunos de los beneficios que aporta el compost a las propiedades físico-químicas del suelo son (Ingelmo y Rubio, 2008):

- Disminución de la compactación del suelo, facilitando la exploración de las raíces de las plantas.
- Mejora de la porosidad, aumentando la capacidad de almacenamiento de agua utilizable para las plantas.
- Disminución de los riesgos de encharcamiento, debido al mayor almacenamiento de agua a saturación.
- Mejora de la velocidad de infiltración del agua en el suelo, reduciendo pérdidas de agua y nutrientes por escorrentía y de suelo por erosión hídrica.
- Disminución de la erosión.
- Mayor absorción de radiación solar, lo cual afecta a la temperatura del suelo.
- Incremento de la disponibilidad de macronutrientes (nitrógeno, fósforo, potasio), en formas más asimilables por las plantas.
- Incremento de la diversidad microbiana del suelo (Pérez-Piqueres et al., 2006; Arslan et al., 2008).

En cuanto a los beneficios que el compost provoca sobre el desarrollo y la producción vegetal (Moreno, 2005) destacan:

- Incremento de la velocidad de germinación y desarrollo de las plantas, al acelerar la absorción de agua y la respiración.
- Aumento de la permeabilidad de la membrana de las células de la raíz, con lo que se facilita la absorción de agua y nutrientes. A la vez, el compost adicionado puede actuar como catalizador respiratorio, dando lugar a una activación metabólica.
- Aumento notable en el porte de la planta.
- Incremento de la capacidad para la formación de micorrizas.
- Mejora de la eficacia en el trabajo mecánico del terreno.
- Supresión de enfermedades vegetales gracias a la microbiota presente en el compost, bien mediante antagonismo directo sobre el patógeno, o bien activando los mecanismos de resistencia vegetal.

Una de los efectos más importantes del uso del compost en el suelo es la influencia positiva que ejerce la microbiota de éste sobre la supresión de patógenos vegetales, ya que algunos de los microorganismos presentes en el compost pueden actuar como antagonistas, bien de forma directa o indirecta.

Además de la microbiota del suelo, otros seres vivos se ven afectados por la incorporación de compost al suelo, como es el caso de lombrices, parasitoides, coleópteros, dípteros y otros organismos que componen la fauna edáfica (Thomson y Hoffmann, 2007). La variabilidad en la composición de este tipo de enmiendas, atribuible a la gran cantidad de materiales susceptibles de ser compostados, propicia la aparición de efectos específicos atendiendo a la naturaleza de los sustratos, a las características metabólicas de las distintas comunidades, y las demandas ambientales propias de cada grupo poblacional (Courtney y Mullen, 2008).

1.2.8. Aplicaciones y opciones de mercado de los microorganismos procedentes del compost

Además del efecto **biofertilizante, bioestimulante y fitorregulador** causado por los microorganismos presentes en el compost (Kurabachew y Wydra, 2013), se indican a continuación otras alternativas de mercado:

- **Elaboración de compost a la carta:** se basa en el uso de inoculantes microbianos en compost de forma previa a su aplicación al suelo. Destacan los compost inoculados con agentes de control biológico tales como cepas del género *Trichoderma* (Bernal-Vicente et al., 2012), con microorganismos con capacidad biofertilizante como *Azotobacter* o

Aspergillus (Chang y Yang, 2009), o con agentes biorremediadores como el hongo *Phanerochaete* (Yu et al., 2011).

- **Obtención de enzimas para su aplicación en industria textil o papelera:** destacan las enzimas celulolíticas, por su papel relevante en el procesado de distintos tipos de tejidos. Además, son aplicadas en detergentes, ya que favorecen la eliminación de partículas de suciedad atrapadas en el entramado de la prenda e incrementan su suavidad (Bhat, 2000). También se usan las enzimas de tipo xilanasas debido a que favorecen la degradación de la hemicelulosa y provocan una mejor separación entre lignina y celulosa (Polizeli et al, 2005).

- **Efecto biorremediador,** basado en el empleo de los microorganismos del compost como herramienta de descontaminación de suelos, aguas y sustratos (Zhang et al., 2011; Martín-Gil et al., 2008). Los microorganismos habitualmente empleados en labores de biorremediación poseen con frecuencia una amplia capacidad metabólica que los habilita para degradar sustratos complejos. En este sentido, los microorganismos ligninolíticos son excelentes candidatos para este tipo de aplicaciones. Estos procesos de biorremediación parecen ser una alternativa más económica y respetuosa que otros métodos tradicionales de carácter físico o químico.

Existen numerosos trabajos que avalan esta afirmación. Como ejemplo, cabe citar el estudio de Regalado et al. (2004) sobre la eliminación de colorantes sintéticos de diversos efluentes o el realizado por García et al. (2000), en el que emplearon los hongos *Phanerochaete chrysosporium*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus terreus* y *Geotrichum candidum* para biorremediación de compuestos fenólicos presentes en aguas residuales de la industria de la aceituna. D'Annibale et al. (1998) emplearon otros hongos de la podredumbre blanca, *Lentinula edodes*, obteniendo resultados muy satisfactorios. Winqvist et al. (2014), por su parte, también realizaron trabajos a partir de hongos biorremediadores en suelos contaminados con diversos hidrocarburos policíclicos aromáticos.

Además de los hongos, las actinobacterias del compost cobran especial relevancia en este campo, sobre todo en relación con la descontaminación de metales pesados. Polti et al. (2014) y Schiltze et al. (2014) lograron rebajar los niveles presentes de distintos metales en suelos mediante la aplicación de especies pertenecientes a este grupo microbiano. Otros autores, usaron un consorcio de bacterias termófilas para la biorremediación de metales pesados en residuos derivados de la industria electrónica (Ilyas et al., 2014)

1.2.9. Compostaje a escala industrial

Además de la clasificación en función de las materias primas empleadas o de las condiciones operacionales aplicadas, el compostaje se puede catalogar en función del escalado o magnitud. Así, se puede hablar de compostaje doméstico, compostaje pre-industrial y compostaje a escala industrial. De este modo, teniendo en cuenta todos los factores anteriores, la fase biooxidativa del proceso puede ser muy variable y durar desde 3-4 semanas hasta meses en función del tipo de residuos tratados y de las características del sistema aplicado. Es importante llevar a cabo esta fase en las condiciones adecuadas, ya que condiciona la entrada en fase de maduración, e influye en la calidad del producto final. En cuanto a la fase de maduración, ésta podría durar entre 2 y 6 meses, dependiendo del tipo de material que se ha tratado, de las condiciones de trabajo y del destino final del producto.

El control del proceso en instalaciones destinadas al compostaje es del todo imprescindible. No obstante, dicho control podrá ser más rudimentario en instalaciones que utilicen sistemas de pilas volteadas, o bien más automatizado en aquellas que utilicen sistemas más tecnificados, lo que aumenta las posibilidades de intervenir en el desarrollo de los procesos. El control adecuado del proceso de compostaje debe permitir la intervención a distintos niveles (Chica y García, 2008):

- Óptima selección, homogeneización y acondicionamiento de los materiales que se van a compostar
- Control de las condiciones operacionales del sistema de compostaje en la instalación, en lo referente a perfiles de temperatura, humedad, aireación, volteos, o duración de las fases biooxidativa y de maduración.
- Tratamiento final de separación y afino con objeto de conseguir una fracción de rechazo mínima.

A pesar de ser un proceso altamente controlado, la obtención de productos finales de calidad a partir del compostaje a escala industrial puede presentar graves inconvenientes, debido a la enorme cantidad de material que se utiliza, a la heterogeneidad de los mismos incluso dentro de cada lote, o a malas prácticas dentro de las propias instalaciones. Todo ello podría derivar en productos inestables, inmaduros y, en definitiva, de mala calidad, hecho que repercute no sólo en una mala publicidad para la empresa, sino también en daños edáficos, medio ambientales y sanitarios (ROU, 2007).

REFERENCIAS

- Adani, F., Lozzi, P., Genevini, P. 2001. Determination of biological stability by oxygen uptake on municipal solid waste and derived products. *Compost Science & Utilization*, 9(2), 163-178.
- Adler-Nissen, J. 1993. Proteases. En: Nagodawithana, T., Reed, G. *Enzymes in food processing*. pp. 159-203. Academic Press, San Diego.
- Aguerre, Y.S., Gavazzo, G.B. 2012. Fitotoxicidad de papel reciclado. Ensayos preliminares. *Proceedings of the ABTCP*.
- Ahmed, Z., Banu, H., Rahman, M.M., Akhter, F., Haque, M.S. 2001. Microbial activity on the degradation of lignocellulosic polysaccharides. *Journal of Biological Science*, 1(10), 993-997.
- Arslan, E., Öbek, E., Kirbağ, S., Ipek, U., Topal, M. 2008. Determination of the effect of compost on soil microorganisms. *International Journal of Science and Technology*, 3: 151-159.
- Bao, Y., Zhou, Q., Guan, L., 2008. Allantoin-N concentration changes and analysis of the influencing factors on its changes during different manure composting. *Bioresource Technology*, 99, 8759–8764.
- Barrena-Gómez, R., Lima, F.V., Ferrer, A.S. 2006. The use of respiration indices in the composting process: a review. *Waste Management & Research*, 24(1), 37-47.
- Barrington, S., Choiniere, D., Trigui, M., Knight, W. 2002. Effect of carbon source on compost nitrogen and carbon losses. *Bioresource Technology*, 83, 189-194.
- Batstone, D.J., Viridis, B. 2014. The role of anaerobic digestion in the emerging energy economy. *Current Opinion in Biotechnology*, 27, 142-149.
- Bazrafshan, E., Zarei, A., Mostafapour, F.K., Poormollae, N., Mahmoodi, S., Zazouli, M.A. 2016. Maturity and stability evaluation of composted municipal solid wastes. *Health Scope*, 5(1).
- Beffa, T., Blanc, M., Marilley, L., Fischer, J.L., Lyon, P.F., Aragno, M. 1996. Taxonomic and metabolic microbial diversity during composting. En: de Bertoldi, M., Sequi, P., Lemmes, B., Papi, T. (Eds.), *The Science of Composting*. Chapman & Hall. Londres, Reino Unido.
- Benitez, E., Sainz, H., Nogales, R. 2005. Hydrolytic enzyme activities of extracted humic substances during the vermicomposting of a lignocellulosic olive waste. *Bioresource Technology*, 96(7), 785-790.
- Bernal, M.P., Navarro, A.F., Roig, A., Cegarra, J., Garcia, D. 1996. Carbon and nitrogen transformation during composting of sweet sorghum bagasse. *Biology and Fertility of Soils*, 22(1-2), 141-148.

- Bernai, M.P., Paredes, C., Sanchez-Monedero, M.A., Cegarra, J. 1998. Maturity and stability parameters of composts prepared with a wide range of organic wastes. *Bioresource Technology*, 63(1), 91-99.
- Bernal, M.P., Gondar, D.M. 2008. Producción y gestión de los residuos orgánicos. *Compostaje*. Mundi-Prensa, Madrid, Spain, 10-41.
- Bernal-Vicente, A., Ros, M., Pascual, J.A. 2012. Inoculation of *Trichoderma harzianum* during maturation of vineyard waste compost to control muskmelon *Fusarium* wilt. *BioResources*, 7(2), 1948-1960.
- Bhat, M.K. 2000. Cellulases and related enzymes in biotechnology. *Biotechnology Advances* 18, 355-383.
- Bidlingmaier, W. 1996. Odour emissions from composting plants. In *The Science of Composting* (pp. 71-80). Springer, Dordrecht.
- Blanc, M., Marilley, L., Beffa, T., Aragno, M. 1999. Thermophilic bacterial communities in hot composts as revealed by most probable number counts and molecular (16S rDNA) methods. *FEMS Microbiology Ecology*, 28 (2), 141-149.
- BOE-A-2002-1697. Real Decreto 1481/2001. Regulación española sobre la eliminación de residuos mediante depósito en vertedero.
- BOE-A-2011-13046. Ley 22/2011, de 28 de julio, de residuos y suelos contaminados.
- BOE-A-2013-7540. Real Decreto 506/2013. Regulación española sobre productos fertilizantes.
- BOE-A-2013-4291. Orden AAA/661/2013. Regulación española en la cual se modifica los anexos I, II y III del Real Decreto 1481/2001.
- BOE-A-2017-14332, 2017. Real Decreto 999/2017. Regulación española sobre productos fertilizantes.
- Bornscheuer, U.T. 2002. Microbial carboxyl esterases: classification, properties and application in biocatalysis. *FEMS Microbiology Reviews*, 26(1), 73-81.
- Boulter, J.I., Boland, G.J., Trevors, J. T. 2000. Compost: a study of the development process and end-product potential for suppression of turfgrass disease. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 16(2), 115-134.
- Bray J.R., Curtis J.T. 1957. An ordination of the upland forest communities of Southern Wisconsin. *Ecological Monographs*, 27, 327-354.
- Brillouin, L. 1956. *Science and information theory*. Academic Press, Nueva York, NY, Estados Unidos.
- Brown, S, Cotton, M. 2011. Changes in soil properties and carbon content following compost application: results of on-farm sampling. *Compost Science and Utilization*, 1, 88-97.

- Bueno, P., Tapias, R., López, F., Díaz, M.J. 2008. Optimizing composting parameters for nitrogen conservation in composting. *Bioresource Technology*, 99(11), 5069-5077.
- Castaldi, P., Garau, G., Melis, P. 2008. Maturity assessment of compost from municipal solid waste through the study of enzyme activities and water-soluble fractions. *Waste Management*, 28(3), 534-540.
- Castaldi, P., Alberti, G., Merella, R., Melis, P. 2005. Study of the organic matter evolution during municipal solid waste composting aimed at identifying suitable parameters for the evaluation of compost maturity. *Waste Management*, 25(2), 209-213.
- Castaldi, P., Garau, G., Melis, P., 2008. Maturity assessment of compost from municipal solid waste through the study of enzyme activities and water-soluble fractions. *Waste Management*, 28, 534-540.
- Castillo, J.M., Romero, E., Nogales, R. 2013. Dynamics of microbial communities related to biochemical parameters during vermicomposting and maturation of agroindustrial lignocellulose wastes. *Bioresource Technology*, 146, 345-354.
- Cayuela, M.L., Mondini, C., Insam, H., Sinicco, T., Franke-Whittle, I. 2009. Plant and animal wastes composting: Effects of the N source on process performance. *Bioresource Technology*, 100(12), 3097-3106.
- Chandna, P., Nain, L., Singh, S., Kuhad, R.C. 2013. Assessment of bacterial diversity during composting of agricultural byproducts. *BioMed Central Microbiology*, 13, 99-113.
- Chang, C.H., Yang, S.S. 2009. Thermo-tolerant phosphate-solubilizing microbes for multifunctional biofertilizer preparation. *Bioresource Technology*, 100(4), 1648-1658.
- Chao, A. 1984. Non-parametric estimation of the number of classes in a population. *Scandinavian Journal of Statistics*, 11, 265-270.
- Chica, A., García, J.L. 2008. Aspectos técnicos en el desarrollo y control del proceso de compostaje. En: Moreno J., Moral R. (Eds.), *Compostaje*. Mundi-Prensa. Madrid, España.
- Chikae, M., Ikeda, R., Kerman, K., Morita, Y., Tamiya, E. 2006. Estimation of maturity of compost from food wastes and agro-residues by multiple regression analysis. *Bioresource Technology*, 97, 1979-1985.
- Choi, M.H., Park, Y.H. 1998. The influence of yeast on thermophilic composting of food waste. *Letters in Applied Microbiology Journal*, 26, 175-178.
- Chu, E.W., Karr, J.R., 2017. Environmental impact: Concept, consequences, measurement. *Reference Module in Life Sciences*.
- Ciavatta, C., Vittori-Antisari, L., Sequi, P. 1988. A first approach to the characterisation of the presence of humified materials in organic fertilisers. *Agrochimica*, 32, 510-517.
- Ciavatta, C., Govi, M., Antisari, L.V., Sequi, P. 1990. Characterization of humified compounds by extraction and fractionation on solid polyvinylpyrrolidone. *Journal of Chromatography*, 509, 141-146.

- Clench, H. 1979. How to make regional lists of butterflies. Some thoughts. *The Journal of the Lepidopterists' Society*, 33, 216-231.
- Coleman, B.D. 1981. On random placement and species-area relation. *Mathematical Biosciences*, 54, 191-215.
- Connon, S.A., Giovannoni, S.J. 2002. High-throughput methods for culturing microorganisms in very-low-nutrient media yield diverse new marine isolates. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(8), 3878-3885.
- Costa, F., García, C., Hernández, T., Polo, A. 1991. Residuos orgánicos urbanos. Manejo y utilización. Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC). Centro de Edafología y Biología Aplicada del Segura (Sebas). Murcia, España, 181.
- Couto, S.R., Barreiro, M., Rivela, I., Longo, M.A., Sanromán, Á. 2002. Performance of a solid-state immersion bioreactor for ligninolytic enzyme production: evaluation of different operational variables. *Process Biochemistry*, 38(2), 219-227.
- Courtney, R.G., Mullen, G.J. 2008. Soil quality and barley growth as influenced by the land application of two compost types. *Bioresource Technology*, 99, 2913-2918.
- Cunha-Queda, A., Vallini, G., Agnolucci, M., Coelho, C.A., Campos, L., de Sousa, R.B. 2002. Microbiological and chemical characterisation of composts at different levels of maturity, with evaluation of phytotoxicity and enzymatic activities. In *Microbiology of composting* (pp. 345-355). Springer, Berlin, Heidelberg.
- Dalal, R.C. 1977. Soil organic phosphorus. *Advances in Agronomy*, 29, 83-113.
- D'Annibale, A., Crestini, C., Vinciguerra, V., Sermanni, G.G. 1998. The biodegradation of recalcitrant effluents from an olive mill by a white-rot fungus. *Journal of Biotechnology*, 61(3), 209-218.
- De La Horra, A.M., Defrieri, R., Jimenez, M.P., Palma, R.M. 2005. Evolution of alkaline phosphatase and protease activities, total organic carbon and CO₂ evolved during composting. *Agrochimica (Italy)*.
- Desbois, A.P., Smith, V.J. 2010. Antibacterial free fatty acids: activities, mechanisms of action and biotechnological potential. *Applied microbiology and biotechnology*, 85(6), 1629-1642.
- Díaz, L.F., Savage, G.M. 2007. Factors that affect the process. *Compost Science and Technology*, 1.
- Directiva 2000/76/CE del Parlamento Europeo y del Consejo de 4 de diciembre de 2000 relativa a la incineración de residuos. *Diario Oficial de las Comunidades Europeas*, Serie L 332, 28 de diciembre de 2000, p. 91-111.
- Domsch, K.H., Gams, W., Anderson, T.H. 1993. *Compendium of Soil Fungi*, vol. 1. IHW-Verlag, Eching.

Ekinci, K., Keener, H.M., Michel, F.C., Elwell, D.L. 2004. Modeling composting rate as a function of temperature and initial moisture content. *Compost Science & Utilization*, 12(4), 356-364.

Emino, E.R., Warman, P.R. 2004. Biological assay for compost quality. *Compost Science & Utilization*, 12(4), 342-348.

EPA, 2003. Environmental Regulations and Technology. Control of Pathogens and Vector Attraction in Sewage Sludge. EPA625-R-92-013. Environmental Protection Agency, USA.

Estrella-González, M.J., López-González, J.A., Suárez-Estrella, F., López, M.J., Jurado, M.M., Siles-Castellano, A.B., Moreno, J. 2020. Evaluating the influence of raw materials on the behavior of nitrogen fractions in composting processes on an industrial scale. *Bioresource Technology*, 303, 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. 2020. Uncovering new indicators to predict stability, maturity and biodiversity of compost on an industrial scale. *Bioresource Technology*, 123557.

European Commission. 2020. A new Circular Economy Action Plan For a cleaner and more competitive Europe, Communication from the Commission, COM (2020) 98 final, Brussels.

Fogarty, A.M., Tuovinen, O.H. 1991. Microbial degradation of pesticides in yard waste composting. *Microbiological Reviews*, 55 (2), 225-233.

Fracchia, L., Dohrmann, A.B., Martinotti, M.G., Tebbe, C.C. 2006. Bacterial diversity in a finished compost and vermicompost: differences revealed by cultivation-independent analyses of PCR-amplified 16S rRNA genes. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 71(6), 942.

Francou, C., Linères, M., Derenne, S., Le Villo-Poitrenaud, M., Houot, S. 2008. Influence of green waste, biowaste and paper-cardboard initial ratios on organic matter transformations during composting. *Bioresource Technology*, 99 (18), 8926-8934.

García, C., Hernandez, T., Costa, F. 1990. The influence of composting and maturation processes on the heavy-metal extractability from some organic wastes. *Biological Wastes*, 31(4), 291-301.

García, I.G., Pena, P.J., Venceslada, J.B., Martín, A.M., Santos, M.M., Gomez, E.R. 2000. Removal of phenol compounds from olive mill wastewater using *Phanerochaete chrysosporium*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus terreus* and *Geotrichum candidum*. *Process Biochemistry*, 35(8), 751-758.

Gao, M., Liang, F., Yu, A., Li, B., Yang, L. 2010. Evaluation of stability and maturity during forced-aeration composting of chicken manure and sawdust at different C/N ratios. *Chemosphere*, 78(5), 614-619.

- Geissdoerfer, M., Savaget, P., Bocken, N.M., Hultink, E.J. 2017. The Circular Economy—A new sustainability paradigm? *Journal of Cleaner Production*, 143, 757-768.
- Gómez, R.B., Lima, F.V., Ferrer, A.S. 2006. The use of respiration indices in the composting process: a review. *Waste Management & Research*, 24(1), 37-47.
- Goyal, S., Dhull, S.K., Kapoor, K.K. 2005. Chemical and biological changes during composting of different organic wastes and assessment of compost maturity. *Bioresource Technology*, 96(14), 1584-1591.
- Guardia, A.D., Mallard, P., Teglia, C., Marin, A., Le Pape, C., Launay, M., Benoist, J.C., Petiot, C. 2010. Comparison of five organic wastes regarding their behaviour during composting: part 2, nitrogen dynamic. *Waste Management*, 30 (3), 415–425.
- Guo, R., Li, G.X., Jiang, T., Schuchardt, F., Chen, T.B., Zhao, Y.Q., Shen, Y.J. 2012. Effect of aeration rate, C/N ratio and moisture content on the stability and maturity of compost. *Bioresource Technology*, 112, 171–178.
- Gupta, R., Gupta, N., Rathi, P. 2004. Bacterial lipases: an overview of production, purification and biochemical properties. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 64(6), 763-781.
- Handelsman, J. 2004. Metagenomics: application of genomics to uncultured microorganisms. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 68(4), 669-685.
- Hansgate, A., Schloss, P., Hay, A., Walker, L. 2005. Molecular characterization of fungal community dynamics in the initial stages of composting. *FEMS Microbiology Ecology* 51, 209-214.
- Haug, R.T. 1993. *The Practical Handbook of Compost Engineering*. Lewis Publishers. Boca Raton, Florida, Estados Unidos.
- Hayes, M.H.B., MacCarthy, P., Malcolm, R.L., Swift, R.S. 1988. *Humic substances and their role in the environment*. Wiley-Interscience. Chichester, Reino Unido.
- Hill, M.O. 1973. Diversity and evenness: a unifying notation and its consequence. *Ecology*, 54, 427-432.
- Hoitink, H.A.J. Boehm, M.J. 1999. Biocontrol within the context of soil microbial communities: a substrate-dependent phenomenon. *Annual Review of Phytopathology*, 37, 427-446.
- Hue, N.V., Liu, J. 1995. Predicting compost stability. *Compost Science & Utilization*, 3(2), 8-15.
- Huang, D.L., Zeng, G.M., Feng, C.L., Hu, S., Lai, C., Zhao, M.H., Su, F.F., Tang, L., Liu, H.L. 2010. Changes of microbial population structure related to lignin degradation during lignocellulosic waste composting. *Bioresource Technology*, 101, 4062-4067.

Iannotti, D.A., Pang, T., Toth, B. L., Elwell, D.L., Keener, H.M., Hoitink, H.A.J. 1993. A quantitative respirometric method for monitoring compost stability. *Compost Science & Utilization*, 1(3), 52-65.

Iglesias-Jiménez, E., Pérez-García, V. 1992. Determination of maturity indices for city refuse composts. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 38, 331-343.

Iglesias-Jiménez, E., Barral, M.T., Marhuenda, F.C. 2008. Indicadores de la estabilidad y madurez del compost. In: Moreno, J., Moral, R. (Eds.), *Compostaje*. Mundi-Prensa, Madrid, Spain, pp. 243–283.

Ilyas, S., Lee, J. C., Kim, B.S. 2014. Bioremoval of heavy metals from recycling industry electronic waste by a consortium of moderate thermophiles: process development and optimization. *Journal of Cleaner Production*, 70, 194-202.

Ingelmo, F., Rubio, J.L. 2008. Efecto De la aplicación de compost sobre las propiedades físicas y químicas del suelo. En: Moreno J, Moral R. (Eds.). *Compostaje*, pp.305-328. Ediciones Mundi-Prensa. Madrid, España.

Insam, H. Amor, K. Renner, M., Crepaz, C. 1996. Changes in functional abilities of the microbial community during composting of manure. *Microbial Ecology*, 31, 77–87.

Jaccard, P. 1901. Distribution de la flore alpine dans le bassin des Drames et dans quelques régions voisines. *Bulletin de la Société Vaudoise des Sciences Naturelles*, 37, 241-272.

Jeris, J.S., Regan, R.W. 1973. Controlling environmental parameters for optimum composting I: experimental procedures and temperature. *Compost Science*, 14(1), 10-15.

Jones, P., Martin, M. 2003. A review of the literature on the occurrence and survival of pathogens of animals and humans in green compost. WRAP standards report. The Waste and Resources Action Programme, Oxon, United Kingdom.

Jones, D.L., Shannon, D., Murphy, D.V., Farrar, J., 2004. Role of dissolved organic nitrogen (DON) in soil N cycling in grassland soils. *Soil Biology and Biochemistry*, 36, 749–756.

Jurado, M.M., Camelo-Castillo, A.J., Suárez-Estrella, F., López, M.J., López-González, J.A., Estrella-González, M.J., Siles-Castellano, A.B., Moreno, J. 2020. Integral approach using bacterial microbiome to stabilize municipal solid waste. *Journal of Environmental Management*, 265, 110528.

Kaeberlein, T., Lewis, K., Epstein, S.S. 2002. Isolating "uncultivable" microorganisms in pure culture in a simulated natural environment. *Science*, 296(5570), 1127-1129.

Karadag, D., Özkaya, B., Ölmez, E., Nissilä, M.E., Çakmakçı, M., Yıldız, Ş., Puhakka, J. A. 2013. Profiling of bacterial community in a full-scale aerobic composting plant. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 77, 85-90.

- Kawai, F. 2010. The biochemistry and molecular biology of xenobiotic polymer degradation by microorganisms. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 74, 1743-1759.
- Knicker, H., Lüdemann, H.D., Haider, K. 1997. Incorporation studies of NH_4^+ during incubation of organic residues by ^{15}N -CPMAS-NMR-spectroscopy. *European Journal of Soil Science*, 48, 431–441.
- Komilis, D.P., Tziouvaras, I.S. 2009. A statistical analysis to assess the maturity and stability of six composts. *Waste Management*, 29(5), 1504-1513.
- Kurabachew, H., Wydra, K. 2013. Characterization of plant growth promoting rhizobacteria and their potential as bioprotectant against tomato bacterial wilt caused by *Ralstonia solanacearum*. *Biological Control*, 67(1), 75-83.
- Lagaert, S., Beliën, T., Volckaert, G. 2009. Plant cell walls: Protecting the barrier from degradation by microbial enzymes. In *Seminars in cell & developmental biology* (Vol. 20, No. 9, pp. 1064-1073). Academic Press.
- Langarica-Fuentes, A., Zafar, U., Heyworth, A., Brown, T., Fox, G., Robson, G.D. 2014a. Fungal succession in an in-vessel composting system characterized using 454 pyrosequencing. *FEMS Microbiology Ecology*, 88(2), 296-308.
- Langarica-Fuentes, A., Handley, P.S., Houlden, A., Fox, G., Robson, G.D. 2014b. An investigation of the biodiversity of thermophilic and thermotolerant fungal species in composts using culture-based and molecular techniques. *Fungal Ecology*, 11, 132-144.
- Latif, H., Zeidan, A.A., Nielsen, A.T., Zengler, K. 2014. Trash to treasure: production of biofuels and commodity chemicals via syngas fermenting microorganisms. *Current Opinion in Biotechnology*, 27, 79-87.
- Levy, I., Shani, Z., Shoseyov, O. 2002. Modification of polysaccharides and plant cell wall by endo-1, 4- β -glucanase and cellulose-binding domains. *Biomolecular Engineering*, 19(1), 17-30.
- Lewis, N.G. Yamamoto, E. 1990. Lignin: occurrence, biogénesis and biodegradation. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 41, 455-496.
- Li, S., Li, D., Li, J., Li, G., Zhang, B. 2017. Evaluation of humic substances during co-composting of sewage sludge and corn stalk under different aeration rates. *Bioresource Technology*, 245, 1299-1302.
- Liang, C., Das, K.C., McClendon, R.W. 2003. The influence of temperature and moisture contents regimes on the aerobic microbial activity of a biosolids composting blend. *Bioresource Technology*, 86(2), 131-137.
- Lim, S.L., Lee, L.H., Wu, T.Y. 2016. Sustainability of using composting and vermicomposting technologies for organic solid waste biotransformation: recent overview, greenhouse gases emissions and economic analysis. *Journal of Cleaner Production*, 111, 262-278.

Lorenzo Acosta, Y., Obaya Abreu, M.C. 2005. La digestión anaerobia. Aspectos teóricos. Parte I. ICIDCA. Sobre los Derivados de la Caña de Azúcar, XXXIX (1), 35-48. [Fecha de Consulta 4 de Junio de 2020]. ISSN: 0138-6204. Disponible en: https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=2231/223120659006_6204

Loqué, D., Scheller, H.V., Pauly, M. 2015. Engineering of plant cell walls for enhanced biofuel production. *Current Opinion in Plant Biology*, 25, 151-161.

Madejón, E., Díaz, M.J., López, R., Cabrera F. 2001. Co-composting of sugarbeet vinasse: influence of the organic matter nature of the bulking agents used. *Bioresource Technology*, 76, 275-278.

Magurran, A.E. 1988. Ecological diversity and its measurement. Chapman and Hall, Londres, Reino Unido.

Malherbe, S., Cloete, T.E. 2002. Lignocellulose biodegradation: fundamentals and applications. *Reviews in Environmental Science and Biotechnology*, 1 (2), 105-114.

Malinauskaite, J., Jouhara, H., Czajczyńska, D., Stanchev, P., Katsou, E., Rostkowski, P., Thorne, R.J., Colón, J., Ponság, S, Al-Mansourh, F., Anguilano, L. 2017. Municipal solid waste management and waste-to-energy in the context of a circular economy and energy recycling in Europe. *Energy*, 141, 2013-2044.

Martín-Gil, J., Gómez-Sobrino, E., Correa-Guimaraes, A., Hernández-Navarro, S., Sánchez-Báscones, M., Ramos-Sánchez, M.C. 2008. Composting and vermicomposting experiences in the treatment and bioconversion of asphaltens from the Prestige oil spill. *Bioresource Technology*, 99(6), 1821-1829.

Martínez, M., Ortega, R., Janssens, M., Angulo, J., Fincheira, P. 2016. Selection of maturity indices for compost derived from grape pomace. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*, 16 (2), 262-267.

Martins, L.F., Antunes, L.P., Pascon, R.C., de Oliveira, J.C.F., Digiampietri, L.A., Barbosa, D., et al. 2013. Metagenomic analysis of a tropical composting operation at the São Paulo Zoo Park reveals diversity of biomass degradation functions and organisms. *PLoS One*, 8(4), e61928.

Meng, X., Yan, J., Zuo, B., Wang, Y., Yuan, X., Cui, Z. 2020. Full-scale of composting process of biogas residues from corn stover anaerobic digestion: Physical-chemical, biology parameters and maturity indexes during whole process. *Bioresource Technology*, 302, 122742.

Mindari, W., Aini, N., Kusuma, Z., Syekhfani, S. 2014. Effects of humic acid-based cation buffer on chemical characteristics of saline soil and growth of maize. *Journal of Degraded and Mining Lands Management*, 2(1), 259.

- Miyatake, F., Iwabuchi, K. 2006. Effect of compost temperature on oxygen uptake rate, specific growth rate and enzymatic activity of microorganisms in dairy cattle manure. *Bioresource Technology*, 97, 961-965.
- Mohnen, D. 2008. Pectin structure and biosynthesis. *Current opinion in plant biology*, 11(3), 266-277.
- Mondini, C., Fornasier, F., Sinicco, T. 2004. Enzymatic activity as a parameter for the characterization of the composting process *Soil Biology and Biochemistry*, 36, 1587-1594.
- Moreno, J. 2005. Compostaje. En: Marín, I., Sanz, J.L. y Amils, R. (Eds.), *Biotechnología y Medio ambiente*. Ephemera. Madrid, España.
- Moreno, J., Mormeneo, S. 2008. Microbiología y bioquímica del proceso de compostaje. En: Moreno J., Moral R. (Eds.), *Compostaje*. Mundi-Prensa. Madrid, España.
- Moreno, J., López, M.J., Vargas-García, M.C., Suárez-Estrella, F. 2013. Recent advances in microbial aspects of compost production and use. *Acta Horticulturae (ISHS)*, 1013, 443-457.
- 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.
- Negro, M.J., Villa, F., Aibar, J., Alarcón, R., Ciria, P. 2000. Producción y gestión del compost. *Informaciones técnicas del departamento de agricultura de la dirección general de tecnología agraria*. Gobierno de Aragón. Nr. 88, Zaragoza.
- Nekluydov, A.D., Fedotov, G.N., IVankin, A.N. 2008. Intensification of composting processes by aerobic microorganisms: A review. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 44, 6-18.
- Ogino, A., Koshikawa, H., Nakahara, T., Uchiyama, H. 2001. Succession of microbial communities during a biostimulation process as evaluated by DGGE and clone library analyses. *Journal of Applied Microbiology*, 91(4), 625-635.
- Ohnishi, A., Nagano, A., Fujimoto, N., Suzuki, M. 2011. Phylogenetic and physiological characterization of mesophilic and thermophilic bacteria from a sewage sludge composting process in Sapporo, Japan. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 27(2), 333-340.
- O'Neill, M. A., Ishii, T., Albersheim, P., Darvill, A.G. 2004. Rhamnogalacturonan II: structure and function of a borate cross-linked cell wall pectic polysaccharide. *Annual Review of Plant Biology*, 55, 109-139.
- Onwosi, C.O., Igbokwe, V.C., Odimba, J.N., Eke, I.E., Nwankwoala, M.O., Iroh, I.N., Ezeogu, L.I. 2017. Composting technology in waste stabilization: on the methods, challenges and future prospects. *Journal of Environmental Management*, 190, 140-157.

Partanen, P., Hultman, J., Paulin, L., Auvinen, P., Romantschuk, M. 2010. Bacterial diversity at different stages of the composting process. *BioMed Central Microbiology*, 10, 94-104.

Pepe, O., Ventrino, 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, 1616-1625.

Pérez, J., Muñoz-Dorado, J., De la Rubia, T.D.L.R., Martínez, J. 2002. Biodegradation and biological treatments of cellulose, hemicellulose and lignin: an overview. *International Microbiology*, 5(2), 53-63.

Pérez-Piqueres, A., Edel-Hermann, V., Alabouvette, C., Steinberg, C. 2006. Response of soil microbial communities to compost amendments. *Soil Biology and Biochemistry*, 38, 460-470.

Peters, S., Koschinsky, S., Schwieger, T., Tebbe, C.C. 2000. Succession of microbial communities during hot composting as detected by PCR-single-strand-conformation polymorphism-based genetic profiles of small-subunit rRNA genes. *Applied and Environmental Microbiology*, 66, 930-936.

Pielou, E.C. 1976. *Population and community ecology: principles and methods*. CRC Press.

Polizeli, M.L.T.M., Rizzatti, A.C.S., Monti, R., Terenzi, H.F., Jorge, J.A., Amorim, D.S. 2005. Xylanases from fungi: properties and industrial applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 67(5), 577-591.

Polti, M.A., Aparicio, J.D., Benimeli, C.S., Amoroso, M.J. 2014. Simultaneous bioremediation of Cr (VI) and lindane in soil by actinobacteria. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 88, 48-55.

Regalado, C., García-Almendárez, B.E., Duarte-Vázquez, M.A. 2004. Biotechnological applications of peroxidases. *Phytochemistry Reviews*, 3, 243-256.

Riddech, N., Klammer, S., Insam, H. 2002. Characterization of microbial communities during composting of organic wastes. En: Insam, H., Riddech, N. y Klarnmer, S. (Eds.), *Microbiology of composting*. Springer Verlag. Heidelberg, Alemania.

Ridley, B.L., O'Neill, M.A., Mohnen, D. 2001. Pectins: structure, biosynthesis, and oligogalacturonide-related signaling. *Phytochemistry*, 57(6), 929-967.

Ripoll, X.F., Mauri, F.S. 2008. 2. Situación actual en el tratamiento de los residuos orgánicos: aspectos científicos, económicos y legislativos. *Compostaje*, 43.

Roletto, E., Barberis, R., Consiglio, M., Jodice, R. 1985. Chemical parameters for evaluating compost maturity. *BioCycle*, 26, 46-47.

ROU (Recycled Organic Unit). 2007. *Establishing a licensed composting facility*. University of New South Wales. Sydney. Australia. 50 pp.

Ryckeboer, J., Mergaert, J., Vaes, K., Klammer, S., de Clercq, D., Coosemans, J., Insam, H., Swings, J. 2003. A survey of bacteria and fungi occurring during composting and self-heating processes. *Annals of Microbiology*, 53, 349-410.

Said-Pullicino, D., Erriquens, F.G., Gigliotti, G. 2007. Changes in the chemical characteristics of water-extractable organic matter during composting and their influence on compost stability and maturity. *Bioresource Technology*, 98(9), 1822-1831.

Sánchez-Monedero, M.A., Roig, A., Paredes, C., Bernal, M.P. 2001. Nitrogen transformation during organic waste composting by the Rutgers system and its effects on pH, EC and maturity of the composting mixtures. *Bioresource Technology*, 78, 301-308.

Sanders H.L. 1968. Marine benthic diversity: a comparative study. *The American Naturalist*, 102, 243-282.,

Schnitzer, M. 1978. *Soil Organic Matter*. Elsevier. Amsterdam, Países Bajos.

Sczyrba, A., Hofmann, P., Belmann, P., Koslicki, D., Janssen, S., Dröge, J., et al., 2017. Critical assessment of metagenome interpretation-a benchmark of metagenomics software. *Nature Methods*, 14(11), 1063.

Sequi, P., De Nobili, M., Leita, L., Cercignani, G. 1986. A new index of humification. *Agrochimica* 30, 175-179

Sepehri, A., Sarrafzadeh, M.H. 2018. Effect of nitrifiers community on fouling mitigation and nitrification efficiency in a membrane bioreactor. *Chemical Engineering and Processing-Process Intensification*, 128, 10-18.

Shannon, C.E., Weaver, W. 1949. *The mathematical theory of communication*. University of Illinois, Urbana, IL, EE.UU.

Saviozzi, A., Cardelli, R., Levi-Minzi, R., Riffaldi, R. 2004. Evolution of biochemical parameters during composting of urban wastes. *Compost Science & Utilization*, 12(2), 153-160.

Silva, M.E.F., Lemos, L.T., Bastos, M.M.S.M., Nunes, O.C., Cunha-Queda, A.C. 2013. Recovery of humic-like substances from low quality composts. *Bioresource Technology*, 128, 624-632.

Simberloff, D. 1978. Use of rarefaction and related methods in ecology. En: Dickson KL, Cairns JJ, Livingston RJ. (Eds.). *Biological data in water pollution assessment: quantitative and statistical analyses*, pp. 150-165. American Society for Testing Materials, West Conshohocken, PA, Estados Unidos.

Simpson, E.H. 1949. Measurement of biodiversity. *Nature*, 163, 668.

Simu, K., Hagström, Å. 2004. Oligotrophic bacterioplankton with a novel single-cell life strategy. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(4), 2445-2451.

Steger, K., Jarvis, A., Vasara, T., Romantschuk, M., Sundh, I. 2007. Effects of differing temperature management on development of actinobacteria populations during composting. *Research in Microbiology*, 158, 617-624.

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

Suárez-Estrella, F., Vargas-García, M.C., López, M.J., Moreno, J. 2008b. Changes in carbon fractions during composting of plant wastes and the influence of a humic extract on soil microorganism growth. *Dynamic soil, Dynamic Plant*, 2(1), 90-95.

Sudkolai, S.T., Nourbakhsh, F. 2017. Actividad de ureasa como índice para evaluar la madurez del estiércol de vaca y vermicomposts de residuos de trigo. *Gestión de residuos*, 64, 63-66.

Sugimori, D., Nakamura, M., Mihara, Y. 2002. Microbial degradation of lipid by *Acinetobacter* sp. strain SOD-1. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 66(7), 1579-1582.

Sztern, D., Pravia, M. 2002. Manual para la Elaboración de Compost. Bases Conceptuales y Procedimientos. Organización Panamericana de la salud, Chile.

Thambirajah, J.J., Zulkali, M.D., Hashim, M.A. 1995. Microbiological and biochemical changes during the composting of oil palm empty-fruit-bunches. Effect of nitrogen supplementation on the substrate. *Bioresource Technology*, 52(2), 133-144.

Thomson, L.J., Hoffmann, A.A. 2007. Effects of ground cover (straw and compost) on the abundance of natural enemies and soil macro invertebrates in vineyards. *Agricultural and Forest Entomology*, 9, 173-179.

Tian, W., Sun, Q., Xu, D., Zhang, Z., Chen, D., Li, C., Qirong, S., Shen, B. 2013. Succession of bacterial communities during composting process as detected by 16S rRNA clone libraries analysis. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 78, 58-66.

Tiquia, S. M. 2002. Evolution of extracellular enzyme activities during manure composting. *Journal of Applied Microbiology*, 92(4), 764-775.

Tiquia, S. M. 2005. Microbiological parameters as indicators of compost maturity. *Journal of Applied Microbiology* 99, 816-828.

Tittarelli, F., Trinchera, A., Intrigliolo, F., Benedetti, A. 2002. Evaluation of organic matter stability during the composting process of agroindustrial wastes. In: *Microbiology of Composting*. Springer, Berlin, Heidelberg, pp. 397-406.

Tognetti, C., Mazzarino, M.J., Laos, F. 2007. Improving the quality of municipal organic waste compost. *Bioresource Technology*, 98 (5), 1067-1076.

Tomati, U., Madejon, E., Galli, E. 2000. Evolution of humic acid molecular weight as an index of compost stability. *Compost Science & Utilization*, 8(2), 108-115.

- Trillas-Gay, M.I., Avilés, M., Suárez-Estrella, F., Moreno, J. 2014. Compost y control biológico de las enfermedades de las plantas. En: Moreno, J., Moral, R., García-Morales, J.L., Pascual, J.A. (Eds.), *De residuo a recurso: el camino hacia la sostenibilidad*. Mundi-Prensa. Madrid, España.
- Tseng, D.Y., Chalmers, J.J., Tuovinen, O.H., Hoitink, H.A. 1995. Characterization of a bench-scale system for studying the biodegradation of organic solid wastes. *Biotechnology Progress*, 11(4), 443-451.
- Tuomela, M., Vikman, M., Hatakka, A., Itävaara, M. 2000. Biodegradation of lignin in a compost environment: A review. *Bioresource Technology*, 72, 169-183.
- Tyson, G.W., Banfield, J.F. 2005. Cultivating the uncultivated: a community genomics perspective. *Trends in Microbiology*, 13(9), 411-415.
- Van Gestel, K., Mergaert, J., Swings, J., Coosemans, J., Ryckeboer, J. 2003. Bioremediation of diesel oil-contaminated soil by composting with biowaste. *Environmental Pollution*, 125, 361-368.
- Vergara, S.E., Silver, W.L. 2019. Greenhouse gas emissions from windrow composting of organic wastes: Patterns and emissions factors. *Environmental Research Letters*, 14(12), 124027.
- Wang, X., Cui, H., Shi, J., Zhao, X., Zhao, Y., Wei, Z. 2015. Relationship between bacterial diversity and environmental parameters during composting of different raw materials. *Bioresource Technology*, 198, 395-402.
- Wang, C., Dong, D., Wang, H., Müller, K., Qin, Y., Wang, H., Wu, W. 2016. Metagenomic analysis of microbial consortia enriched from compost: new insights into the role of Actinobacteria in lignocellulose decomposition. *Biotechnology for biofuels*, 9(1), 22.
- Wang, K., Yin, X., Mao, H., Chu, C., Tian, Y. 2018. Changes in structure and function of fungal community in cow manure composting. *Bioresource Technology*, 255, 123-130.
- Wery, N., Gerike, U., Sharman, A., Chaudhuri, J.B., Hough, D.W., Danson, M.J. 2003. Use of a packed-column bioreactor for isolation of diverse protease-producing bacteria from antarctic soil. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(3), 1457-1464.
- Whittaker, R.H. 1960. Vegetation of the Siskiyou mountains. Oregon and California. *Ecological Monographs*, 30, 279-338.
- Wichuk, K.M., McCartney, D. 2010. Compost stability and maturity evaluation—a literature review. *Canadian Journal of Civil Engineering*, 37(11), 1505-1523.
- Winqvist, E., Björklöf, K., Schultz, E., Räsänen, M., Salonen, K., Anasonye, F., Cajthaml, T., Steffen, K.T., Kirsten, S., Jørgensen, K.S., Tuomela, M. 2014. Bioremediation of PAH-contaminated soil with fungi—From laboratory to field scale. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 86, 238-347.

- Xiao, Y., Zeng, G.M., Yang, Z.H., Ma, Y.H., Huang, C., Xu, Z.Y., Huang, J., Fan, C. Z. 2011a. Changes in the actinomycetal communities during continuous thermophilic composting as revealed by denaturing gradient gel electrophoresis and quantitative PCR. *Bioresource Technology*, 102(2), 1383-1388.
- Xiao, Y., Zeng, G.M., Yang, Z.H., Ma, Y.H., Huang, C., Shi, W.J., Xu, Z.Y., Huang, J., Fan, C. Z. 2011b. Effects of continuous thermophilic composting (CTC) on bacterial community in the active composting process. *Microbial Ecology*, 62(3), 599-608.
- Xiong, H. 2004. Production and characterization of *Trichoderma reesei* and *Thermomyces lanuginosus* xylanases. Helsinki University of Technology. Espoo.
- Yang, W., Gu, S., Xin, Y., Bello, A., Sun, W., Xu, X. 2018. Compost addition enhanced hyphal growth and sporulation of arbuscular mycorrhizal fungi without affecting their community composition in the soil. *Frontiers in Microbiology*, 9, 169.
- Yu, Z., Zeng, G.M., Chen, Y.N., Zhang, J.C., Yu, Y., Li, H., Liu, Z.F., Tang, L. 2011. Effects of inoculation with *Phanerochaete chrysosporium* on remediation of pentachlorophenol-contaminated soil waste by composting. *Process Biochemistry*, 46(6), 1285-1291.
- Zengler, K., Toledo, G., Rappé, M., Elkins, J., Mathur, E.J., Short, J.M., Keller, M. 2002. Cultivating the uncultured. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(24), 15681-15686.
- Zhang, Y., Zhu, Y.G., Houot, S., Qiao, M., Nunan, N., Garnier, P. 2011. Remediation of polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) contaminated soil through composting with fresh organic wastes. *Environmental Science and Pollution Research*, 18(9), 1574-1584.
- Zhang, L., Sun, X. 2015. Effects of earthworm casts and zeolite on the two-stage composting of green waste. *Waste Management*, 39, 119-129.
- Zhang, L., Sun, X. 2016. Influence of bulking agents on physical, chemical, and microbiological properties during the two-stage composting of green waste. *Waste Management*, 48, 115-126.
- Zhang, J., Wang, J., An, T., Wei, D., Chi, F., Zhou, B. 2017. Effects of long-term fertilization on soil humic acid composition and structure in black Soil. *PLoS One* 12 (11), e0186918.
- Zhang, W., Peng, Y., Zhang, L., Li, X., Zhang, Q. 2020. Simultaneous partial nitrification and denitrification coupled with polished anammox for advanced nitrogen removal from low C/N domestic wastewater at low dissolved oxygen conditions. *Bioresource Technology*, 305, 123045.
- Zhou, M., Guo, P., Wang, T., Gao, L., Yin, H., Cai, C., Gu, J., Lü, X. 2017. Metagenomic mining pectinolytic microbes and enzymes from an apple pomace-adapted compost microbial community. *Biotechnology for Biofuels*, 10(1), 198.
- Zhu, N. 2006. Effect of low initial C/N ratio on aerobic composting of swie maure with rice straw. *Bioresource Technology*, 98, 9-13.

Zhu, L., Yang, H., Zhao, Y., Kang, K., Liu, Y., He, P., Wu, Z., Wei, Z., 2019. Biochar combined with montmorillonite amendments increase bioavailable organic nitrogen and reduce nitrogen loss during composting. *Bioresource Technology*, 294, 122224.

Zykwinska, A.W., Ralet, M.C.J., Garnier, C.D., Thibault, J.F.J. 2005. Evidence for in vitro binding of pectin side chains to cellulose. *Plant Physiology*, 139(1), 397-407.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

2. Hipótesis y Objetivos

Tal y como se ha descrito en el apartado de Introducción, el compostaje es un proceso de biotransformación aeróbica de la materia orgánica, que ocurre bajo condiciones controladas de humedad, temperatura y aireación. En los últimos años, dada la enorme problemática ambiental relacionada con la generación y acumulación de residuos de origen antropogénico, el compostaje se ha convertido en una alternativa efectiva, sostenible y respetuosa con la salud y el medio ambiente, que se dirige principalmente a la revalorización de diversos tipos de restos orgánicos de elevado valor agronómico.

Diferentes autores concluyen que la transformación adecuada de la materia orgánica mediante compostaje y, en consecuencia, la calidad del compost final dependerá en última instancia de la composición cualitativa y cuantitativa de los microorganismos asociados a los materiales compostados. Sin embargo, el conocimiento profundo de los microorganismos que forman una pila de compost es muy limitado si únicamente se tienen en cuenta los métodos tradicionalmente destinados a la detección de microorganismos considerados como “cultivables”. Dicha limitación se debe, fundamentalmente, al hecho de que los medios de cultivo artificiales no siempre proporcionan al microorganismo el entorno adecuado para su crecimiento. De hecho, solo una parte mínima de los microorganismos que componen una pila de compostaje son cultivables, lo que dificulta saber cuáles de ellos son los protagonistas reales en cada fase del proceso.

Tradicionalmente, la caracterización fisicoquímica y enzimática del proceso de compostaje ha servido de base para evaluar la estabilidad y el grado de madurez del compost. La evolución de varios parámetros, como la relación C/N, relación húngicos/fúlvicos, relación amonio/nitrato, índice de germinación, respirometría, así como distintas actividades enzimáticas, se han tenido en cuenta tradicionalmente al establecer el grado de estabilidad y madurez de un compost particular.

Dada la necesidad de conocer más en profundidad el componente microbiano del proceso de compostaje, estudios recientes basados en análisis metagenómico de poblaciones fúngicas y bacterianas, han cobrado gran importancia, permitiéndonos conocer la existencia de microorganismos que hasta ahora no se habían aislado en este proceso mediante técnicas tradicionales. Muchos de estos trabajos de investigación se han dirigido al establecimiento de posibles correlaciones entre funcionalidad microbiana y degradación de la materia orgánica, aunque son más escasas las investigaciones dirigidas a determinar qué indicadores microbianos de biodiversidad podrían predecir si un determinado proceso de compostaje se ha llevado a cabo de forma adecuada, o si un compost puede considerarse estabilizado y maduro. La principal

dificultad, en este sentido, se encuentra en la heterogeneidad de los materiales orgánicos de partida y en la supuesta necesidad de llevar a cabo procesos industriales estándar, sea cual sea el material de partida. Todo ello conduce a procesos que originan productos muy diferentes desde el punto de vista físico-químico-microbiológico, y la mayor parte de las veces con una calidad ínfima, apenas predecible.

Se podría plantear, por tanto, como objetivo general de esta Tesis Doctoral, la dilucidación de la singularidad de cada proceso de compostaje, en función de la heterogeneidad de materias primas y protocolos operativos. Para ello, se plantea como hipótesis de partida que no hay dos procesos de compostaje iguales y que ello puede relacionarse claramente con la estructura del metagenoma microbiano asociado a cada proceso. Ya que, el componente microbiano podría resultar insuficiente o confuso si se estudia de forma aislada, es imprescindible establecer la relación entre éste y el resto de parámetros físico-químicos y enzimáticos cambiantes a lo largo del proceso de compostaje. En definitiva, el **Objetivo Global** de este trabajo se basaría en establecer el grado de singularidad de cada proceso de compostaje cuando se realiza con diferentes materiales orgánicos en función de la evolución del microbioma y de las características físicas, químicas, enzimáticas y de actividad biológica de estos materiales a lo largo del proceso. Para la consecución de este Objetivo Global se establecieron los siguientes **Objetivos Específicos**:

- **Objetivo 1.- Selección de procesos de compostaje que emplean como material de partida diferentes tipos de materiales orgánicos residuales y diferentes procesos operativos.**

Para ello se recogieron 270 muestras procedentes de 15 instalaciones, previamente seleccionadas, dedicadas al compostaje de restos orgánicos de diversa naturaleza (Residuos Vegetales, Residuos Sólidos Urbanos, Residuos Agroalimentarios, Lodos de Depuradora y Alpeorujo).

- **Objetivo 2.- Establecimiento del metagenoma procariota y fúngico asociado a los procesos de compostaje seleccionados.**

Las actividades incluidas en este objetivo se dirigieron a la investigación de la estructura del microbioma en todas las muestras seleccionadas mediante técnicas metagenómicas para procariotas (bacterias y actinobacterias) y eucariotas (mohos y levaduras). Todas las muestras obtenidas en el Objetivo 1, se sometieron a un proceso de extracción de ADN metagenómico, obteniéndose las correspondientes genotecas, para realizar finalmente el análisis bioinformático y bioestadístico de los datos.

- **Objetivo 3.- Caracterización enzimática de las muestras seleccionadas.**

Gracias a la consecución de este objetivo se pudieron caracterizar todas las muestras de la colección de compost obtenidas en diferentes fases del proceso, en función de 11 actividades enzimáticas relacionadas con el metabolismo del C, N y P a lo largo del proceso de compostaje.

- **Objetivo 4.- Estudio comparativo de los resultados obtenidos.**

A partir de los grupos de resultados derivados de las actividades desarrolladas durante la ejecución de Objetivos 2 y 3, se inició la preparación de la matriz de datos, la cual sirvió de base para la realización del estudio descriptivo y analítico de los resultados obtenidos. El análisis estadístico de los datos se llevó a cabo mediante el programa Statgraphics Centurion XVII.

DISEÑO EXPERIMENTAL

3. Diseño Experimental

El Diseño Experimental que se indica a continuación muestra, en términos generales, la cronología del trabajo llevado a cabo, el cual derivó en la publicación de 3 artículos de investigación en revistas internacionales con un alto índice de impacto. Sondas publicaciones se corresponden con la consecución de los objetivos planteados en el apartado anterior (2. Hipótesis y Objetivos).

En el Diseño Experimental se ve claramente representada la consecución de los Objetivos de esta Tesis Doctoral. En él se indica el camino recorrido, desde la recogida inicial de muestras, durante el periodo 2016-2017. Durante la primera fase del trabajo, se llevó a cabo un exhaustivo examen físico-químico-biológico de las muestras, que incluyó un amplio rango de parámetros, abarcando los parámetros básicos de monitoreo, las principales actividades enzimáticas, y los parámetros relacionados con estabilidad y madurez de los productos finales (periodo 2016-2018). En paralelo, se llevó a cabo el análisis metagenómico de todas las muestras, dando por finalizado el análisis bioinformático de los datos, a finales del año 2019.



RESULTADOS

4. Resultados

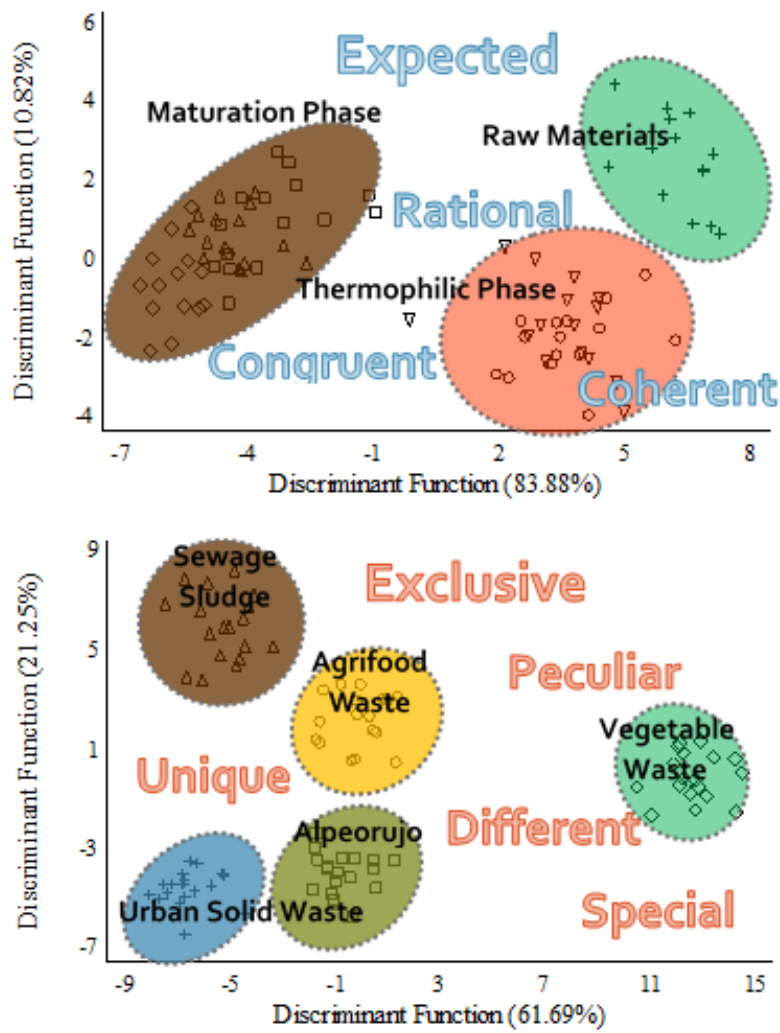
A continuación, se muestran los manuscritos correspondientes a los **tres artículos publicados en revistas Q1**, los cuales recopilan los resultados obtenidos en esta Tesis Doctoral. Cada uno de ellos se ha incluido en este documento **teniendo en cuenta las normas de autor de las revistas en las que han sido publicados**.

ARTÍCULO 1: 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.

ARTÍCULO 2: 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.

ARTÍCULO 3: 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, 123557.

GRAPHICAL ABSTRACT



ARTÍCULO 1

ARTÍCULO I

Enzymatic profiles associated with the evolution of the lignocellulosic fraction during industrial-scale composting of anthropogenic waste: Comparative analysis.

Estrella-González, M. J., Jurado, M. M., Suárez-Estrella, F., López, M. J., López-González, J. A., Siles-Castellano, A., Moreno, J.

Publicado en Journal of Environmental Management, 248 (2019), 109312.

Resumen: Debido al crecimiento exponencial de la población mundial y al cambio en sus hábitos de consumo, en las últimas décadas, la generación de residuos de diversa naturaleza ha aumentado significativamente. Es por ello que en la actualidad se han propuesto distintas estrategias para la gestión de los desechos orgánicos de una forma más sostenible. En la nueva Ley Europea de Residuos (Ley de Residuos de la UE, 2018), el compostaje se propone como una de las mejores opciones para gestionar adecuadamente los residuos orgánicos de origen antropogénico, porque no conlleva impacto ambiental y no implica un alto costo. Actualmente, la generación masiva de este tipo de residuos, así como su heterogeneidad, dificulta en muchos casos el control de este proceso de degradación a escala industrial. El objetivo principal de este trabajo fue comprobar si el proceso de compostaje es o no dependiente de la materia prima de partida. Por ello, se seleccionaron 15 instalaciones dedicadas al compostaje de 5 tipos diferentes de residuos orgánicos: Residuos Sólidos Urbanos, Residuos Vegetales, Lodos de Depuradora, Residuos Agroalimentarios y "Alpeorujo". Las muestras fueron recogidas en las diferentes fases térmicas del proceso (Fase Mesófila, Fase Termófila, Enfriamiento y Maduración), así como también se analizaron las correspondientes muestras a tiempo inicial y final de cada proceso. Los resultados revelaron perfiles fisicoquímicos y enzimáticos muy diferentes, así como diferentes grados de humificación según el proceso y las materias primas de partida. Sin embargo, parámetros como la β -glucosidasa, la amilasa, la relación lignina/holocelulosa y la tasa de humificación mostraron tendencias similares en todos los casos. Todos ellos podrían actuar como indicadores importantes para evaluar la calidad de un proceso de compostaje, a pesar de la heterogeneidad de los materiales de partida.

Enzymatic profiles associated with the evolution of the lignocellulosic fraction during industrial-scale composting of anthropogenic waste: comparative analysis

Estrella-González, M.J., Jurado, M.M., Suárez-Estrella, F.* , López, M.J., López-González, J.A., Siles-Castellano, A. and Moreno, J.

Department of Biology and Geology, CITE II-B, University of Almería, Agrifood Campus of International Excellence, ceiA3, 04120, Almería (Spain). Phone: +34 950 015 891.

*Corresponding author: Phone: 00 34 950 015 891; Fax: 00 34 950 015 476; E-mail: fsuarez@ual.es (F. Suárez-Estrella)

Abstract

In the new European Waste Law, composting is proposed as one of the best options to properly manage organic waste of anthropogenic origin. Currently, the massive generation of this type of waste, as well as its heterogeneity, makes difficult in many cases control this process of degradation on an industrial scale.

In this work, 15 facilities were selected based on 5 types of organic waste: Urban Solid Waste, Vegetable Waste, Sewage Sludges, Agrifood Waste and “Alpeorajo”. The samples were collected in different thermal phases. The results revealed very different physicochemical and enzymatic profiles, as well as different degrees of humification depending on the process and the raw materials. However, parameters such as β -glucosidase, amylase, lignin/holocellulose ratio and humification rate showed similar trends in all cases. All of them could act as important indicators to evaluate the quality of a composting process, despite the heterogeneity of the starting materials.

Keywords: Industrial-scale composting, Lignocellulose, Humification, Carbon cycle-related enzymes, Compost quality.

Highlights

Depending on the raw materials, each industrial-scale composting process is unique

Enzymatic profiles of each process evolve differently, but showing similar trends

Despite the complexity of the materials, microbiota act to produce quality compost

β -glucosidase and amylase activities serve as indicators of the composting progress

Humification rate may reveal bad practices in industrial-scale composting protocols

1 Introduction

In recent decades, the amount of municipal waste and sludge from wastewater treatment facilities has increased significantly due to the exponential growth of the world population and the consumer habits of the current society. In the same way, this has led to the mass generation of other types of organic waste, such as those derived from the agricultural and agrifood industries, as well as the extraction of olive oil (Alburquerque et al. 2009; Wei et al. 2019). Currently, many strategies have been proposed for the management of organic waste (biowaste) in a more sustainable manner. The composting process is considered one of the most attractive, in this sense, because it does not entail an environmental impact and does not imply a high cost. In fact, according to the recommendation of the European Waste Law (2018), the composting process is positioned as the first and most appropriate alternative for the treatment and revaluation of biological waste.

Therefore, in order to control the quality of composting product, based on its maturity, each country has established its own regulations on the ideal characteristics that compost must possess to consider it with enough grade for soil application. In Spain, according to BOE A-2017-14332, the final product of composting should meet the following properties: a minimum of 35-40% organic matter, no more than 40% humidity and C/N ratio values below 15-20. Additionally, several parameters have been established to determine the state of maturity of a compost, among which are temperature, odor, color, cation exchange capacity, humified fractions and other respirometric variables (Iglesias-Jiménez et al. 2008). Different studies have also correlated this state with other factors such as enzymatic indicators or biodiversity profiles during composting (Jurado et al. 2014; López-González et al. 2015). Therefore, at a legislative level, knowing the C/N ratio, moisture and organic matter content of a certain compost is considered fundamental to determine if that product is appropriate from an agronomic point of view. However, (i) could it be thought that a compost will have a different lignocellulosic content depending on the raw material?, (ii) or that the biotransformation of organic waste occurs in the same way depending on the starting materials?. In summary, is the composting process dependent or independent of the different raw materials?.

Raw materials used in composting are composed of both assimilable compounds and complex polymers. The most recalcitrant fractions, such as lignocellulose, must be processed enzymatically before being used by microorganisms as carbon and nitrogen sources. This fraction, whose biodegradation is important for the process of humification and stabilization at the end of the composting process, is difficult to transform (Insam and de Bertoldi, 2007). However, although achieving an optimal

degree of degradation is decisive to reach the appropriate maturity for a quality compost, the enzymatic strategies and the humification pathways could be very different in each process.

Enzymes produced by microorganisms participate in numerous biochemical transformations of organic matter occurred throughout the process (Mondini et al. 2004). Different studies have related the enzymatic biotransformations on lignocellulosic fractions with the compost stability degree (Ros et al. 2006; Jurado et al. 2015; Villar et al. 2016). In this sense, enzymatic evolution during the composting process could be considered an indicator of the material behavior and, therefore, of the state of maturity (Castaldi et al. 2008).

Since organic waste is constituted by a significant carbon fraction, enzymes related to carbon cycle are determinant during waste biotransformation. β -glucosidase, amylase, cellulase and xylanase are some of the most determinant enzymes in degradation of polymers and other saccharides during composting. Amylase is responsible for degradation of starch, resulting in glucose monomers. Xylanase is responsible for degradation of hemicellulose. Both, cellulase and β -glucosidase, participate in the degradation of cellobiose, and all of them play an important role in the degradation of lignin (Jurado et al. 2014, 2015).

In order to elucidate the influence of raw materials on the biodegradation dynamic of lignocellulosic fractions, and to determine the exclusiveness of each composting process, stabilization processes of 5 different type of materials, including Vegetable Waste (VW), Urban Solid Waste (USW), Agrifood Waste (AW), Sewage Sludges (SS) and olive mill waste "Alpeorujo" (ALP), were analyzed in this work. To verify this hypothesis, the following goals were set: (1) to analyze the conduct of physicochemical parameters related to the control and monitoring of the different composting processes, (2) to determine the evolution of lignocellulose, hemicellulose, cellulose and lignin, as well as different humification parameters, (3) to evaluate the effect of different enzymatic activities related to carbon fractions, and (4) to establish correlations between different groups of parameters on the basis of the diversity of the raw materials. This research will provide useful information about the way in which the processes behave, independently of the starting material and the operational activities.

2 Material and methods

2.1 Sampling strategy and experimental set-up

Industrial processes carried out in 15 companies dedicated to the stabilization of different organic materials were analyzed. Each one of them was chosen to obtain a collection of 270 samples (15 plants x 6 stages x 3 repetitions) made from different raw materials, and consequently to observe the influence of starting waste on all the biotransformation processes. The composting piles selected for this purpose were prepared outside, in rows of 7-15 m in length and 3-5 m in width, and turned periodically according to the periods of decrease of the internal temperature of the piles. Although each company works with mixtures of different organic materials and in very variable proportions, the main waste selected were as follow: Vegetable Waste (VW), Urban Solid Waste (USW), Sewage Sludges (SS), Agrifood Waste (AW), and Olive oil mill wastewater “Alpeorujo” (ALP). Samples were collected at 6 critical periods according to temperature evolution (including initial and final products): Raw Materials (RM), Mesophilic phase (MES), Thermophilic phase (THER), Cooling phase (COOL), Maturation phase (MAT) and Final Product (FP). The temperature was periodically measured in situ with long-handled PT100 probes (50 cm). During each stage, subsamples were taken from nine different locations, covering several depths of each pile, by means of a soil sampling probe capable of reaching about 1-2 meters depth. Subsamples were mixed in equal amounts, in order to achieve a homogeneous and representative sample and, later, divided into three parts to work for analytical replicates.

2.2 Basic parameters of control and monitoring of composting processes

Several physicochemical parameters, based on those typically used for the control and monitoring of composting processes, were studied in this work.

The moisture content (M) was determined by drying at 105°C for 24 h. The pH was analyzed in a 1:10 (w/v) water extract. Bulk density (BD) was measured according to the US Composting Council (USCC, 2001). Elemental carbon (EC) and nitrogen (N) were determined in solid samples by dry combustion at 950°C using a LecoTruSpec C–N Elemental Analyzer (Leco Co., St. Joseph, MI, USA). Organic matter content (OM) was assessed by determination of weight loss on ignition at 550°C to a constant weight. Soluble organic carbon (SOC) was analyzed in extracts obtained from fresh samples according to method described by Hofman and Dusek (2003), and using a TOC-VCSN analyzer (Shimadzu, Japan). Extracts were prepared 1:4 (w:v) of fresh sample in 0.5 M K₂SO₄, shaken at 200 rpm for 30 min, and filtered through filter paper. The microbial biomass C (C_{bio}) was determined using the fumigation and extraction method according to Vance et al. (1987).

2.3 Lignocellulosic fractions

Cellulose (CEL), hemicellulose (HC) and lignin (LIG) fractions were determined by a fiber analyzer ANKOM 200/220 (Ankom Technology, Macedon, NY, USA). The methods applied in this case were those established by ANKOM Technology for fiber analyses (<http://www.ankom.com/procedures.aspx>). Holocellulose was expressed as the sum of CEL and HC values to calculate an additionally ratio, Lignin/Holocellulose.

Biodegradation ratios of HC, CEL and LIG were calculated according the following formula (Wang et al. 2011):

$$R_n (\%) = [(m_n - m_o) / m_n] \times 100,$$

where R_n is the degradation ratio (%) for n^{th} sampling,

m_o : initial content (mg g^{-1}) of the lignocellulosic fraction (HC, CEL or LIG),

m_n : content (mg g^{-1}) of the lignocellulosic fraction (HC, CEL or LIG) for n^{th} sampling.

2.4 Enzymatic analysis

β -glucosidase, amylase, cellulase and xylanase activities were analysed and the results were expressed as $\mu\text{mol product g}^{-1} \text{ h}^{-1}$ on a dry weight basis.

The estimation of β -glucosidase activity was carried out following the method described by Tabatabai (1982). This method is based on the colorimetric estimation of p-nitrophenol released by the hydrolysis of the p-nitrophenyl- β -D-glucopyranoside (25 mM pNPG in MUB-HCl buffer, pH6) at 37 °C for 1 h. Cellulase activity was determined by a modified method described by Libmond and Savoie (1993), based on the colorimetric estimation of the glucose released in the reaction occurred between the enzyme and the substrate (1% carboxy methyl cellulose in 50 mM sodium acetate buffer, pH 5) at 37 °C for 2 h. The method described by He et al. (1993) was applied for the detection of xylanase activity; this protocol was based on the colorimetric estimation of the glucose released in the reaction occurred between the enzyme and the substrate (1% xylan solution in 50 mM citrate-phosphate buffer, pH 6.5) at 30 °C for 30 min. On the other hand, the amylase activity was carried out following the method described by Mishra et al. (1979), which consisted of a colorimetric estimation of the glucose released in the reaction occurred between the enzyme and the substrate (1% soluble starch in 0.5 M phosphate buffer, pH 5.5) at 35 °C for 24 h.

2.5 Humification parameters

Humic fractions were extracted and analyzed as described by Cavani et al. (2003). 2.0 g of sample were mixed with 100 mL of 0.1 M NaOH and 0.1 M $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7 \times 10\text{H}_2\text{O}$ and incubated for 48 hours at 65 °C under continuous stirring (120 rpm) in a thermostatic

water bath. After extraction, the samples were centrifuged at 10000 g for 10 min and the supernatants were filtered through a 0.8 mm filter (Standard MF-Millipore Membrane, EMD Millipore Corporation, Billerica, MA, USA, 2013). This filtered solution constituted the total extractable carbon (TEC) that was fractionated additionally in humified (humic and fulvic acids) and not humified fractions. Total Organic Carbon (TOC), Total extractable carbon (TEC), non-humified carbon (C_{NH}), humic-like carbon (C_{HA}) and fulvic-like carbon (C_{FA}) were evaluated by means of carbon analysis in the corresponding fractions (TOC-VCSN, Shimadzu, Japan). In addition, humification rate was calculated: $HR = \% ((C_{HA} + C_{FA})/TOC) \times 100$.

2.6 Statistical analyses

Data were subjected to a statistical analysis using Statgraphics Centurion XVI.I (StatPoint Technologies Inc., Virginia). Analysis of variance (ANOVA) and multiple comparison tests (Least Significant Difference, LSD) were performed to compare the mean values of the analyzed variables and determine the influence of the different selected factors ($p < 0.05$). Discriminant analyses were used to separate groups of independent variables according to the stages of composting and the type of raw materials. Likewise, the relations between pairs of variables for each starting material were analyzed using the Pearson correlation coefficient.

3 Results and Discussion

3.1 Monitoring of the control parameters during the composting processes on an industrial scale: moisture, pH, bulk density (BD), organic matter (OM), C/N ratio, soluble organic carbon (SOC) and biomass carbon (C_{bio}).

The new legislation on waste is clearly oriented to the needs of the population in relation to the current concept of Circular Economy or Bioeconomy (EU Waste Law, 2018). With this idea it is intended that materials do have a circular return to their origins. It means, to be transformed into others less harmful to the environment and living beings. The regulations that entered into force establish very ambitious targets for recycling, setting several periods for the fulfillment of very strict objectives related to the reduction of residues, including organic waste. Specifically, before 2023, the collection and transformation of so-called biological wastes should be managed in a very controlled way. In this sense, without a doubt, composting is positioned as one of the most important tools for the future of biological waste management (EU Waste Law, 2018).

Although the current European legislation on waste raises a series of recommendations on the management of organic waste through composting, each

member state is governed by a series of specific regulations. In the particular case of Spain, this is included in the Official State Bulletin (BOE A-2017-14332 on fertilizer products). In above regulations, reference is made to the basic characteristics that a compost must have in order to be considered of quality, with special emphasis on parameters such as humidity (<40%), minimum content in organic matter (35-45%) or C/N ratio (<15-20).

The temperature inside the pile is one of the main factors to consider during a composting process, since it directly affects the rate of degradation of organic matter as well as determines the stability of the product. Stentiford (1996) suggested that temperatures above 55 °C maximize the sanitation of materials, while temperatures between 45 and 55 °C improve biodegradation rates. According to the Environmental Protection Agency (EPA, 2013), during the thermophilic phase of a composting process, temperatures above 55 °C must be reached for 3 consecutive days. In this research work, 15 industrial-scale composting plants dedicated to the management of different types of bio-waste were selected. The average temperature in the thermophilic stage for each installation met the minimum established by the EPA. The highest average temperature was reached in the VW piles (65 °C). In the rest of composting plants, the average temperature in the thermophilic phase ranged between 50 and 55 °C. All temperature data were provided by the responsible companies in each case. The mean values of temperature as a function of the starting materials are provided in Table S1 (see Supplementary material, Table S1).

Table 1 shows the values of the control parameters that were used to verify the composting processes evolution. Although the raw material (RM) and the final product (FP) are not real phases of the composting process, it is important to highlight the relevance of both stages to evaluate the optimal evolution of the composting process. In fact, in this work, the biooxidative phase involves raw materials (RM), mesophilic (MES) and thermophilic (THER) stages, while the maturation phase refers to the pre-maturation (MAT), cooling (COOL) and final product (FP) stages. With respect to the results shown in Table 1, in all cases, the average moisture values were higher during the biooxidative phase of the composting process. The initial humidity of the piles was optimal in the case of the facilities dedicated to AW and ALP, while this parameter was much higher than recommended in those companies dedicated to USW, VW and SS. During the process, the moisture content contributes to a better degradation of organic matter and maintenance of the temperature during a longer period of time, because it favors the microbial activity (Silva et al. 2013). However, at the end of composting, the reduction in moisture content is a positive sign of decomposition and compost maturity (Ameen et al. 2016). In all the analyzed processes the humidity of the piles decreased

over time to reach values around 30-40% in the final products. Only in the case of products made from USW, moisture values were detected around 11%, which were considered excessively low (Table 1).

Table S1. Evolution of the temperature during the composting process depending on the different starting materials. (VW: Vegetable Waste; USW: Urban Solid Waste; SS: Sewage Sludges; AW: Agrifood Waste, ALP: Alpeorujó). LSD values are indicated for each composting phase and raw material (Fisher LSD test at $p > 0.05$). Values with the same letter are not significantly different.

ORGANIC WASTE					
SAMPLING	VW	USW	SS	AW	ALP
RM	20,00a	20,00a	20,33a	16,94a	20,00a
MES	36,67b	20,00a	28,83c	28,40bc	24,77ab
THER	65,00 b	52,33b	50,00e	50,54d	54,33e
COOL	28,67ab	25,67a	31,67d	32,98c	49,00de
MAT	31,67ab	28,33a	26,27b	25,77b	33,33bc
FP	30,00ab	20,00a	20,00a	19,80a	40,00cd

Bulk density (BD) is an important factor to condition the initial mixtures in the composting processes. BD also influences the mechanical properties of the compost, such as strength, porosity and ease of compaction (Agnew and Leonard, 2003). In this work, the values of pH and BD increased throughout the composting process (Table 1). The final pH values of all the compost oscillated around alkaline values. Singularly high were the pH values of the compost based on VW and ALP (López-González et al. 2015).

Table 1. Evolution of moisture (M), pH, bulk density (BD), organic matter (OM), C/N ratio, soluble organic carbon (SOC) and biomass carbon (C_{bio}) throughout composting of 5 types of organic waste (USW: Urban Solid Waste; VW: Vegetable Waste; SS: Sewage Sludge; AW: Agrifood Waste; ALP: Alpeorujo). Composting phases: raw materials (RM), mesophilic phase (MES), thermophilic phase (THER), cooling phase (COOL), maturation (MAT) and final product (FP). Nine repetitions have been taken into account in each sampling. Values followed by same letters are not significantly different (P < 0.05) according to Fisher's LSD test.

Organic Waste	Sampling	M (%)	pH	BD (g/cm ³)	OM (%)	C/N	SOC (%)	C _{bio} (%)
USW	RM	78.20 ^c	5.16 ^a	0.21 ^c	74.73 ^d	28.47 ^e	2.37 ^c	0.20 ^c
	MES	17.73 ^a	7.84 ^b	0.14 ^a	66.26 ^c	20.16 ^d	1.23 ^b	0.04 ^a
	THER	36.70 ^b	8.43 ^d	0.22 ^{cd}	54.14 ^a	14.03 ^c	0.62 ^a	0.12 ^b
	COOL	21.07 ^a	8.12 ^c	0.18 ^b	57.60 ^b	15.76 ^b	0.51 ^a	0.05 ^a
	MAT	13.05 ^a	8.64 ^d	0.25 ^d	51.88 ^a	12.09 ^a	0.63 ^a	0.05 ^a
	FP	11.31 ^a	8.66 ^e	0.22 ^{bc}	53.91 ^a	11.79 ^a	0.61 ^a	0.04 ^a
VW	RM	85.94 ^f	8.10 ^c	0.12 ^{ab}	74.06 ^e	12.63 ^{ab}	0.49 ^a	0.05 ^{ab}
	MES	77.05 ^e	8.43 ^d	0.10 ^a	70.33 ^d	14.18 ^{bc}	0.52 ^a	0.05 ^{ab}
	THER	46.97 ^d	5.57 ^a	0.16 ^{bc}	69.35 ^d	15.45 ^c	1.41 ^c	0.11 ^d
	COOL	53.42 ^c	6.93 ^b	0.18 ^{cd}	63.20 ^c	15.05 ^c	1.36 ^c	0.08 ^c
	MAT	43.92 ^b	8.87 ^e	0.19 ^{cd}	58.85 ^b	12.34 ^a	0.58 ^{ab}	0.06 ^b
	FP	41.05 ^a	9.18 ^e	0.22 ^d	48.43 ^a	11.73 ^a	0.68 ^b	0.03 ^a
SS	RM	81.87 ^e	7.95 ^b	0.28 ^b	71.97 ^e	9.29 ^e	0.25 ^c	0.06 ^a
	MES	67.09 ^c	8.47 ^d	0.19 ^a	58.05 ^d	7.32 ^b	0.05 ^a	0.10 ^b
	THER	73.68 ^d	8.59 ^{de}	0.23 ^a	57.18 ^d	8.42 ^c	0.13 ^b	0.10 ^b
	COOL	38.23 ^b	8.62 ^e	0.42 ^c	49.40 ^b	8.24 ^a	0.15 ^b	0.15 ^c
	MAT	35.74 ^{ab}	8.27 ^c	0.44 ^c	53.38 ^c	6.75 ^a	0.22 ^c	0.16 ^c
	FP	30.80 ^a	7.72 ^a	0.40 ^c	47.19 ^a	8.92 ^d	0.27 ^c	0.15 ^c
AW	RM	65.59 ^b	6.67 ^a	0.21 ^a	62.51 ^b	16.66 ^b	0.13 ^{ab}	0.14 ^c
	MES	66.60 ^b	7.41 ^b	0.20 ^a	72.95 ^c	19.16 ^d	0.18 ^{bc}	0.08 ^b
	THER	45.56 ^b	8.44 ^c	0.21 ^a	66.96 ^b	17.74 ^c	0.26 ^d	0.08 ^b
	COOL	33.16 ^a	8.60 ^d	0.27 ^b	50.64 ^a	12.51 ^a	0.22 ^{cd}	0.03 ^a
	MAT	35.15 ^a	8.72 ^e	0.30 ^b	52.73 ^a	12.69 ^a	0.10 ^a	0.03 ^a
	FP	30.45 ^a	8.67 ^{de}	0.29 ^b	52.10 ^a	11.83 ^a	0.14 ^{ab}	0.04 ^a
ALP	RM	62.48 ^e	5.52 ^a	0.18 ^a	74.85 ^c	19.02 ^b	1.55 ^c	0.05 ^b
	MES	57.36 ^d	5.91 ^{ab}	0.16 ^a	73.52 ^c	19.96 ^b	1.08 ^b	0.03 ^{ab}
	THER	51.17 ^{bc}	6.15 ^b	0.14 ^a	75.60 ^c	23.97 ^c	1.40 ^c	0.05 ^{ab}
	COOL	48.01 ^b	9.17 ^c	0.28 ^b	60.07 ^b	14.82 ^a	0.65 ^a	0.04 ^{ab}
	MAT	51.68 ^c	9.28 ^c	0.33 ^c	55.90 ^a	14.45 ^a	0.46 ^a	0.05 ^b
	FP	42.01 ^a	9.46 ^c	0.26 ^b	60.23 ^b	15.65 ^a	0.73 ^a	0.03 ^a

Regarding the percentage of organic matter (OM), it decreased considerably in all the processes, which supports the fact that in all cases the biotransformation of the starting materials was being carried out. The initial content in OM ranged between 62 and 74%, detecting the highest loss of organic matter at the end of the USW (27%), VW

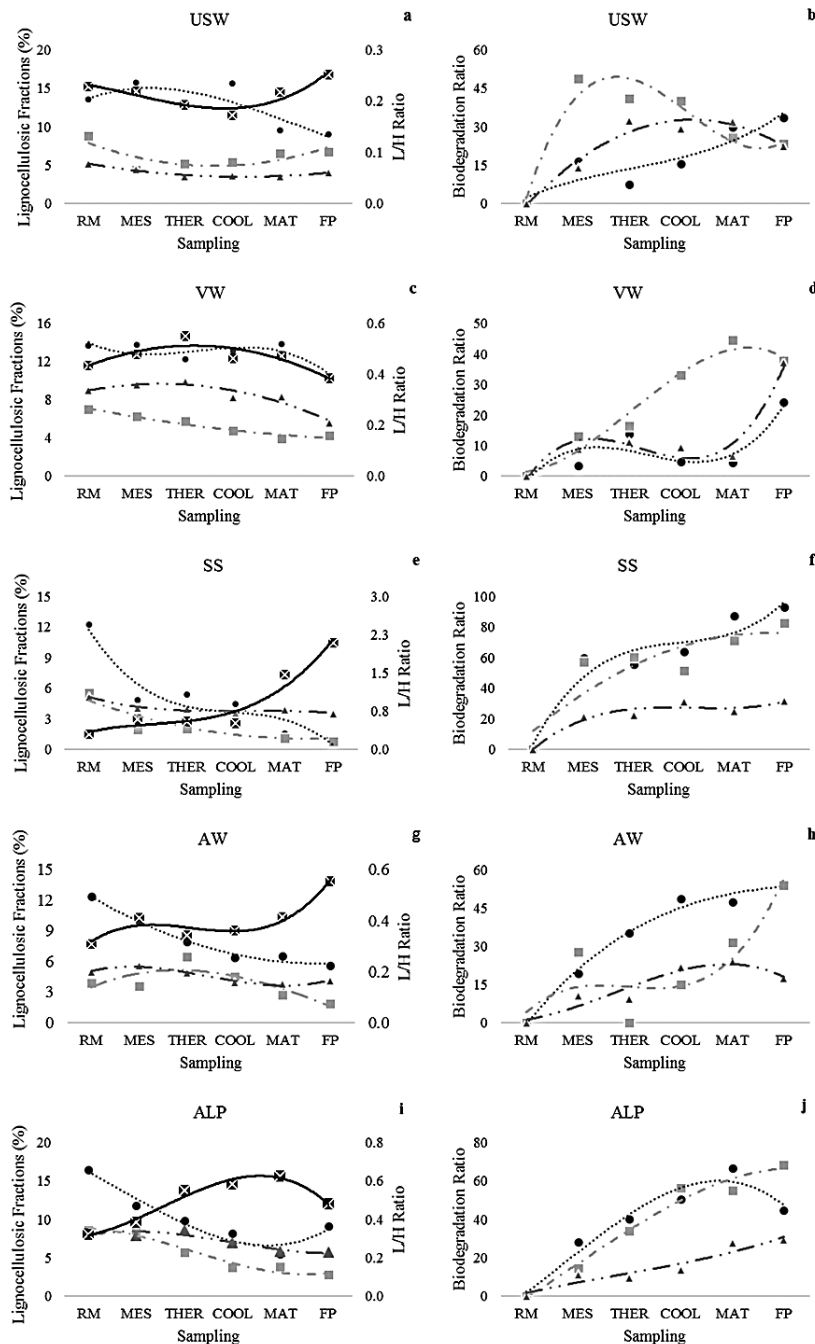
(34%) and SS (34%) processes. The percentage of loss of organic matter for the other samples (AW and ALP) ranged between 16 and 19% (Table 1). Although in some cases the final OM values were somewhat high, coinciding with what was obtained by other authors (Jurado et al. 2015; López-González et al. 2015).

At the beginning of composting, a C/N ratio around 25-30 is considered optimal; however, these initial values were only observed in the case of processes made from USW. This fact confirms that, in many cases, the conditioning of the starting materials in the industrial scale composting is not entirely adequate, due to the accidental mixing of fresh materials with other partially biotransformed ones, which negatively could affect the balance between C and N within the piles. Only in the case of USW samples, the decrease in this parameter was greater than 50% compared to the initial values. According to Guo et al. (2012), the C/N ratio directly influences the maturity of the product obtained, affecting other parameters. For example, when in a composting process the initial C/N ratio is not adequate, it evolves unexpectedly and influences the content of SOC and C_{bio} , which may even increase at the end of the process (Table 1). On the contrary, soluble organic carbon is a fraction that constitutes a rapid source of carbon and energy for growth and microbial activity and, in suitable composting, it is expected to decrease throughout the process (Jurado et al. 2014, 2015). Whilst, probably related to an incorrect C/N ratio at the beginning, C_{bio} did not show significantly lower values at the end of the process in the case of the VW and SS processes (Table 1).

3.2 Evolution of lignocellulosic fractions during the composting processes on an industrial scale

The evolution of lignocellulosic fractions and the changes in the degradation rates of lignocellulose during industrial-scale composting of different wastes are shown in Figure 1. The biodegradation of lignin during the composting process generally occurs late and at very low rates (Malherbe and Cloete, 2002). In addition, it acts as a protective factor for the degradation of cellulose and hemicellulose. Both aspects complicate the decomposition of this fraction in the materials that are being composted. In any case, closely monitoring the changes that this fraction undergoes during composting, can help to understand how the contribution of readily available compounds for growth and microbial activity occurs. Adequate degradation of the lignocellulose fraction is crucial to achieve a mature product, free of toxicity to be applied in agricultural soils.

Fig. 1. Evolution (a, c, e, g, i) and biodegradation ratio (b, d, f, h, j) of cellulose CEL (●), hemicellulose - HC (■), lignin - LIG (▲) and lignin/holocellulose ratio - L/H (⊗) throughout composting of 5 types of organic waste. Values are the mean of nine replicates. LSD values are independently shown for each parameter and composting process: USW (LSD_{CELa}=0.9349; LSD_{HCa}=1.3582; LSD_{LIGa}=0.2018; LSD_{L/Ha}=0.0083, LSD_{CELb}=5.1583; LSD_{HCb}=9.3066, LSD_{LIGb}=3.0716), VW (LSD_{CELc}=0.7784; LSD_{HCC}=1.1319; LSD_{LIGc}=0.5046; LSD_{L/Hc}=0.0275; LSD_{CEld}=2.5893, LSD_{Hcd}=9.9096, LSD_{LIGd}=3.9493), SS (LSD_{CELe}=0.9405; LSD_{HCe}=1.1049; LSD_{LIGe}=0.2886; LSD_{L/He}=0.0828; LSD_{CELf}=4.0721, LSD_{Hcf}=8.3252, LSD_{LIGf}=2.9866), AW (LSD_{CELg}=1.0206; LSD_{HCG}=1.1029; LSD_{LIGg}=0.3964; LSD_{L/Hg}=0.0313; LSD_{CELh}=5.7033, LSD_{HCh}=6.9002, LSD_{LIGh}=3.0402) and ALP (LSD_{CELi}=0.6037; LSD_{HCI}=0.9257; LSD_{LIGi}=0.3036; LSD_{L/Hi}=0.0284; LSD_{CELj}=1.8968, LSD_{HCIj}=5.7578, LSD_{LIGj}=4.3222).



In general terms, cellulose, hemicellulose and lignin decreased along the composting process, though this decrease was more noticeable in the case of the cellulosic fraction. The lignin/holocellulose (L/H) ratio shows a tendency to increase at the end of the process, as a result of the transformation of lignocellulose (Fig. 1a, c, e, g, i). Exceptionally, in the case of the processes elaborated from plant wastes (VW), cellulose remained practically constant in the intermediate stages, to then decrease at the end of the process. Meanwhile, hemicellulose and lignin decreased continuously. The L/H ratio showed a tendency to increase in the intermediate stages, although the final value was slightly lower than that obtained in the initial stage (Fig. 1c). This fact could be due to the accidental introduction of fresh material during the process.

The degradation degree of all the lignocellulosic fractions was very variable. Cellulose degradation reached values around 25-50% at the end of the processes made from USW, VW, AW and ALP (Fig. 1b, d, h, j) while it was higher than 80% in the case of SS processes (Fig. 1f). Hemicellulose degradation ranged between 20-80% approximately, being minimal in the case of USW processes and maximum in the case of SS processes. Lignin, on the other hand, did not exceed 20% degradation (Fig. 1b, f, h, j), excepting in the case of VW processes where lignin degradation almost reached 40% (Fig. 1d).

The starting material used in each process consisted of 12-15% cellulose, and 4-8% hemicellulose and lignin. In general, the fraction most affected by the composting process was cellulose, in contrast to lignin and hemicellulose, whose concentrations remained almost unchanged compared to their content in raw materials. Other authors observed this same effect in previous works (Jurado et al. 2014). In some cases, the degradation of cellulose became more noticeable when a substantial amount of hemicellulose had been degraded. This fact may be due to the fact that the lignin-hemicellulose complex between the cellulose fibers decreases the available surface area, and prevents easy access to cellulose by the microorganisms of the process and its enzymes (Komilis and Ham, 2003).

According to other authors, however, hemicellulose is the fraction of lignocellulose that is easier to degrade and generally decomposes to a greater extent, in comparison with cellulose and lignin. Taking into account that hemicellulose is a polysaccharide with a lower molecular weight than cellulose and lignin, Wei et al. (2019) stated that in general that is subject to a greater loss during composting. These authors also stated that the high temperatures reached during the thermophilic phase are important for the degradation of hemicellulose, while the degradation ratio of cellulose/lignin increases from the cooling phase. In fact, Tuomela et al. (2000) previously reported that cellulose

and hemicellulose degrading microorganisms require high temperatures, even above 60 °C, while most degradation of lignin generally occurs at lower temperatures.

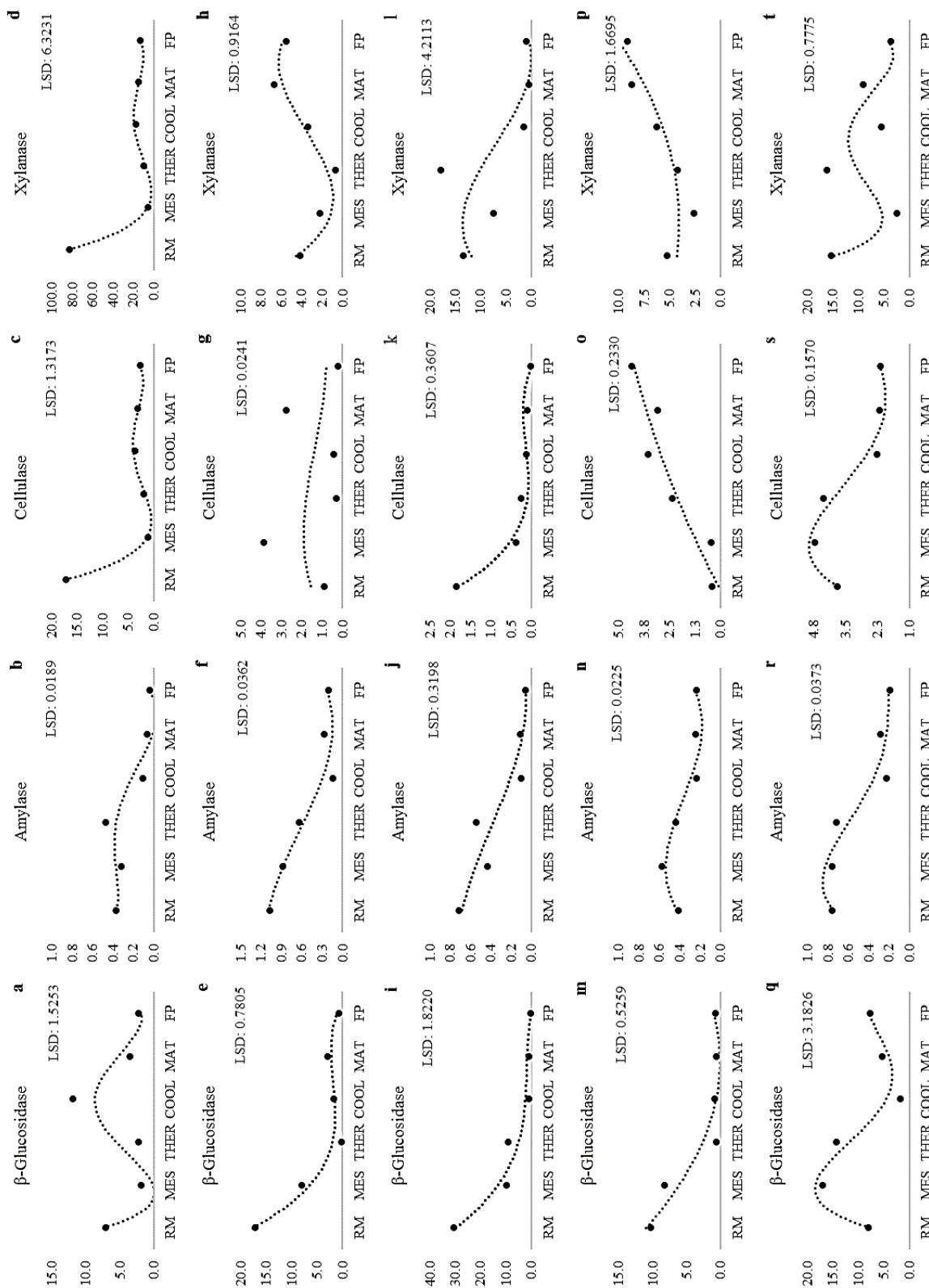
Therefore, the results corresponding to the degradation of the lignocellulosic fractions showed different profiles depending on each type of raw material. This fact confirms that the transformation of polymeric carbon into soluble, simple, and available carbon compounds for the microorganisms present in the piles is unique and depends on the materials used. In spite of this, the global tendencies of biodegradation profiles were very similar in all the composting processes evaluated on an industrial scale, especially with regard to cellulose.

3.3 Evolution profiles of β -glucosidase, Amylase, Cellulase and Xylanase activities during the composting processes

The biodegradation profiles of the lignocellulosic fractions described above depend absolutely on the activity of the microorganisms present in the composting processes analyzed (Wei et al. 2019). This dependence refers more specifically to the activity of a group of enzymes of microbial origin directly related to the degradation of this type of molecules. Although culturable microbial communities have not been analyzed in this work, a group of enzymes highly involved in the degradation of very complex molecules has been selected. Such is the case of cellulose, hemicellulose and lignin, which can serve as bioindicators of the optimal evolution of the composting processes. In this way, Figure 2 shows the evolution of the activities of β -glucosidase, amylase, cellulase and xylanase in the different composting processes analyzed, depending on each raw material and the different stages of composting.

Figures 2a-d show the trends of these four enzymatic activities in composting processes made from USW. All enzymatic activities analyzed decreased as the composting processes progressed. Even so, the activity of the β -glucosidase showed a more oscillating behavior, detecting important peaks of activity during the cooling phase of the process. In this type of waste, the levels of cellulase and xylanase activity at the beginning of the processes were maximum, probably due to the nature of the starting materials.

Fig. 2. Dynamics of β -glucosidase, Amylase, Cellulase and Xylanase activities throughout composting made of USW (a-d), VW (e-h), SS (i-l), AW (m-p) and ALP (q-t). Values are the mean of nine replicates. LSD values are indicated for each enzymatic activity and raw material (Fisher LSD test at $p > 0.05$).



Figures 2e-h correspond to the evolution of enzymatic activity in composting processes made from Vegetable Waste (VW). In general terms, the enzymatic activity of the samples decreased progressively throughout the composting process, although in a more discrete way in the case of the cellulase and xylanase activities, or even increased towards the end of the maturation phase (Fig. 2h). These activity profiles were very similar to those observed in the case of the processes made from AW as main residues (Fig. 2m-p). It should be noted that the increase in the xylanase activity at the end of both processes (VW and AW) is directly related to the biodegradation rates of cellulose and hemicellulose represented in Figure 1. Although in all cases an increase in the biodegradation towards the end of the composting process was perceived, a more pronounced degradation peak was detected in the cooling phase in the case of the processes made of VW and AW (Fig. 1g, 1i). This could be due to the complexity of the lignocellulosic material or the entry of semi-processed or fresh (untreated) materials in the intermediate stages of the composting process.

With regard to the plants elaborated from Sewage Sludges (Fig. 2i-1), a clear downward trend of all the enzymatic activities analyzed was observed. The most pronounced decrease was detected in the β -glucosidase and cellulase activities, whereas it was more gradual in the case of the amylase and xylanase activities. In the latter case, an increase in the activity was observed even during the thermophilic stage. It should be noted that the evolution profiles of the enzymes involved in the degradation of lignocellulosic fractions in Sewage Sludges plants coincide with the higher rates of biodegradation of these fractions at the end of the process (Fig. 1h).

With respect to the enzymatic activities corresponding to the processes elaborated from "Alpeorajo", Figures 2q-t show identical profiles of β -glucosidase, amylase and cellulase activities. Those were significantly greater during the biooxidative phase of the processes and gradually decreased towards the end of them. However, the evolution of the xylanase activity (directly related to the degradation of hemicellulose) seemed to be controlled by the other three activities indicated above, since it was oscillating throughout the process, showing two peaks of maximum activity at the beginning and then in the cooling phase (Fig. 2t).

In view of the results obtained, it can be concluded that the selection of raw materials strongly influenced the enzymatic profiles of the different composting processes analyzed. In general terms, all enzymatic activities tended to decrease at the end of the process (Fig. 2 a-p). However, in some cases, β -glucosidase activity increased during the biooxidative phase, showing an oscillating profile, which could be due to the continuous release of molecules more readily available for microorganisms (Fig. 2a, 2q). This fact coincided mainly with those processes in which the initial cellulase activity was

remarkably high (USW and ALP, Fig. 2c, 2s). In all processes, amylase showed a similar activity profile, so that it was more or less constant during the first stages of the processes and then progressively decreased during the maturation phase to practically undetectable values at the end of the composting process (Fig. 2b, 2f, 2i, 2n, 2r). Although β -glucosidase and amylase activities showed the same trend in all processes, the highest values were observed in those made from Vegetable Waste (VW). Other authors have detected similar values of β -glucosidase in composting processes from urban solid waste (Zang et al. 2018).

Cellulase and xylanase activity profiles were generally downwards, except in the case of the processes made from VW and AW, where those activities increased towards the end of the composting process (Fig. 2g, 2h, 2o, 2p). In both cases, the activity profiles coincide with what was observed in Figure 1, since it was in the VW and AW processes that a sudden change in the biodegradation rates of the lignocellulosic fractions was observed from the cooling phase onwards. In contrast to β -glucosidase, cellulase and xylanase activities were strongly influenced by the availability of the different lignocellulosic fractions, so their enzymatic profiles were highly variable. As described by Wei et al. (2019), xylanolytic activity in Sewage Sludges (SS) and “Alpeorujo” (ALP) showed maximum activity in the thermophilic stage. However, Amira et al. (2012), observed that xylanolytic and cellulolytic activity in Agrifood Waste increased at the end of the process.

3.4 Evolution of humification indicators during the composting process

During the maturation phase of a composting process, the stabilization and humification of the materials is carried out, obtaining a non-toxic and humified product, which is very useful from the agronomic point of view. On the contrary, the immaturity of a compost could cause serious phytotoxicity problems as well as the depletion of the cultivation soils. Therefore, determining the maturity degree of a compost through the appropriate indicators could be of great interest to control the quality of the final product (Jurado et al. 2015).

Traditionally, the quality of a compost has been determined through a group of physical-chemical parameters, such as temperature, CO₂, humic/fulvic acid ratio, NH₄-N/NO₃-N ratio, C/N ratio, pH, microbial biomass, enzymatic activity, germination of seeds and concentration of heavy metals (Castaldi et al. 2008). However, due to the great diversity of raw materials and the different composting protocols, it is necessary to establish more precise maturity indices (Martínez et al. 2016).

Taking into account that the degree of maturation is more relevant at the end of the composting process, the humification parameters were analyzed in this work only in the

final stage (PF) of the different processes. However, the analysis of the humification parameters in the raw materials at the beginning of the composting processes was also included, to compare the results between the initial and final phase (RM-FP) in terms of maturity. Based on the above, the main parameters analyzed to determine the evolution of the humified fractions during the selected composting processes are shown in Table 2. The initial and final values of elemental and organic carbon (EC and TOC) as well as the proportion of non-humified substances (C_{NH}), are shown in this table. However, the data related to the humic/fulvic ratio (C_{HA}/C_{FA}), as well as the humification rate (HR), were parameters of greater interest when determining the humification dynamic of the processes.

Table 2. Change produced in humification parameters throughout composting of different residues (USW: Urban Solid Waste, VW: Vegetable Waste, SS: Sewage Sludge, AW: Agroindustrial Waste and ALP: Alpeorujo). Nine repetitions have been taken into account in each sampling. Values of elemental carbon (EC), total organic carbon (TOC), non humic carbon (C_{NH}), humic/fulvic carbon ratio (C_{HA}/C_{FA}) and Humification Ratio (HR) followed by same letters are not significantly different ($p > 0.05$) by Fisher's LSD test (RM: Raw Material, FP: Final Product).

Organic Waste	Sampling	EC (%)	TOC (%)	C_{NH} (%)	C_{HA}/C_{FA}	HR
USW	RM	40.33 ^b	43.45 ^b	0.86 ^a	1.41 ^a	6.55 ^a
	FP	27.99 ^a	31.34 ^a	0.83 ^a	1.78 ^a	5.69 ^a
VW	RM	33.74 ^b	43.06 ^b	0.20 ^a	0.45 ^a	9.16 ^a
	FP	24.51 ^a	28.16 ^a	0.62 ^b	0.54 ^a	14.45 ^b
SS	RM	35.45 ^b	41.84 ^b	1.08 ^b	1.25 ^a	6.05 ^a
	FP	23.17 ^a	27.44 ^a	0.47 ^a	1.32 ^a	9.27 ^b
AW	RM	35.52 ^b	36.34 ^b	0.67 ^b	0.59 ^a	7.14 ^a
	FP	30.54 ^a	30.29 ^a	0.52 ^a	0.74 ^a	12.69 ^b
ALP	RM	36.06 ^b	43.51 ^a	0.73 ^a	1.40 ^a	6.48 ^{ab}
	FP	31.75 ^a	35.02 ^b	0.50 ^a	2.85 ^a	4.40 ^a

With respect to the different parameters related to humification, it should be noted that very different trends were observed in terms of raw materials (Table 2). As expected, elemental and organic carbon (EC and TOC) values decreased in all composting processes. In some cases (USW, VW and SS), the decrease meant a total carbon reduction of more than 30% over the initial value, while in others it did not exceed 14%. Many authors have proposed the loss of carbon as a parameter that can serve as an indirect indicator of the degree of maturity of the compost (Jurado et al. 2015).

In general terms, non-humified carbon (C_{NH}) values tended to decrease during all the composting processes analyzed, with the exception of the process elaborated from Vegetable Waste (Table 2). On the other hand, C_{HA}/C_{FA} ratio increased in the final phase, mainly and significantly in the case of the USW, AW and ALP processes. The positive trend of the values of the C_{HA}/C_{FA} relationship could be explained by the typical humification process that occurs during the maturation phase of a composting process (Iglesias-Jiménez et al. 2008). C_{HA}/C_{FA} ratio has been proposed as an important indicator of compost stability, being higher in mature compost (Azim et al. 2017). Compared to fulvic acids, humic acids are derived mainly from a more mature fraction of organic material. C_{HA} include compounds that increase the cation exchange capacity in soils (Mindari et al. 2014). They are related to soil fertility, crop yield and improve the C, N, P, K and S contents (Zhang et al. 2017). Meanwhile, C_{FA} are characterized by having a lower molecular weight, a high level of oxidation and a lower amount of C, N and P, but they also improve the capacity of cation exchange in soil. Therefore, the C_{HA}/C_{FA} ratio reflects the degree of polymerization in materials of humic nature. According to Iglesias-Jiménez et al. (2008), C_{HA}/C_{FA} values above 1 indicate that humification is occurring, while values of C_{HA}/C_{FA} above 1.6 indicate that the product is already mature. Our data revealed that the best degree of humification was obtained in the case of the processes elaborated from ALP.

In addition to the C_{HA}/C_{FA} ratio, humification rate (HR) was calculated. During composting, thanks to a combination of chemical and biological transformations, the total organic carbon content decreases, while the relative content of humic compounds increases. According to several authors, it has been demonstrated that the humification rate (HR) is an effective indicator of the formation of humic substances during the composting process, being able to establish with precision the moment of the complete stabilization (Tittarelli et al. 2002). Based on the results shown in Table 2, the humification rate (HR) was increased in the case of the processes elaborated from VW, SS and AW. In the case of the processes elaborated from “Alpeorujo” (ALP), contrary to what was observed in the case of the C_{HA}/C_{FA} ratio, a decrease in the humification rate was detected. This could be due to the fact that the HR values depend on the total organic carbon content of the samples and, probably, there could have been an entry of fresh material towards the end of the process, which stopped the mineralization process.

Results described for all the composting processes analyzed, agree that during the degradation of different materials, the amount of non-humified compounds (C_{NH}) extracted in alkaline conditions was significantly reduced over time, except in the case of the processes elaborated from vegetable remains (Table 2). During the composting

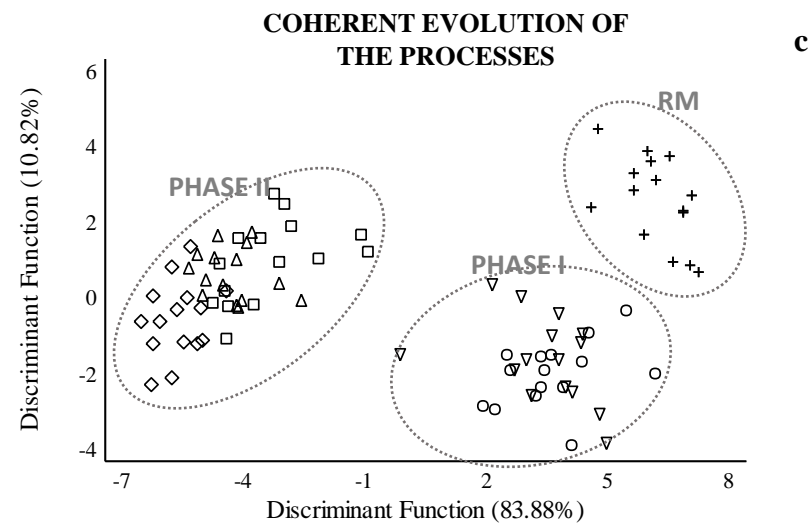
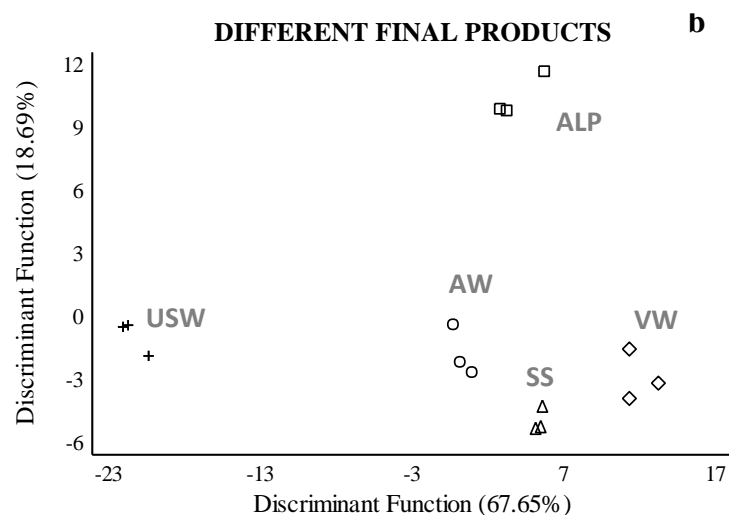
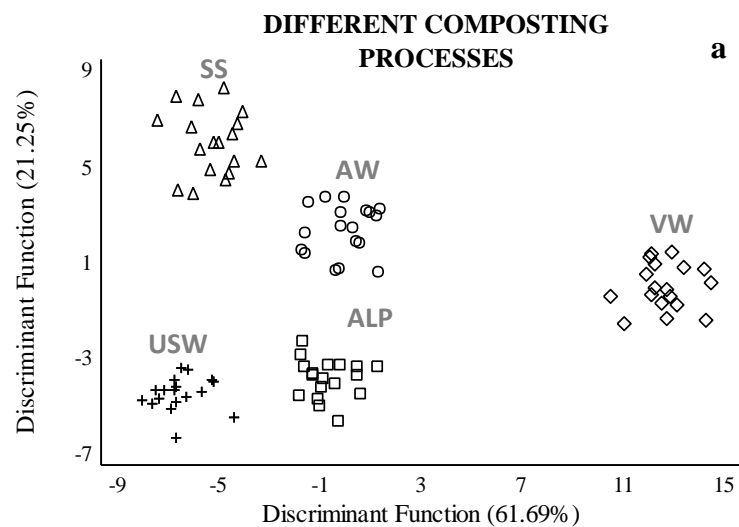
process, the release of compounds that are incorporated into the humification routes takes place through numerous reactions of reorganization and molecular condensation (Albuquerque et al. 2009). This fact leads to the formation of more humified compounds. In this sense, it is known that lignin plays an essential role in the processes of humification of lignocellulosic residues, since the partial degradation of this complex molecule can give rise to the basic structure of humic substances, as well as to the liberation of aromatic and phenolic by-products (Albuquerque et al. 2009; Jurado et al. 2015). All these phenomena contribute to increase the content of humified substances during the maturation phase of the composting process. However, the type of humified substances (humic or fulvic acid) and the generation speed of them can vary greatly depending on the starting materials.

3.5 Establishment of the differential profiles based on the diverse raw materials: Discriminant analysis and Pearson correlation.

On the basis of the results described and above discussed, it is almost evident that different physical-chemical and enzymatic scenarios can be found depending on the composted materials or even on each process analyzed. Numerous recent scientific studies highlight the important relationship between the enzymatic activities involved in the biodegradation processes of the lignocellulosic fractions and the evolution of the humification markers during the composting process (Awasthi et al. 2018; Song et al. 2018; Gao et al. 2019). However, the verification of the actual influence of the raw material as a starting point to obtain compost in different pathways was one of the most important challenges addressed in this work.

Figure 3 shows the discriminant analysis that help to understand how distinctive or similar the composting processes are depending on the starting materials (Fig. 3a), the final products obtained (Fig. 3b) and the thermal phases of the processes (Fig. 3c).

Fig. 3. Discriminant analysis based on composting of different raw materials, taking into account the complete processes (a), the final products (b) and the distribution of principal thermal phases (RM=Raw Material; Phase I=MES+THER; Phase II: COOL+MAT+FP) (c). Range (minimum and maximum values) corresponding to moisture, organic matter and C/N ratio for each type of residues are shown compared with those included in the Spanish regulation as the main parameters of compost quality (d)..



d

	FINAL PRODUCT	Minimun	Maximun
USW	Moisture (%)	11.08	11.62
	Organic Matter (%)	53.38	54.69
	C/N Ratio	11.57	12.14
VW	Moisture (%)	40.21	42.07
	Organic Matter (%)	47.43	50.27
	C/N Ratio	11.52	12.08
SS	Moisture (%)	30.23	31.26
	Organic Matter (%)	46.49	47.92
	C/N Ratio	8.89	8.95
AW	Moisture (%)	30.10	30.15
	Organic Matter (%)	50.41	53.27
	C/N Ratio	11.19	12.58
ALP	Moisture (%)	39.41	41.91
	Organic Matter (%)	57.67	62.1
	C/N Ratio	15.32	16.24
BOE 999/2017	Moisture (%)	-	< 40
	Organic Matter (%)	> 35-45	-
	C/N Ratio	-	< 15-20

The discriminant analysis shown in Figure 3a revealed two discriminant functions responsible for more than 80% of the variability observed among the data. In view of what is observed in Figure 3a, it is clear that data related to the lignocellulosic fractions, enzymatic activities and humification process are grouped separately on the basis of the raw materials. In this Figure, the set of data corresponding to the compost elaborated from Vegetable Waste (VW) stands out as being the most distant group in relation to the rest (Fig. 3a). When the same analysis was exclusively performed bearing in mind the data set corresponding to the final products (FP), two discriminant functions influenced the variability of the data by more than 85% (Fig. 3b). Figure 3b supports the diversity of compost due to different raw materials, since 5 significantly different groups were established based on that criterium. While products (compost) made from AW, SS and VW were more similar in terms of biological activity as well as content in lignocellulosic and humic fractions, compost from ALP and USW were very different from the rest and from each other (Fig. 3b). Despite the remarkable differences detected among compost made from different organic waste, all the analysed samples complied with the basic monitoring parameters (Moisture, Organic Matter and C/N Ratio) indicated at the legislative level (BOE A-2017-14332). In this sense, humidity data relative to the compost samples ranged approximately between 30-40%, excepting the final products made from USW, where a very low humidity was detected at the end of the process (Fig. 3d). The organic matter content was greater than 35-45% in all the final products analysed but this parameter was significantly higher in the case of samples from ALP. Both circumstances could be involved in the differences observed in the compost ALP and USW with respect to the rest of products from different origins (Fig. 3b).

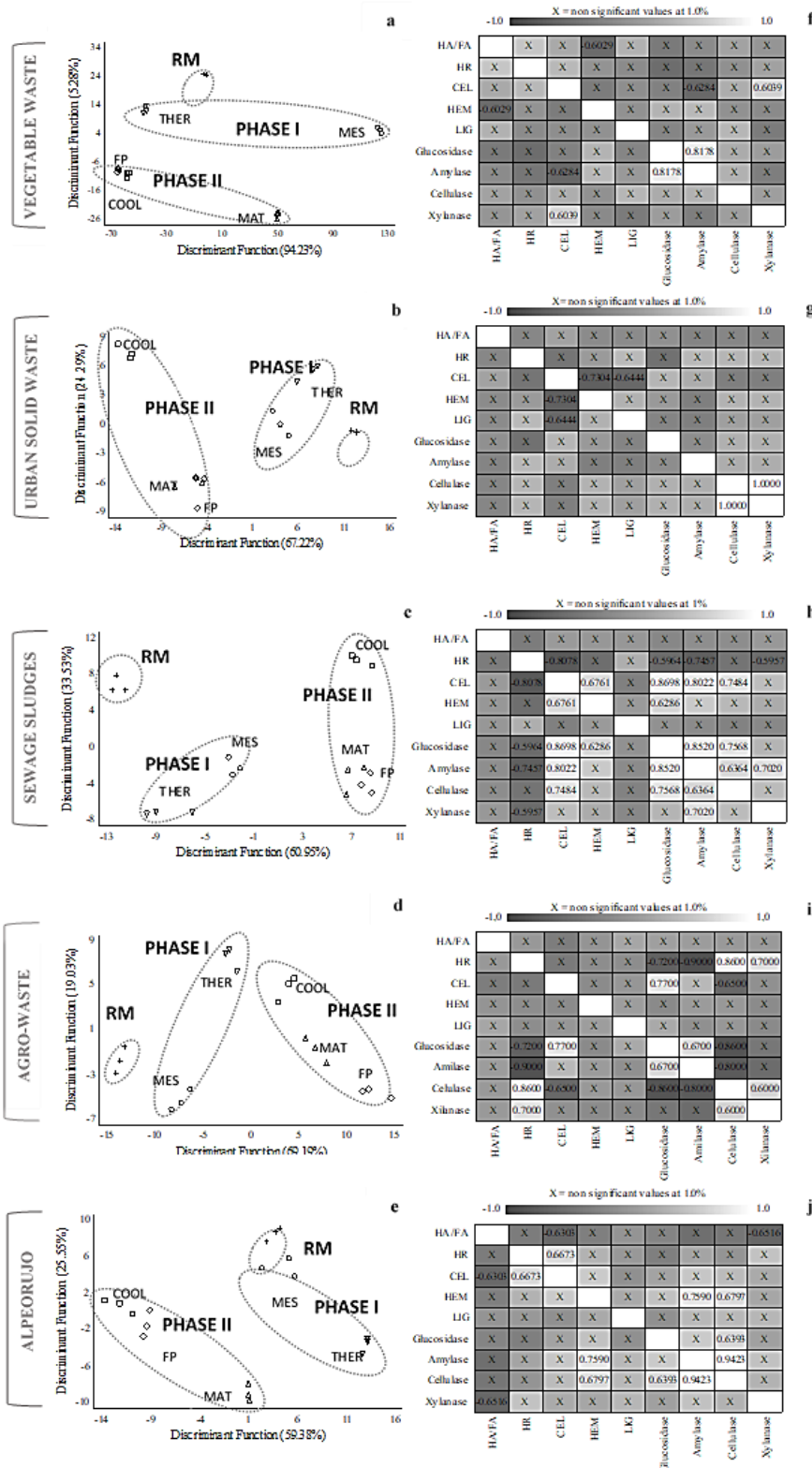
On the other hand, in order to establish the global differences or similarities between the different phases of the 15 composting processes analysed, Figure 3c shows the existence of two functions that explained more than 94% of the variability of the data. Thus, surprisingly, the results were grouped into 3 data sets, one of them corresponding to the initial phase of the processes (RM = Raw Materials), a second group formed by the data related to the biooxidative phase (Phase I = MES + THER) and a third group including the data corresponding to the stabilization and humification phase (Phase II = COOL + MAT + FP). Therefore, notwithstanding the heterogeneity of the data in relation to the starting materials and working conditions of each company, the data are suitably grouped from an evolutionary point of view, establishing continuity and logical limits between the three main stages of the process: Initial phase (RM), Biooxidative phase (Phase I) and Maturation phase (Phase II). The above statement may be irrelevant when working with small-scale or semi-heavy composting. However, the control of the different thermal phases of the process is crucial when working on

composting on an industrial scale, since the accidental (or voluntary) mixing of raw materials with others that are already biotransformed or that are in an intermediate phase of transformation could happen.

In order to analyse the composting profiles from each kind of material, five discriminant and Pearson correlation analyses were performed for each process independently scrutinized (Fig 4). Figures 4 a-e showed the profiles observed for each group of material, depending on the succession of thermal phases. In all cases, discriminant function explained near or even more than 90% of the variability of the results. Each profile was apparently different from the rest, which supported that each process is exclusive. Data were located in three main groups: RM, Phase I (MES + THER) and Phase II (COOL + MAT + FP). In general, bioxidative (Phase I) and stabilization-humification phases (Phase II) appeared well separated in all the cases (Fig. 4 a-e). However, only in the composting process performed from AW (Agrifood Waste), a logical succession among COOL, MAT and FP was observed (Fig. 4d). On the contrary, during the processes performed from USW and SS, the MAT and FP stages appeared very closed between them (Fig. 4b-c), while COOL stage appeared very near of FP in the case of composting processes made from VW and ALP (Fig. 4a, e).

To establish significant links between the parameters analysed in this study (lignocellulosic-humic fractions and enzymatic profiles), Pearson correlation maps were made for each type of material (Fig. 4f-j). Many surprising relationships were detected, but different in each case. In the case of the VW and USW composting processes, there were no significant correlations between the humification parameters and the rest of the variables (Fig. 4g). However, only in the case of compost samples from plant remains was a close negative relationship detected between the hemicellulose content and the C_{HA}/C_{FA} ratio (Fig. 4f). Something similar happened in the case of the samples from ALP, although in this case the C_{HA}/C_{FA} ratio was negatively correlated with the cellulose fraction and the xylanase activity (Fig. 4j). On the contrary, the Pearson correlation profiles were very different in the case of samples made from SS and AW, since the humification rate (HR) significantly correlated with the different enzymatic activities concerning the biodegradation of the lignocelulosic fractions (Fig. 4h, i). Pearson correlation map between lignocellulosic and enzymatic parameters was remarkable in the case of samples made from SS, since positive links were detected among the group integrated by β -glucosidase-amylase-cellulase activities (Fig. 4h). A more discrete correlation was established in the case of samples made from AW and ALP (Fig. 4i, j).

Fig. 4. Comparative analysis of the different composting processes according to the starting materials (USW: Urban Solid Waste; VW: Vegetable Waste; SS: Sewage Sludges; AW: Agrifood Waste, ALP: Alpeorujo). Discriminant analysis according to the distribution of the main thermal phases (a-e) and Pearson tables showing positive (light grey) or negative (dark grey) correlations between the different analyzed parameters (f-j). HA/FA: CHA/CFA; HR: Humification Rate; CEL: Cellulose; HEM: Hemicellulose; LIG: Lignin; β -glucosidase, Amylase, Cellulase and Xylanase.



In view of the results shown in the correlation maps (Fig. 4f-j), it is obvious that the USW-based composting processes did not develop orthodoxly, since during a biotransformation process of this nature, it is expected that some type of relationship will be established between the degradation of the lignocellulosic fractions, the degree of humification and the enzymatic activity (Fig. 4f). This connection did not occur in this case.

Some of the enzymatic activities showed homogeneous and independent profiles of the type of raw material (section 3.2.). Such is the case of β -glucosidase and amylase activities, which established close links with each other and with other related enzymatic parameters. Surprisingly, the correlations did not always occur in the same direction. In the case of plants dedicated to Sewage Sludges composting (Fig. 4h), Pearson P values were positive and very close to 1 in the β -glucosidase-amylase-cellulase-xylanase block. This correlation did not happen in the case of plants dedicated to AW composting, where very strong and negative correlations were established between cellulase activity and the β -glucosidase-amylase pair (Fig. 4i). A totally opposite effect to the previous one was observed in the case of the ALP samples (Fig. 4j).

Although the relationships established between many of the analysed parameters were variable depending on the raw materials, there is no doubt that some of the enzymatic activities, such as β -glucosidase and amylase, showed similar trends during the composting process (section 3.3). This fact makes them very useful bioindicators to evaluate the correct or incorrect evolution of the composting processes independently of the starting materials. Something similar happened in the case of the humification rate (HR) since, although in general it showed a logical tendency to increase toward the end of the process (Table 2), the Pearson values observed were highly variable because of the type of materials. In the case of the SS samples (Fig. 4h), HR showed a negative correlation with the β -glucosidase-amylase-xylanase package, whereas in the case of AW plants, the HR correlated negatively with the β -glucosidase-amylase pair, but in a positive way with the cellulase-xylanase block. Despite the different established links, the control of the evolution of the humification rate (HR), in combination with other enzymatic parameters, could be useful to determine the correct or incorrect evolution of the composting processes.

To establish the most suitable recipe for composting, some authors have tried to select the most appropriate waste mixtures and the best indicators to control the start-up of the process (Ghinea et al. 2019). In this sense, some of the most interesting physical-chemical parameters used for this purpose are pH, electrical conductivity, humidity, ash, content of N and C, C/N ratio, total organic carbon or the presence of heavy metals. Other authors have tried to establish the biodegradable character of the

starting materials in order to optimize the biotransformation process as much as possible (Gutiérrez et al. 2017). However, the results described here have revealed the exclusive nature of composting processes on an industrial scale. This exclusivity is fundamentally based on the different raw materials and operating conditions. Therefore, similar products could have been obtained thanks to different enzymatic and humification profiles. In spite of this, in all cases, the tendencies of some enzymatic indicators such as β -glucosidase and amylase were very homogeneous.

4 Conclusions

Although different compost could be similar in relation to their agronomic quality, the enzymatic strategies and the humification pathways could be very different in each process. The results derived from this work admit that each composting process is unique and runs independently, even showing similar trends.

Parameters such as β -glucosidase, amylase, lignin/holocellulose ratio or the humification degree could act as important indicators of the process. This fact confirms the efficiency and versatility of microbial enzymes and their role as transforming agents of organic matter, even when the heterogeneity of materials and operating conditions on industrial scale are very diverse.

Taking into account the initial considerations regarding the singularity of each composting process, it seems evident that there are not two equal composting processes. This can be directly related to the starting materials, the physical-chemical and enzymatic profiles that in each process are outlined. This fact can be considered, therefore, as the main impact derived from this work. There is no recipe or a fixed protocol for the practice of composting, but different starting situations must be control from the beginning.

Although different composting processes follow different paths, it is possible to reach to final products that comply with the legally established quality criteria. So, in this work, final products that complied with the legal recommendations (minimum content in organic matter, humidity and C/N ratio) obtained.

On the other hand, we must highlight the role of certain enzymatic activities, such as β -glucosidase and amylase, as well as the ratio lignin/holocellulose, as bioindicators to monitor the composting process. The profiles observed in this sense followed a characteristic and independent pattern of the starting materials.

5 Acknowledgements

This work has been funded by the Ministry of Economy and Competitiveness through project AGL2015-64512R.

6 References

Agnew, J.M., Leonard, J.J., 2003. The Physical Properties of Compost. *Compost Sci. Util.* 11, 238-264. <https://doi.org/10.1080/1065657X.2003.10702132>.

Alburquerque, J.A., González, J., Tortosa, G., Baddi, G.A., Cegarra, J., 2009. Evaluation of “alperujo” composting based on organic matter degradation, humification and compost quality. *Biodegradation.* 20 (2), 257-270. <https://doi.org/10.1007/s10532-008-9218-y>.

Ameen, A., Ahmad, J., Raza, S., 2016. Effect of pH and moisture content on composting of Municipal solid waste. *Int. J. Sci. Res. Publ.* 6(5), 35-37. <https://doi.org/10.1051/e3sconf/20183402019>

Amira, D., Roshanida, A.R., Rosli, M.I., 2012. Effects of xylanase and cellulase production during composting of EFB and POME using fungi. *Int. J. Biol. Biomol. Agric. Food Biotechnol. Engr.* 6, 340-343. <https://doi.org/10.5281/zenodo.1332930>

Azim, K., Soudi, B., Boukhari, S., Perissol, C., Roussos, S., Thami Alam, I., 2017. Composting parameters and compost quality: a literature review. *Org. Agr.* 8 (2), 141-158. <https://doi.org/10.1007/s13165-017-0180-z>.

Awasthi, M.K., Wang, Q., Chen, H., Awasthi, S.K., Wang, M., Ren, X., Zhao, J., Zhang, Z., 2018. Beneficial effect of mixture of additives amendment on enzymatic activities, organic matter degradation and humification during biosolids co-composting. *Bioresour. Technol.* 247, 138-146. <http://doi:10.1016/j.biortech.2017.09.061>

BOE-A-2017-14332, 2017. Real Decreto 999/2017: Spanish Regulation on fertilizers products.

Castaldi, P., Garau, G., Melis, P., 2008. Maturity assessment of compost from municipal solid waste through the study of enzyme activities and water-soluble fractions. *Waste Manag.* 28, 534-540. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2007.02.002>.

Cavani, L., Ciavatta, C., Gessa, C., 2003. Identification of organic matter from peat, leonardite and lignite fertilisers using humification parameters and electrofocusing. *Bioresour. Technol.* 86, 45-52. [https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(02\)00107-4](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(02)00107-4).

EPA, 2003. Environmental regulations and technology. Control of pathogens and vector attraction in Sewage Sludge. Environmental Protection Agency (USA). EPA625-R-92-013.

EU Waste Law, 2018. Directive (EU) 2018/851 of the European Parliament and of the Council, of 30 May 2018, amending Directive 2008/98 on waste.

Gao, X., Tan, W., Zhao, Y., Wu, J., Sun, Q., Qi, H., Xie, X., Wei, Z., 2019. Diversity in the mechanisms of humin formation during composting with different materials. *Environ. Sci. Technol.* 53(7), 3653-3662. <http://doi:10.1021/acs.est.8b06401>

Ghinea, C., Apostol, L. C., Prisacaru, A. E., Leahu, A., 2019. Development of a model for food waste composting. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 26 (4), 4056-4069. <https://doi.org/10.1007/s11356-018-3939-1>.

Guo R., Li G., Jiang T., Schuchardt F., Chen T., Zhao Y., Shen Y., 2012. Effect of aeration rate, C/N ratio and moisture content on the stability and maturity of compost. *Bioresour. Technol.* 112, 171-178. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.02.099>.

Gutiérrez, M.C., Siles, J.A., Diz, J., Chica, A.F., Martín, M.A., 2017. Modelling of composting process of different organic waste at pilot scale: Biodegradability and odor emissions. *Waste Manag.* 59, 48-58. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2016.09.045>.

He, L., Brickerstaff, G.F., Paterson, A., Buswell, J.A., 1993. Purification and partial characterization of two xylanases that differ in hydrolysis of soluble and insoluble xylan fractions. *Enzym. Microb. Technol.* 15, 13-18. [https://doi.org/10.1016/0141-0229\(93\)90110-N](https://doi.org/10.1016/0141-0229(93)90110-N).

Hofman, J., Dusek, L., 2003. Biochemical analysis of soil organic matter and microbial biomass composition - a pilot study. *Eur. J. Soil Biol.* 39, 217-224. <https://doi.org/10.1016/j.ejsobi.2003.08.002>.

Iglesias-Jiménez, E., Barral, M.T., Marhuenda, F.C., 2008. Indicadores de la estabilidad y madurez del compost, in: Moreno, J., Moral, R. (Eds.), *Compostaje*. Mundi-Prensa, Madrid, Spain, pp. 243-283.

Insam, H., de Bertoldi, M., 2007. Microbiology of the composting process, in: Diaz, L.F., de Bertoldi, M., Bidlingmaier, W., Stentiford, E. (Eds.), *Compost Science and Technology*. Elsevier, Amsterdam, The Netherlands, pp.26-48.

Jurado, M.M., Suárez-Estrella, F., Vargas-García, M.C., López, M.J., López-González, J.A., Moreno, J., 2014. Evolution of enzymatic activities and carbon fractions throughout composting of plant waste. *J. Environ. Manag.* 133, 355-364. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2013.12.020>.

Jurado, M.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. *Bioresour. Technol.* 186, 15-24. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.03.059>.

Kerins, G., Blackburn, J., Nixon, T., Daly, M., Conyers, C., Pietravalle, S., Noble, R., Henry, C.M., 2017. Composting to sanitize plant-based waste infected with organisms of plant health importance. *Plant Pathol.* 67 (2), 411-417. <https://doi.org/10.1111/ppa.12729>.

Komilis, D. P., Ham, R. K., 2003. The effect of lignin and sugars to the aerobic decomposition of solid wastes. *Waste Manag.* 23 (5), 419-423. [https://doi.org/10.1016/S0956-053X\(03\)00062-X](https://doi.org/10.1016/S0956-053X(03)00062-X).

Libmond, S., Savoie, J., 1993. Degradation of wheat straw by a microbial community stimulation by a polysaccharidase complex. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 40, 567-574. <https://doi.org/10.1007/BF00175749>.

Liu D., Zhang R., Yang X., Wu H., Xu D., Tang Z., Shen Q., 2011. Thermostable cellulase production of *Aspergillus fumigatus* Z5 under solid-state fermentation and its application in degradation of agricultural wastes. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 65 (5), 717-725. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2011.04.005>.

López-González, J.A., Vargas-García, M.C., López, M.J., Suárez-Estrella, F., Jurado, M.M., Moreno, J., 2015. Biodiversity and succession of mycobiota associated to agricultural lignocellulosic waste-based composting *Bioresour. Technol.* 187, 305-313. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.03.124>.

Malherbe, S., Cloete, T. E., 2002. Lignocellulose biodegradation: fundamentals and applications. *Reviews. Environ. Sci. Biotechnol.* 1(2), 105-114. <https://doi.org/10.1023/A:102085891>.

Martínez, M., Ortega, R., Janssens, M., Angulo, J., Fincheira, P., 2016. Selection of maturity indices for compost derived from grape pomace. *J. Soil Sci. Plant Nutr.* 16 (2), 262-267. <http://dx.doi.org/10.4067/S0718-95162016005000021>.

Mindari, W., Aini, N., Kusuma, Z., Syekhfani, S., 2014. Effects of humic acid-based cation buffer on chemical characteristics of saline soils and maize growth. *J. Degrade. Min. Land Manag.* 2 (1), 259-268. <https://doi.org/10.15243/jdmlm.2014.021.259>.

Mishra, P.C., Mohanty, R.K., Dash, M.C., 1979. Enzyme activity in subtropical Surface soils under pasture. *Indian J. Agr. Chem.* 12, 19-24.

Mondini, C., Fornasier, F., Sinicco, T., 2004. Enzymatic activity as a parameter for the characterization of the composting process. *Soil Biol. Biochem.* 36, 1587-1594. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2004.07.008>.

Ros, M., Garcia, C., Hernández, T., 2006. A full-scale study of treatment of pig slurry by composting: kinetic changes in chemical and microbial properties. *Waste Manag.* 26, 1108-1118. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2005.08.008>.

Silva, M.E.F., Lemos, L.T., Bastos, M.M.S.M., Nunes, O.C., Cunha-Queda, A.C., 2013. Recovery of humic-like substances from low quality composts. *Bioresour. Technol.* 128, 624-632. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.11.013>.

Song, C., Zhang, Y., Xia, X., Qi, H., Li, M., Pan, H., Xi, B., 2018. Effect of inoculation with a microbial consortium that degrades organic acids on the composting efficiency of food waste. *Microbial Biotechnol.* 11(6), 1124-1136. <http://doi:10.1111/1751-7915.13294>

Stentiford, E.I., 1996. *Composting Control: Principles and Practice. The Science of Composting.* Springer, Dordrecht, pp. 49-59.

Tabatabai, M.A., 1982. Soil enzymes, in: Page, A.L., Miller, R.H., Keeney, D.R. (Eds.), *Methods of Soil Analyses, Part 2, Agronomy, second ed., vol. 9.* Am. Soc. Agron, Madison, Wis, pp. 903-947.

Tittarelli, F., Trinchera, A., Intrigliolo, F., Benedetti, A., 2002. Evaluation of organic matter stability during the composting process of agroindustrial wastes, in: *Microbiology of composting.* Springer, Berlin, Heidelberg, pp. 397-406.

Tuomela M., Vikman M., Hatakka A., Itävaara M., 2000. Biodegradation of lignin in a compost environment: A review. *Bioresour. Technol.* 72(2), 169-183. [https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(99\)00104-2](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(99)00104-2)

USCC, 2001. *Test methods for the examination of composting and compost.* Second edition. U.S. Composting Council, Bethesda, MD.

Vance, E.D., Brookes, P.C., Jenkinson, D.S., 1987. An extraction method for measuring soil microbial biomass C. *Soil Biol. Biochem.* 19, 703-707. [https://doi.org/10.1016/0038-0717\(87\)90052-6](https://doi.org/10.1016/0038-0717(87)90052-6).

Villar, I., Alves, D., Garrido, J., Mato, S., 2016. Evolution of microbial dynamics during the maturation phase of the composting of different types of waste. *Waste Manag.* 54, 83-92. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2016.05.011>

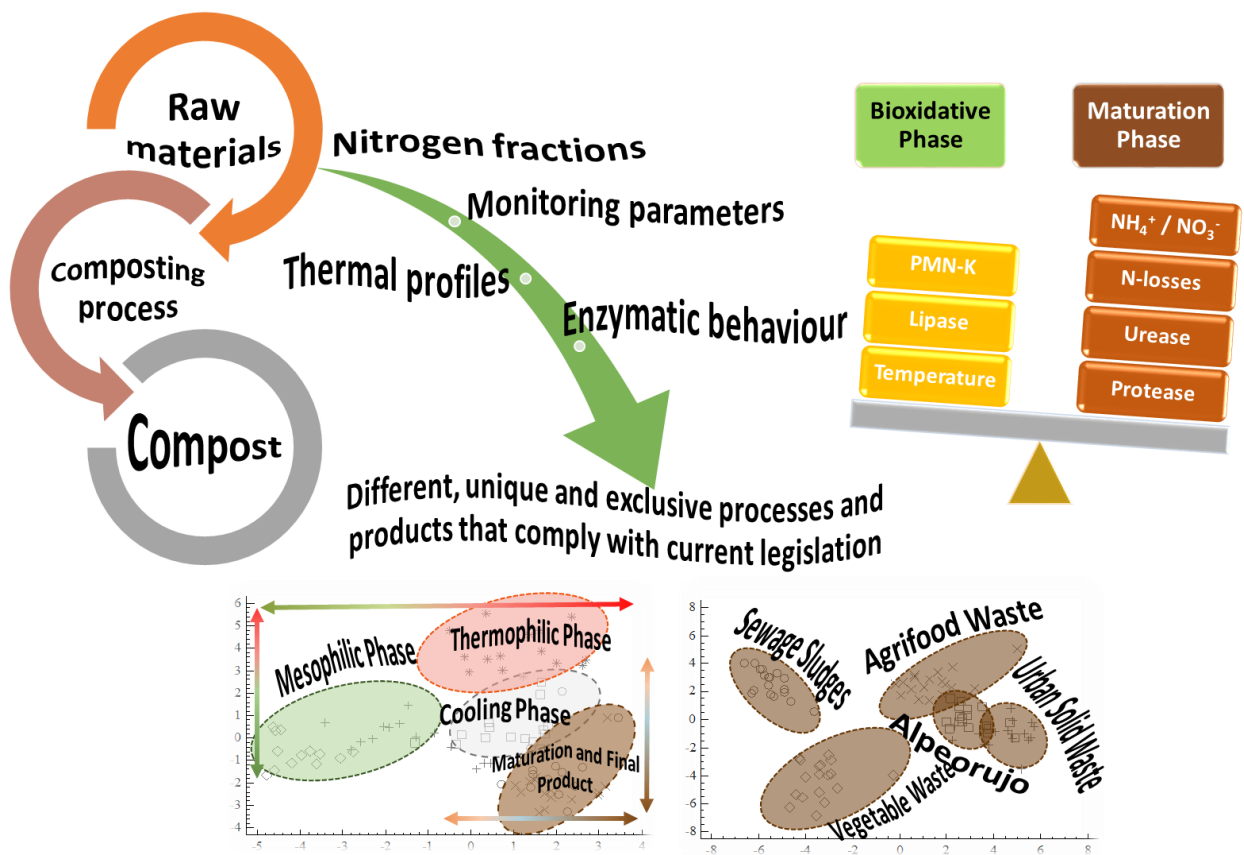
Wang, H.Y., Fan, B.Q., Hu, Q.X., Yin, Z.W., 2011. Effect of inoculation with *Penicillium expansum* on the microbial community and maturity compost. *Bioresour. Technol.* 102, 11189-11193. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.07.044>.

Wei, Y., WU, D., Wie, D., Zhao, Y., Wu, J., Xie, X., Zhang, R., Wei, Z., 2019. Improved lignocellulose-degrading performance during Straw composting from diverse sources with actinomycetes inoculation by regulation the key enzyme activities. *Bioresour. Technol.* 271, 66-74. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.09.081>.

Zang, X., Liu, M., Fan, Y., Xu, J., Xu, X., Li, H., 2018. The structural and functional contributions of β -glucosidase-producing microbial communities to cellulose degradation in composting. *Biotechnol. Biofuels.* 11, 51-64. <https://doi.org/10.1186/s13068-018-1045-8>.

Zhang, J., Wang, J., An, T., Wei, D., Chi, F., Zhou, B., 2017. Effects of long-term fertilization on soil humic acid composition and structure in black Soil. *PLoS One*, 12 (11), e0186918. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0186918>.

GRAPHICAL ABSTRACT



ARTÍCULO 2

ARTÍCULO II

Evaluating the influence of raw materials on the behavior of nitrogen fractions in composting processes on an industrial scale.

Estrella-González, M. J., López-González, J. A., Suárez-Estrella, F., López, M. J., Jurado, M. M., Siles-Castellano, A. B., Moreno, J.

Publicado en Bioresource Technology (2020), 303, 122945.

Resumen: El nitrógeno es uno de los nutrientes más importantes en el control de la producción primaria neta en los ecosistemas. En este sentido, sería lógico pensar que las poblaciones relativas de microorganismos autótrofos y heterótrofos dentro de una pila de compostaje dependen en gran medida de la relación C/N disponible para la comunidad microbiana. El éxito del compostaje como tecnología ecológica para la gestión de residuos orgánicos ha permitido su implementación en los modelos actuales de economía circular. Sin embargo, el compostaje a escala industrial a menudo muestra inconvenientes y peculiaridades. De este modo, dado que la transformación de las fracciones de nitrógeno durante el compostaje es muy compleja y el manejo inadecuado del proceso podría ir acompañado de pérdidas significativas de nitrógeno, este trabajo se ha centrado en el estudio de un grupo de parámetros fisicoquímicos y enzimáticos estrechamente relacionados con la transformación de las fracciones de nitrógeno durante el compostaje a escala industrial. En este trabajo, se realizó un análisis comparativo de 15 instalaciones de compostaje industrial en las que se procesaron diferentes residuos orgánicos antropogénicos. Los resultados mostraron que el proceso de compostaje a escala industrial no siempre evoluciona de manera estándar. Los parámetros de monitoreo, así como la actividad enzimática, dependieron en gran medida de las materias primas y estuvieron fuertemente vinculados a la transformación de las fracciones de nitrógeno. Los resultados pusieron de manifiesto el hecho de que la heterogeneidad y diversidad de las materias primas puede afectar a la evolución del proceso y a la calidad de los productos obtenidos. A pesar de ello, en todos los casos, la actividad microbiana logró llevar a cabo un proceso de biotransformación óptima, obteniéndose productos que cumplen con los estándares de calidad agronómica.

Evaluating the influence of raw materials on the behavior of nitrogen fractions in composting processes on an industrial scale.

Estrella-González, M.J., López-González, J.A., Suárez-Estrella, F.* , López, M.J., Jurado, M.M., Siles-Castellano, A.B. and Moreno, J.

Department of Biology and Geology, CITE II-B, University of Almería, Agrifood Campus of International Excellence, ceiA3, 04120, Almería (Spain). fsuarez@ual.es

*Corresponding author: Phone: +34 950015891; Fax: +34950015476; e-mail: fsuarez@ual.es (F. Suárez-Estrella)

Abstract

Success of composting as an ecological technology for organic waste management has allowed its implementation in the current circular economy models. However, composting on an industrial scale often shows drawbacks and peculiarities. In this work, a comparative analysis of 15 industrial composting facilities was carried out in which different anthropogenic organic waste were processed. Results showed that composting process on an industrial scale did not always evolve in a standard way. Monitoring parameters as well as enzymatic activity depended largely on the raw materials and were strongly linked to the transformation of nitrogen fractions. Despite the heterogeneity of the processes and raw materials, microbial activity managed to the optimal biotransformation, obtaining products that comply with the agronomic quality standards. This work represents a breakthrough in composting and provides new knowledge for better management of this process on an industrial scale.

Keywords: agrifood waste; “alpeorujo”; sewage sludge; industrial composting; nitrogen biotransformation

Highlights

Composting on an industrial scale hinders the standardization of the processes

Evolution of protease and urease activities depended largely on the raw materials

PMN-K and lipase activities were linked to the transformation of nitrogen fractions

Raw materials determined the enzymatic pattern evolution of composting processes

Different materials evolve into biotransformed products that meet quality standards

1. Introduction

Due to a great diversity of activities of anthropogenic origin, large quantities of organic waste are generated and accumulated today. This excessive production requires a proper management. In some cases, their elimination has been carried out through incineration, which is a serious economic and environmental problem (Wei et al., 2019). To address these and other environmental sustainability problems, the concept of circular economy, although not entirely new, has recently gained importance. This is evident in the comprehensive European circular economy package of December 2015 (Geissdoerfer et al., 2017; Malinauskaite et al., 2017), since in regards to the management of organic waste, composting stands out as the alternative closer to the previous economic model. However, one of the main problems arising from the composting of anthropogenic organic waste on an industrial scale is the heterogeneity of the starting materials, as well as the inadequacy of the starting conditions, or the inappropriate practices related to the mixing of fresh materials. Therefore, although composting is positioned as one of the most important tools for the future of biological waste management (EU Waste Law, 2018), the application of unstable and immature compost could release toxic substances, immobilize nitrogen in the soil and restrict the growth of plants that compete for oxygen in the rhizosphere (Guo et al., 2012).

Taking into account the above, monitoring the composting process is essential to obtain high quality products. So, the surveillance of the industrial processes is generally based on the study of parameters that allow to control the proper evolution of the process, while biological stability and maturity are generally evaluated in the final product (Cesaro et al., 2019).

Traditionally, some compost parameters have been considered to successfully evaluate the maturity and stability of the compost such as temperature, odor, color, C/N ratio or cation exchange capacity (Barrena et al., 2008; Iglesias-Jiménez et al., 2008). Nowadays, other parameters correlated with microbial biodiversity during composting are being taken into account (Mondini et al., 2004; Ayed et al., 2007; Vargas-Garcia et al., 2010).

Nitrogen is one of the most important nutrients that control net primary production in ecosystems (Jones et al., 2004). In this sense, it would be logical to think that the relative populations of autotrophic and heterotrophic microorganisms inside a composting pile depend largely on the C/N ratio available to the microbial community (Sepehri and Sarrafzadeh, 2018). Thereby, since the transformation of the nitrogen fractions during composting is very complex and the improper management of the process could be accompanied by significant losses of nitrogen (Bao et al., 2008; Zhu et al., 2019), this work has focused on the study of a group of physicochemical and

enzymatic parameters closely related to the transformation of the nitrogen fractions during composting on an industrial scale, and how the heterogeneity and diversity of raw materials could affect the standard evolution of them and the quality of the products obtained. Thus, the following objectives are established: (i) observe the evolution of the composting processes of organic remains of anthropogenic origin, based on indicators of maturity and stability related to the dynamics of the nitrogenous fractions (ii); establish the relevance of the enzymatic activity of microbial origin within composting piles in relation to the biotransformation of the different nitrogenous fractions and (iii) determine the possible differences or similarities between very different industrial composting processes, clarifying the possible correlation between physical-chemical and biological parameters related to the transformation of nitrogen fractions.

2. Material and Methods

2.1. Sampling strategy

Samples were taken from 15 companies dedicated to the industrial stabilization of organic matter from different raw materials and operating procedures. Three companies dedicated to the composting of each of the following anthropogenic wastes were selected: Vegetable Waste (VW), Urban Solid Waste (USW), Sewage Sludges (SS), Agrifood Waste (AW) and olive mill waste named “Alpeorujo” (ALP). All of them were located at the Southeast of Spain (Almeria, Granada, Murcia, and Jaen). Table 1 details the operating conditions and the composition of the mixtures used in each installation.

Samples were collected in each facility at significant composting phases as follows: mixture used for composting (Raw Materials, RM); material before reaching thermophile temperatures (Mesophilic phase, MES); material at thermophile temperatures (>50 °C) (Thermophilic phase, THER); material after the thermophilic phase, when the temperature decreases to environmental values (Cooling phase, COOL); material at the middle of Maturation phase (MAT); and Final Product (FP). Due to the seasonality of the raw material, a total amount of 90 samples were collected from November 2016 to November 2017. The entire sampling process took place on the same day, in those facilities where work was carried out continuously, i.e., plant waste (VR), sewage sludge (SS) and municipal solid waste (MSW). However, in those facilities where agrifood waste (AW) and alpeorujo (OMW) were processed, work was done discontinuously due to the seasonality of the raw materials. In this last case, the sampling was performed when each specific composting process reached the corresponding thermal phase.

Composting piles had variable dimensions depending on composting method. Most of them were about 3 m high, 7-15 m length and 4-5 m width. To collect representative samples in each thermal phase of the processes, 300 g of each material were taken from nine different locations, covering various depths and surfaces of the composting piles. Three samples were taken superficially (0.5 m), other three were taken at a depth of 1.5 m and the last three as close as possible to the bottom of the piles. They were mixed in equal amounts, to obtain a homogeneous and representative sample (approximately 3 kg) and, subsequently, they were divided into three parts to work on three analytical repetitions. In the case of USW samples, all inadequate materials (plastic, glass, metal, etc.) were removed manually, only the biodegradable fraction (organic matter) was analysed. After sampling, materials were crushed in Moulinex Cousine Companion HF800A13 (Moulinex, Barcelona, Spain) before analysis. The samples were immediately stored in vacuum bags and frozen at -20 °C. These were thawed at room temperature for 24 h before analysis. The parameters studied were: Moisture (M), pH, Electrical Conductivity (EC), Organic Matter (OM), ashes (A), C/N ratio, N-NH₄⁺, N-NO₃⁻, Total Proteins (TP), Loss of Nitrogen (N-Losses), Relationship N-NH₄⁺/N-NO₃⁻ (Nitrification Index, NI), Proteolytic Activity (PRO), Urease Activity (URE), Alkaline Phosphomonoesterase Activity (PMN-K) and Lipolytic Activity (LIP) (see sections 2.2., 2.3. and 2.4.). Based on the above, the experimental design used for this work resulted in the analysis of 270 samples.

2.2. Monitoring parameters of the composting processes on an industrial scale

The temperature inside the piles was measured *in situ* with a long-handled PT100 temperature probe, according to the selected sampling points. When necessary, temperature data were taken and provided by authorized company personnel, who had previously received instructions. The moisture content was determined by drying at 105 °C for 24 h. The pH and the conductivity were analysed in a 1:10 (w/v) water extract. Bulk density was measured according to the US Composting Council, (2001). Ash content was calculated by ignition at 550 °C to a constant weight. On the other hand, organic matter (OM) content was determined by subtracting percent ash content from one hundred. Total carbon (C) and nitrogen (N) were determined in solid samples by dry combustion at 950 °C using a LecoTruSpec C–N Elemental Analyzer (Leco Co., St. Joseph, MI, USA).

Table 1. Characteristics of the industrial-composting processes

Organic Waste	Code	Method of composting	Mixture for composting	Time ^a (months)	Temperature ^b (°C)
Vegetable Waste (VW)	1	Open air- Turned windrows	Mostly cucumber and zucchini crop residues: stalks, leaves	4	70
	2	Open air- Turned windrows	Mostly cucumber, zucchini crop residues: stalks, leaves	4	60
	3	Open air- Turned windrows	Mostly pepper crop residues: stalks, leaves	3	65
Urban Solid Waste (USW)	1	in-vessel Turned windrows in bays	Urban solid waste ^c	3.5	52
	2	in-vessel Turned windrows in bays	Urban solid waste ^c	4.5	55
	3	in-vessel Tunnel composting (turning by endless screw)	Urban solid waste ^c	3	50
Sewage Sludge (SS)	1	Open air- Turned windrows	Sewage sludge + straw (1:1 v/v)	3.5	48
	2	Open air Turned windrows	Sewage sludge + pruning wastes (1:1 v/v)	3	50
	3	in-vessel- Tunnel composting (turning by endless screw)	Dried sewage sludge (1:2 v/v)	3	52
Agrifood Waste (AW)	1	Open air- Turned windrows	Citric sludge ^d + palmtree prunings (1:3 v/v)	8	47
	2	Open air- Turned windrows	Cull tomatoes + tomato plant (stalks and leaves)	6	50
	3	Open air- Turned windrows	Citric sludge ^d + pig slurry + palmtree prunings (3:1:1.5 v/v)	4	55
“Alpeorujo” (ALP)	1	Open air -Turned windrows	Alpeorujo + chicken manure + straw (20.2:3.6:1 w/w)	8	50
	2	Open air Turned windrows	Alpeorujo + olive leaves + manure (12.5:3.5:1 w/w)	7	52
	3	Open air Turned windrows	Alpeorujo + manure + olive leaves (1:0.45:unknown w/w)	5	61

2.3. Measurement of total proteins, N-NH₄⁺, N-NO₃⁻, Nitrification Index (NI) and N-losses during the composting processes on an industrial scale

For the measurement of nitrates, the wet sample was diluted 1:5 in distilled water. It was incubated for 30 minutes at 200 rpm. After the incubation period, the samples were filtered under vacuum. The resulting extract was used for the measurement of nitrates with the Nitrachek 404 system (KPG, Products Ltd., Hove, United Kingdom). For evaluation of ammonium content, the fresh sample was diluted 1:10 in distilled water and incubated for 30 minutes at 200 rpm. After this period, the sample was filtered under vacuum. To the supernatant, 0.1M MgSO₄ was added in a 1:10 ratio. The ammonium concentration was measured using the reference electrode Ref. 5044 (HACH, Loveland, Colorado, USA) and the ammonium ISE Ref. HI4101 (HACH, Loveland, Colorado, USA). The analysis of total proteins was carried out from an extract obtained in the following way: 10 g of sample were mixed with in 40 mL of 0.5M K₂SO₄, and agitated at 200 rpm for 30 minutes. Final suspension was filtered through filter paper and the total proteins were analysed with Folin Ciocalteu reagent according to the method described by Herber et al. (1971).

The N-losses was estimated according to the following equation proposed by Cayuela et al. (2006) and Jolanun and Towprayoon (2010):

$$\text{N-losses (\%)} = 100 - 100 (A_1 \times N_2) / (A_2 \times N_1)$$

Where:

A₁= initial ash;

A₂ = final ash;

N₁= initial N;

N₂= final N;

The Nitrification Index was calculated as the ratio of N-NH₄⁺ / N-NO₃⁻ (Bernal et al., 1998).

2.4. Analysis of the enzymatic activities involved in the degradation of the nitrogen fractions

Fresh material was used to perform the enzymatic analyses. Protease activity was measured from the tyrosine derivatives generated from 1 g of sample after the incubation with sodium caseinate for 1 h at 37 °C and the subsequent reaction with Folin Ciocalteu reagent (Ladd and Butler, 1972). To determine Urease Activity, the method described by Bremner and Mulvaney (1978) was used. Thus, 2 g of sample were incubated in the presence of a basic solution of sodium hypochlorite and phenol with nitroprusside, as a catalyst, at 37 °C for 1 h. Ammonia was estimated by the chromogenic complex produced.

The method described by Farnet et al. (2010) was used to quantify Lipase activity. This activity was estimated from 0.5 g of fresh sample. The protocol was based on the colorimetric estimation of the p-nitrophenol (PNP) formed by the hydrolysis of the p-nitrophenil-laureate (pNPL) after mixing with the sample and incubating at 30 °C for 2 h. PMN-K activity was carried out following the method described by Tabatai and Bremmer (1969). In this protocol, Alkaline Phosphomonoesterase Activity was estimated using 0.5 g of sample. This reaction was based on the colourimetric estimation of the p-nitrophenyl phosphate (PNPP) released by the hydrolysis of the p-nitrophenyl- β -D-glucopiranoside (PNG) at 37 °C for 1 h. Spectrophotometric measurements of all enzymatic activities were measured with an Eon Biotek model spectrophotometer (Winooski, VT, USA) using 96-well microplates. Wavelengths used in these cases were 640 nm for protease and urease activities, and 400 nm for lipase and PMN-K activities.

2.5. Statistical analyses

Data obtained were subjected to statistical analysis using Statgraphics Centurion XVI.I (StatPoint Technologies Inc., Virginia, USA). Analysis of variance (ANOVA) and multiple comparison tests (Least Significant Difference Fisher Test) were performed to compare mean values for the different factors and variables analysed ($p < 0.05$). A Discriminant Analysis was used to assess the adequacy of the classification in groups on the basis of the independent variables (Starting Material, Sampling Phase and Replicates). Finally, the relationships between pairs of variables were analysed by a Pearson correlation coefficient with a 99% confidence interval.

3. Results and Discussion

3.1. Monitoring parameters of the composting processes on an industrial scale

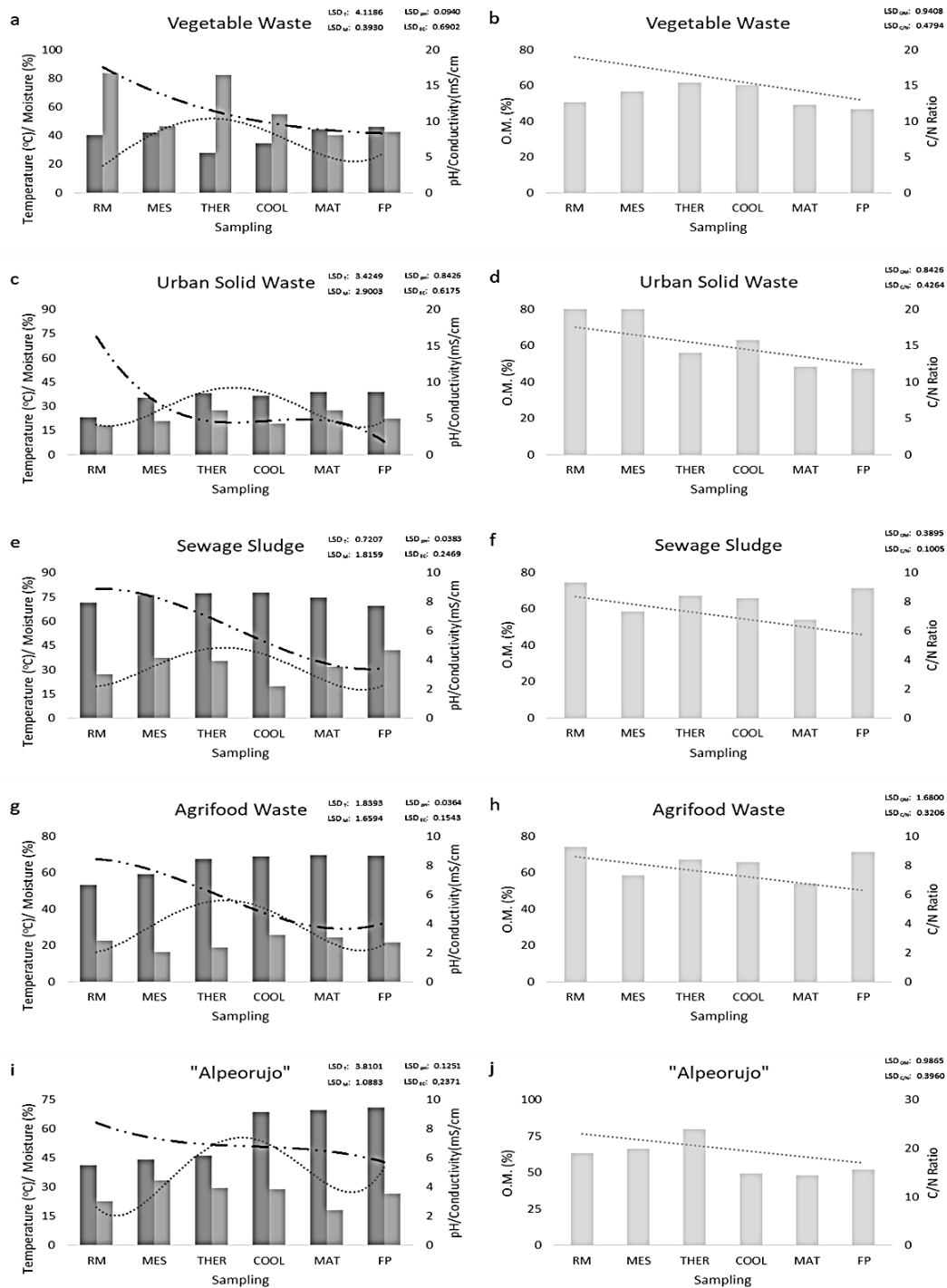
In this work, 15 companies dedicated to the industrial-scale composting of organic wastes of anthropogenic origin were selected. The maximum temperature in the thermophilic stage was observed for VW processes (65 °C) (Fig. 1a). For the rest of raw materials, composting piles reached values between 50-55 °C in the thermophilic phase. According to the EPA (2003), during the thermophilic phase of a composting process, temperatures above 55 °C must be reached for at least 3 consecutive days in order to achieve the sanitation of materials. Taking this criterion into account, it cannot be emphatically affirmed that all the processes studied strictly comply with the thermal requirements necessary for the sanitation of the materials. However, the size of composting piles on an industrial scale does not always allow thermal data to be taken correctly, which could result in lower temperature measurements than those considered real within the piles. Anyway, the thermophilic temperatures remained active for more than three consecutive days in all the processes.

The reduction in moisture content value at the end of composting is a positive sign of decomposition and compost maturity (Ameen et al., 2016). Based on the Spanish regulation this parameter must be less or around than 40% (BOE 999/2017) at the end of the composting process, criteria that met all the processes analyzed in this work. Along the processes, the greatest moisture loss was observed in the USW processes (85.54%) while in ALP the moisture loss was less than 33% with respect to the starting materials (Fig. 1c, 1i). In the rest of the processes a loss of humidity was observed between 52-62% with respect to the initial raw materials (Fig. 1a, 1e, 1g). Only in the case of the USW compost, the humidity values were noticeably low in relation to the rest of the samples (Fig. 1c). In all the cases, the moisture of the composts met the requirements indicated in current legislation.

With regard to the organic matter (OM), the greatest loss occurred in samples of VW and SS (OM loss near of 35%) (Fig. 1b, 1f). However, in all the processes, the requirement imposed by the Spanish regulation (BOE 999/2017) was met since OM values were around 40% (Fig. 1b, 1d, 1f, 1h, 1j). The C/N ratio tends to decrease due to the mineralization phenomena of organic matter (López-González et al., 2013) along the composting process. Initially, a C/N ratio around 25-30 is considered optimal. However, in this work, these initial values were only observed in the case of composting processes made from USW (Fig. 1d), while the rest of processes showed initial C/N ratio values lower than 20. According to Guo et al. (2012), the C/N ratio directly influences the maturity of the product obtained. However, despite the no optimal C/N ratio detected at the beginning of the different composting processes, it has been observed how the final value of the C/N ratio is adjusted to that described in Spanish regulation (BOE 999/2017) for compost (C/N ratio around 15-20).

The pH analysis of the compost samples of the different piles showed a gradual change from neutral to alkaline conditions, as described by Liu et al. (2011). In general terms, pH values at the end of the processes were higher than those obtained in the Raw Materials. Exceptionally, non-significant changes were detected from SS composting processes (Fig. 1e). Evolution of pH values for VW, USW and SS composting processes were similar to those obtained by Vargas et al. (2010). The pH value for ALP was similar to the results obtained by Alburquerque et al. (2011). According to Wang and Zeng (2017) during the composting of agrifood waste the pH could increase at the end of the process due to the formation of NH_3 , being able to reach pH values around 8 or higher. These results agree with the results of this work in the case of processes elaborated based on agrifood remains.

Fig. 1. Control and monitoring of composting processes on an industrial scale. Temperature (----), Moisture (— ·—), pH (■), Conductivity (■), Organic Matter (.....) and C/N ratio (—) throughout composting made of VW (a-b), USW (c-d), SS (e-f), AW (g-h) and ALP (i-j). Values are the mean of nine replicates. LSD values are indicated for each control parameter and raw material (Fisher LSD test at $p < 0.05$). VW: Vegetable Waste; USW: Urban Solid Waste; SS: Sewage Sludges; AW: Agrifood Waste; ALP: Alpeorujó; T: Temperature; M: Moisture, EC: Conductivity; MO: Organic Matter.



The EC reflects the salinity of several substrates and several authors describe it as a good indicator of compost maturity (Liu et al., 2011). The highest values of EC corresponded to vegetable waste based-compost (VW) (Fig. 1a). These values could be due to the origin of the plant waste, since this type of material comes from intensive horticultural systems, where an excessive mineral fertilization is usually applied (Song et al., 2010). While the EC values decrease along the VW composting processes, this parameter slightly increased in the rest of the composting processes. Yadav and Garg (2011) and Liu et al. (2011) obtained the same results and indicated that the increase in EC could be due to the release of different mineral ions and the mineralization of organic matter.

3.2. Evolution of the soluble nitrogen fractions throughout the different composting processes on an industrial scale

During composting, nitrogen is distributed between insoluble and soluble fractions. The latter comprises a mixture of ammonium, NO_2^- , NO_3^- , amino acids and peptides. Proteolytic and ammonifying microorganisms prevail during the initial stages of composting, giving rise to the release of ammonium and soluble proteins, while nitrification predominates during the maturation phase (Guardia et al., 2010).

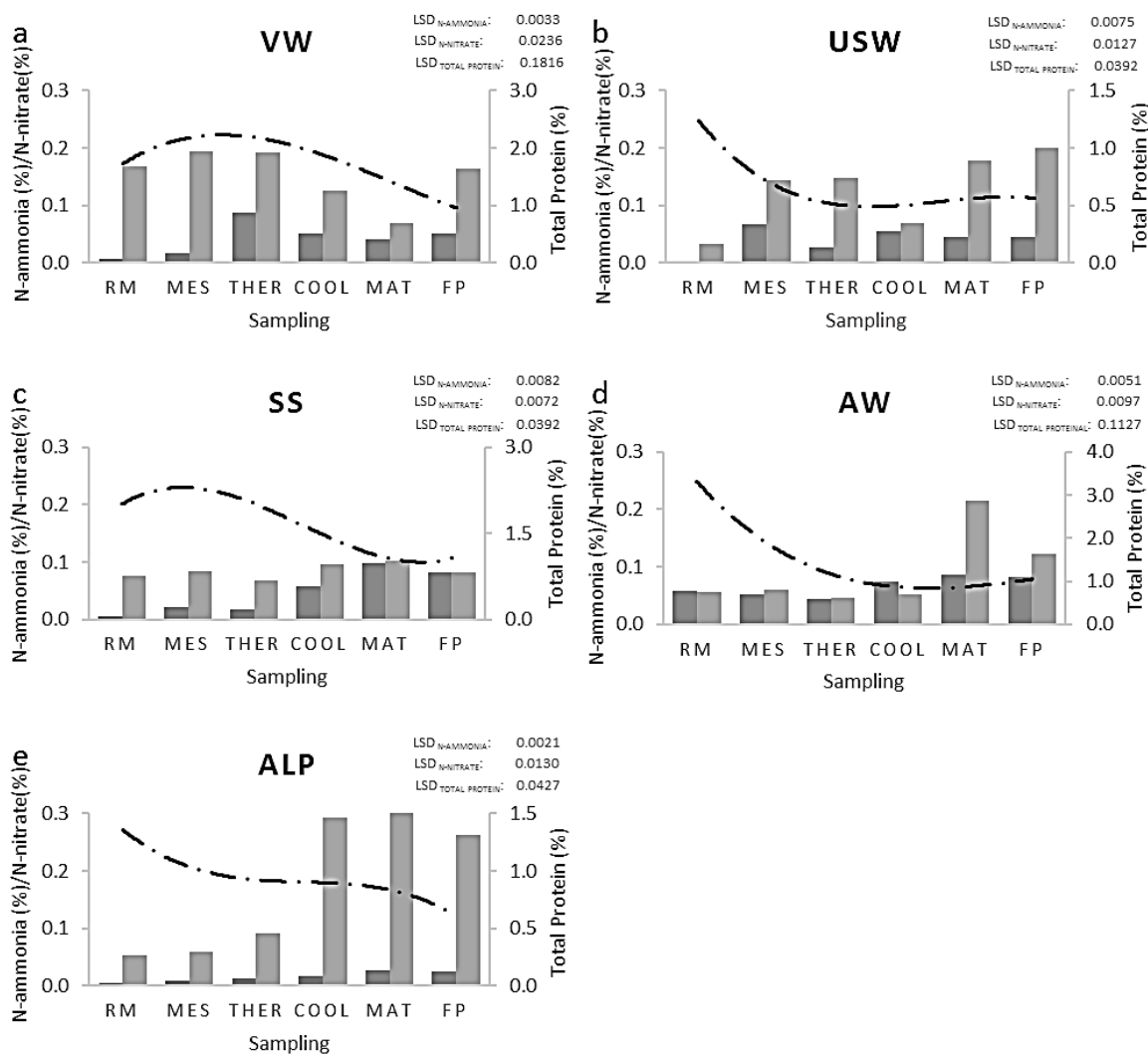
The results obtained for total proteins, N-NH_4^+ and N-NO_3^- are shown in Fig. 2a-e based on each different raw material. The total proteins follow a pattern regardless of the raw material used. However, in general terms, this parameter decreased until the end of the process. The most pronounced decrease was observed in AW (Fig. 2d), where the maximum value of total proteins were also observed. These results follow a trend similar to that described by López-González et al. (2013).

On the other hand, there was a general increase in the N-NH_4^+ concentration at the end of the composting processes. This increase was progressive and constant for SS, AW and ALP processes (Fig. 2c, 2d, 2e), showing a more irregular behavior in the case of VW and USW processes. These values are within the same range of results obtained in López-González et al. (2013). According to Sánchez-Monedero et al. (2001) the level of N-NH_4^+ can be used, together with other parameters, as an indicator of the stability of the compost. In this sense, low concentrations of N-NH_4^+ must be detected in compost samples considered as fully mature.

Generally, during the composting process, N-NO_3^- is found in higher concentrations than N-NH_4^+ . According to Tognetti et al. (2007), N-NO_3^- values increases along the composting process respect to the raw material. In Fig. 2a-e, the nitrate concentration in the different composting processes was representative for each raw material. In the

composting processes described in this work, it is worth noting a significant increase in the fraction of $N-NO_3^-$ over time, although it was very noticeable in the case of the USW (Fig. 2b), AW (Fig. 2d) and ALP (Fig. 2e) processes. In the case of the VW (Fig. 2a) and SS (Fig. 2c) processes, the increase in this fraction was almost undetectable with respect to the start of the process.

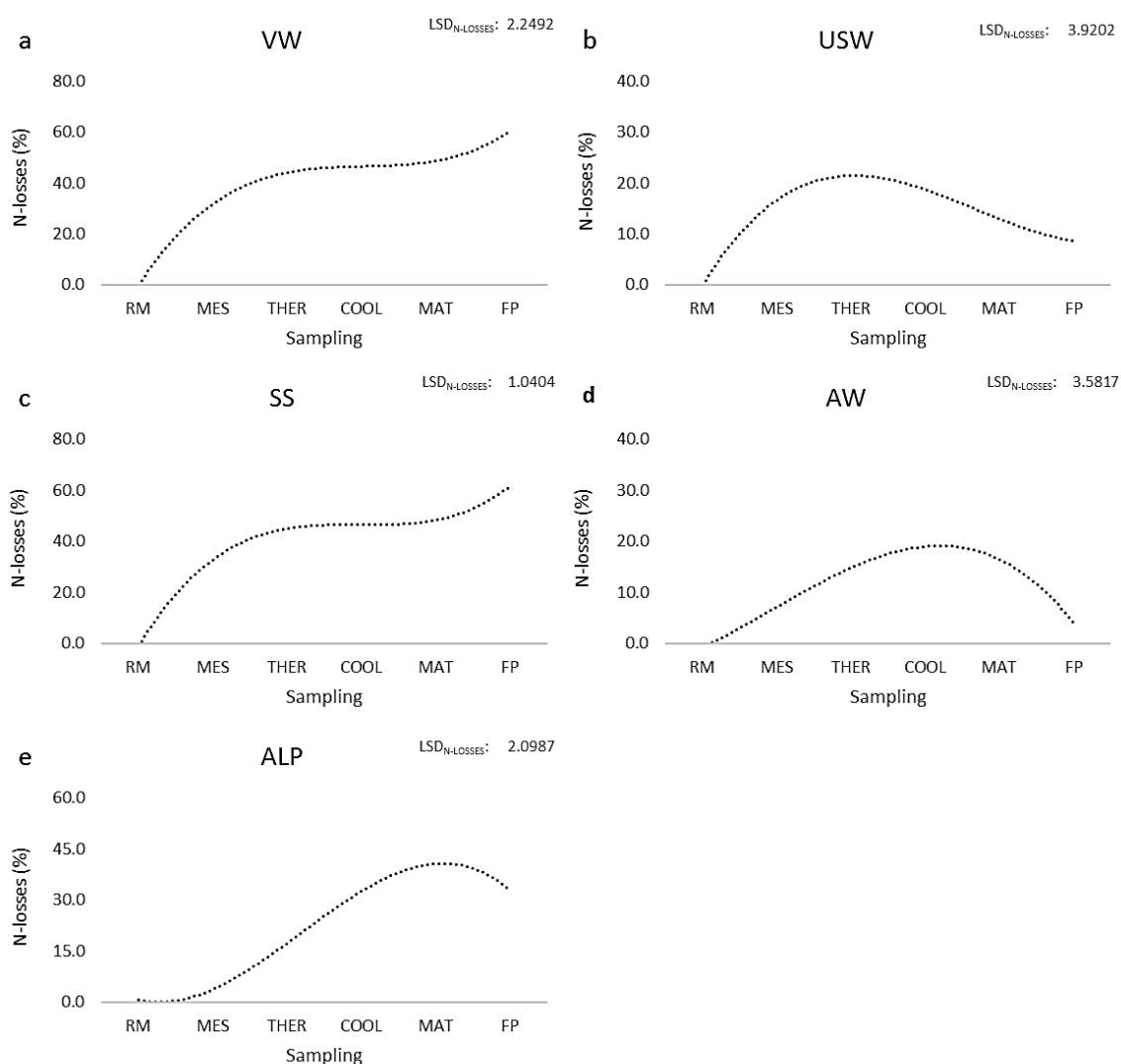
Fig. 2. Evolution of the soluble nitrogen fractions throughout the different composting processes: $N-NO_3^-$ (■), $N-NH_4^+$ (■) and Total proteins (— · —). Values are the mean of nine replicates. LSD values are indicated for each soluble nitrogen fractions and raw material (Fisher LSD test at $p < 0.05$). VW: Vegetable Waste; USW: Urban Solid Waste; SS: Sewage Sludges; AW: Agrifood Waste; ALP: Alpeorujo.



Throughout the composting process, nitrogen losses can occur due to ammonia volatilization and leaching phenomena (Zhang et al., 2016). Fig. 3 shows the percentage of nitrogen loss in the different composting processes. According to Sánchez-Monedero et al. (2001) the percentage of nitrogen loss depends on the initial composition of the

raw material used. In this work, the largest nitrogen losses occurred at the maturation phase in the VW (61%) and SS (65%) processes (Fig. 3a, 3c). These results are endorsed by Sánchez-García et al. (2015), whose study analysed different mixtures that show high percentages of nitrogen loss. In the case of USW, AW and ALP processes, the greatest losses were observed in the THER, COOL and MAT phases, respectively. During the most advanced stages of maturation, nitrogen losses were less remarkable in USW and AW processes. In these last cases, the decrease in nitrogen losses could be due to the transformation of N-NH_4^+ into N-NO_3^- , avoiding losses due to ammonium volatilization (Zhang et al., 2016), or even to the entry of new fresh materials (this last statement is only a conjecture). Anyway, this last aspect would be a clear reflection of bad practices in composting on an industrial scale.

Fig. 3. Nitrogen Loss (%) throughout the different industrial-composting processes. Values are the mean of nine replicates. LSD values are independently shown for each raw material (Fisher LSD test at $p < 0.05$). VW: Vegetable Waste; USW: Urban Solid Waste; SS: Sewage Sludges; AW: Agrifood Waste; ALP: Alpeorujó

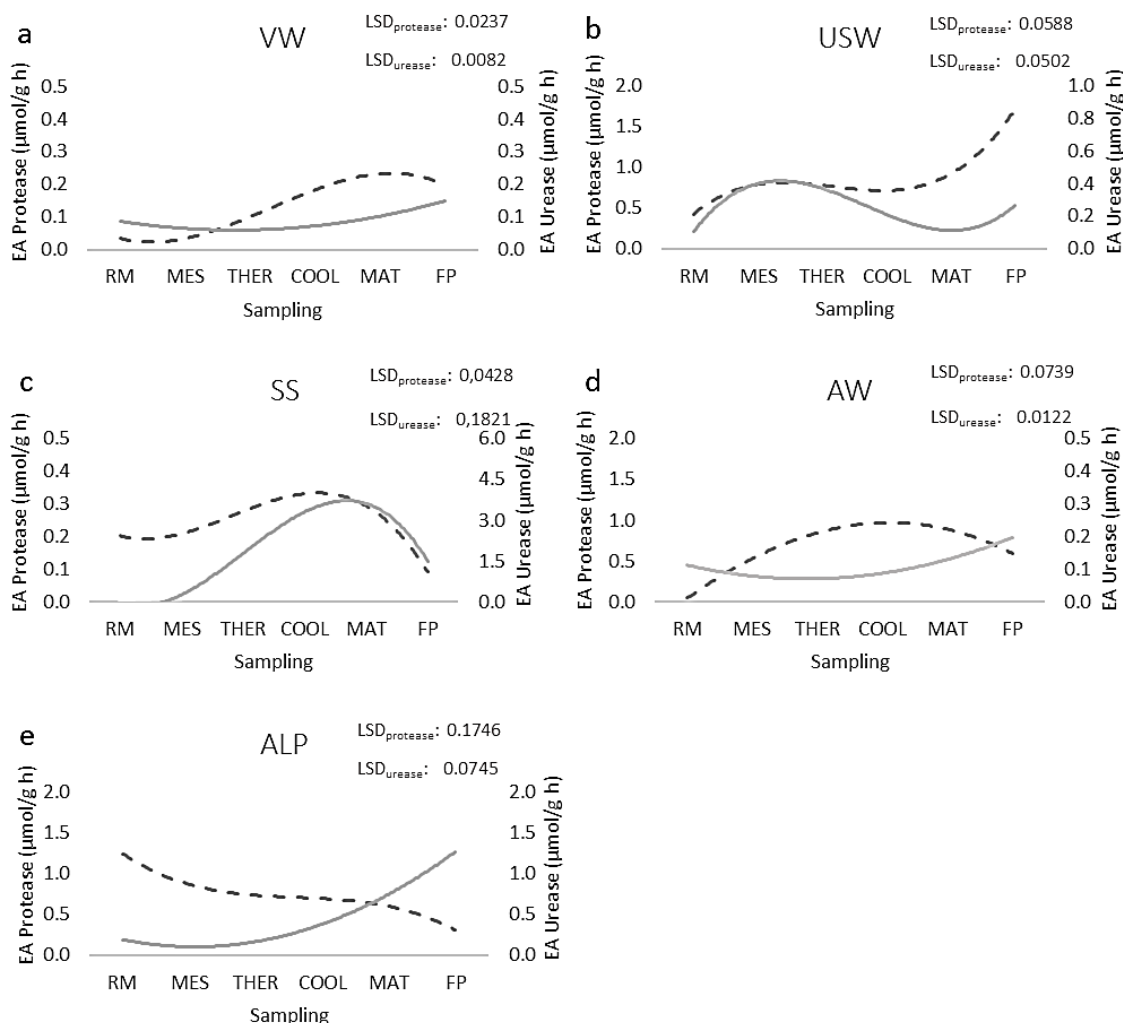


In recent years, many physical-chemical and biochemical parameters associated with the composting process have been studied. This study has mainly sought to combine different criteria with which to establish maturity and stability criteria for compost. One of these criteria is based on the calculation of the $\text{N-NH}_4^+ / \text{N-NO}_3^-$ ratio (nitrification index) to know the degree of maturity of the compost (Onwosi et al., 2017). In this same work, it was tried that the nitrification, can be an index of maturity of the compost, which should have a level as low as possible at the end of the composting process. A nitrification index value is generally used to classify the compost as fully mature (nitrification index of 0.5); mature (above 0.5 to 3.0) and immature (above 3.0). According to this classification, final products derived from VW (0.396), USW (0.225) and ALP (0.097) processes could be considered as fully mature composts, while those from SS (1.016) and AW (0.716) processes could be considered as mature composts. However, according to the stricter rules of Bernal et al. (1998) ($\text{N-NH}_4^+ / \text{N-NO}_3^-$, ratio < 0.16 means fully mature products), only the products obtained from ALP processes could be considered as fully mature compost.

3.3. Enzymatic activity involved in the transformation of the nitrogen fractions during the composting processes on an industrial scale

Protease and urease activities take part in the process of nitrogen mineralization during the composting process. Both of them hydrolyze nitrogen compounds into ammonia, using low molecular weight proteins and urea as substrates, respectively (Liu et al., 2011). In general, both activities tend to increase throughout the composting process, but their evolution can vary according to the starting materials. In Fig. 4 a-e, these activities are represented for each different raw material.

Fig. 4. Dynamics of Protease (—) and Urease (---) activities throughout composting processes made from VW (a), USW (b), SS (c), AW (d) and ALP (e). Values are the mean of nine replicates. LSD values are indicated for each enzymatic activity and raw material (Fisher LSD test at $p < 0.05$). VW: Vegetable Waste; USW: Urban Solid Waste; SS: Sewage Sludges; AW: Agrifood Waste; ALP: Alpeorujo



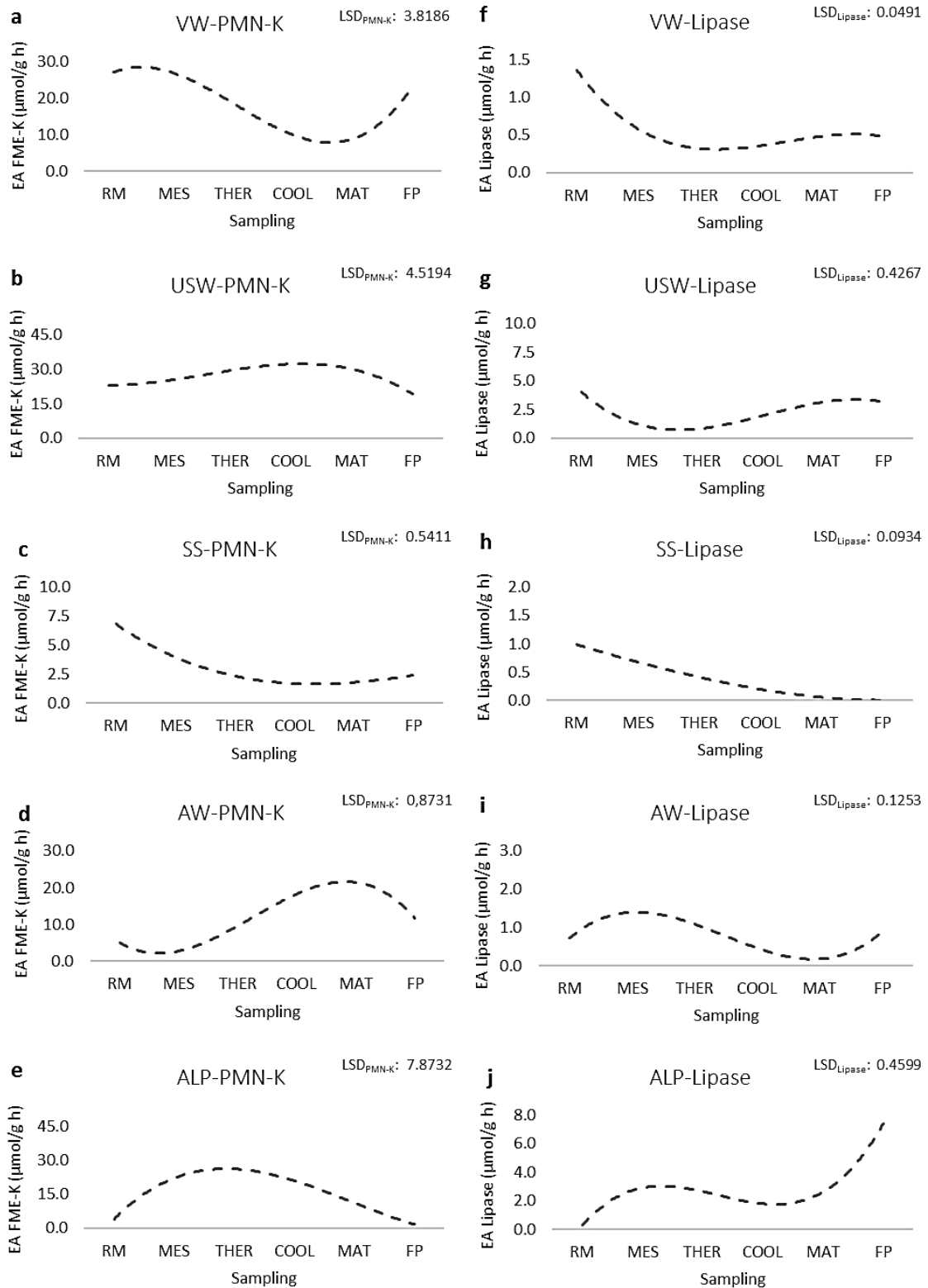
The highest value of proteolytic activity was detected in the USW, AW and ALP processes while the lowest one was reached in VW and SS samples (Fig. 4). Protease activity increased over time except for SS and ALP processes where a remarkable decrease occurred at the end of the composting process. The data obtained in Fig. 4 a-d showed trends similar to those obtained by Jurado et al. (2014), while the evolution observed in the ALP samples was similar to that obtained in some of the processes studied by Cunha-Queda et al. (2007), in which the decrease in the protease activity was associated with the origin of the raw material used.

In general, the urease activity reached the maximum value in the maturation phase, except for the USW processes. The results of several investigations have been contradictory regarding the behavior of urease activity during the composting process.

Jurado et al. (2014) showed how the urease activity decreased throughout the composting, while Vargas et al. (2010) and Sudkolai et al. (2017) observed that urease activity increased over time in composting processes based on plant waste and sewage sludge, supporting the results obtained in this work.

In addition to protease and urease activities, other enzymes are indirectly related to the nitrogen cycle. Phosphatases catalyse the hydrolytic cleavage of phosphoric acid esters. Depending on their pH optimum they are classified as alkaline or acid phosphatases (Linhart and Walter, 1965). PMN-K is considered, together with acidic phosphomonoesterase, one of the predominant phosphatases in most soils and residues (Albrecht et al., 2010). Phosphatases are N-rich enzymes, which means that there is a coupling between P and N cycles (Marklein and Houlton, 2012). PMN-K activity showed an irregular behavior based on the different raw materials (Fig. 5 a-e). Results indicated that the highest PMN-K values were detected during the biooxidative phase for VW, SS and ALP processes (Fig. 5a, 5c, 5e), while this effect was detected during maturation phase in the case of AW processes (Fig. 5d). Contrary to the above, PMN-K activity did not vary significantly when USW were processed. This irregular behavior of the PMN-K activity was supported by Jurado et al. (2014), who revealed peaks of this activity in thermophilic phase and after, at the end of the process. On the other hand, according to Cunha-Queda et al. (2007), this activity increased at the end of the process due to the nature of the raw material, as occurs with VW and AW samples (Fig. 5a, 5d), while Albrecht et al. (2010) detected that the PMN-K activity trend declined as the process progressed. Microbial lipases catalyze both hydrolysis and the synthesis of long chain acylglycerols. In general, lipase production is influenced by the type and concentration of carbon and nitrogen sources and other physicochemical parameters (Andualema and Gessesse, 2012). In this work, lipase activity tended to decrease at the end of the composting process. Jurado et al. (2014) and Cunha-Queda et al. (2007) detected this same behavior. Only when the lipase activity was analysed in the ALP processes an important increase was detected during the maturation phase (Fig. 5j). This effect could be due to an accidental contribution of organic matter at the end of the process.

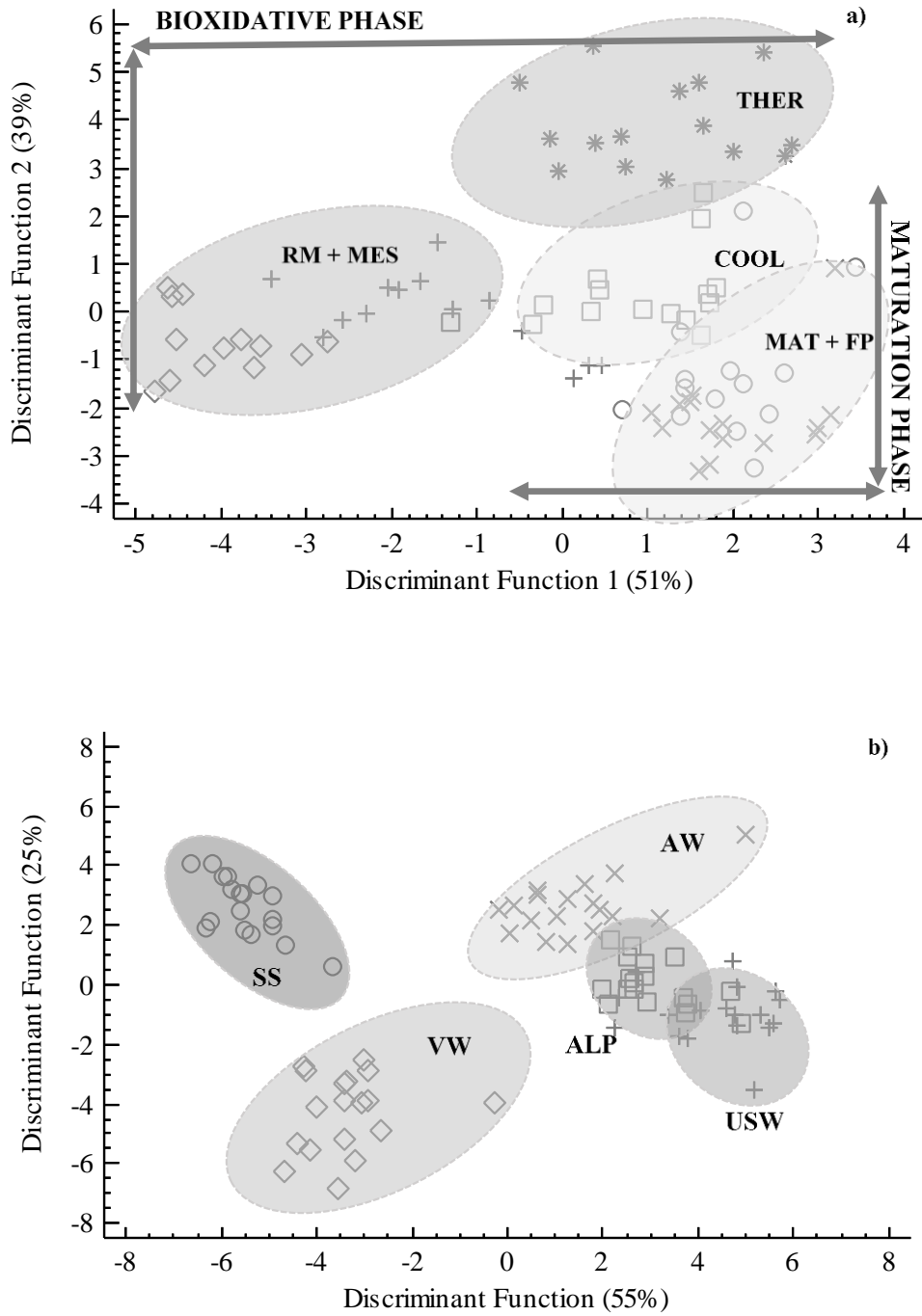
Fig. 5. Dynamics of PMN-K (a-e) and Lipase (f-j) activities throughout composting processes made from VW (a), USW (b), SS (c), AW (d) and ALP (e). Values are the mean of nine replicates. LSD values are indicated for each enzymatic activity and raw material (Fisher LSD test at $p < 0.05$). VW: Vegetable Waste; USW: Urban Solid Waste; SS: Sewage Sludges; AW: Agrifood Waste; ALP: Alpeorujo



In order to analyse in a global way the implication of the different enzymatic activities in the biotransformation of the nitrogenous fractions, a Pearson correlation test including the data derived from all the analysed samples was carried out. So, the temperature factor was significantly correlated with nitrogen losses ($R=0.2319$), as well as with the production of $N-NO_3^-$ ($R=0.2138$). In addition, the greatest losses of nitrogen occurred in parallel to the greater urease activity ($R=0.4007$) but contrary to the protease one ($R=-0.2814$). On the other hand, the total protein content not only correlated negatively with protease activity ($R=-0.4986$), but also with PMN-K and lipase ($R = -0.2785$ and -0.3152 , respectively), which supports the proximity of both activities with the N biotransformation processes. Lipase was also negatively correlated ($R=-0.4048$) with the nitrification index ($N-NH_4^+ / N-NO_3^-$) and, consequently, with lower ammonia production and higher nitrate production ($R=-0.3936$ and 0.2972 , respectively). Although protease and urease activities tend to increase throughout the composting process, it is clear that their progress depends largely on the starting materials. In fact, both activities did not correlate with each other when all the processes were analysed together. On the other hand, despite the chaotic behavior of the PMN-K activity, the results showed an important link between this activity and the two activities mentioned above, protease and urease, although in the opposite direction ($R=0.3006$ and -0.3114 , respectively).

To analyse globally the evolution and coherence of all the composting processes, two discriminant analyses were performed (Fig. 6). In both cases, the parameters included in the analysis were temperature, moisture, pH, organic matter, C/N ratio, conductivity, protease, urease, PMN-K and lipase activities, $N-NH_4^+$, $N-NO_3^-$, total proteins, nitrification index and nitrogen losses. Fig. 6a shows the general composting profile depending on the succession of thermal phases. Two functions explained around 90% of the discrimination in the results obtained. Data were located in two main groups: Bioxidative Phase I (RM + MES + THER) and Maturation Phase (COOL + MAT + FP). Bioxidative, stabilization and humification (maturation) phases appeared well separated (Fig. 6a). Likewise, the stage in which the highest temperatures were reached (thermophilic stage) appeared clearly defined and differentiated from the rest of the mesophilic stages (RM and MES). On the other hand, the cooling stage (COOL) appears as a very limited transition period between the bioxidative and maturation phase, as well as independent of the final products (FP). Thereby, it could be concluded that there was a temporal coherence regarding the evolution of composting processes, regardless of the starting materials (Fig. 6a). However, when a discriminant analysis was performed based on the nature of the original organic matter, two functions were obtained that served to explain up to 80% of the differences between the different composting processes (Fig. 6b).

Fig. 6. Discriminant analysis based on composting of different processes, taking into account the distribution of principal thermal phases (Bioxidative Phase = RM + MES + THER; Maturation Phase = COOL + MAT + FP) a), and the raw materials b). VW: Vegetable Waste; USW: Urban Solid Waste; SS: Sewage Sludges; AW: Agrifood Waste; ALP: Alpeorujo.



Surprisingly, although the processes elaborated from ALP and USW, showed a slight overlap, the rest of the processes appeared in the discriminant graph as totally independent groups. This fact confirmed the exclusive nature of composting processes carried out with raw materials of different nature.

In view of the results obtained, it should be taken into account that certain control parameters of the composting process, do not evolve in a standard way when it comes to composting processes on an industrial scale, which could be related to the type of raw material and the inappropriate conditioning of the initial mixtures. Consequently, both aspects could influence the evolution of the enzymatic activities related to the dynamics of the nitrogen fractions, since the behavior of these, in some cases, was random and practically specific for each type of material. These results confirm what is indicated in recent works (Estrella-González et al., 2019), in which it is concluded that very different and exclusive composting processes from the point of view of the starting materials, can be uniform with respect to the evolution of the basic stages of the composting process, obtaining compost that conform to the parameters previously established at the legislative level.

4. Conclusions

It could be concluded that the basic parameters of monitoring and the evolution of enzymatic activity depended largely on the raw materials, being strongly linked to the transformation of the nitrogen fractions. However, despite the apparent lack of parallelism between industrial composting processes performed with different anthropogenic wastes, biotransformation occurred as expected in relation to the final quality parameters. Therefore, despite the need to standardize composting practices on an industrial scale, microorganisms fulfill their function and manage to biotransform substrates of a very diverse nature, obtaining products that meet the agronomic quality standards established at the legislative level.

Appendix A. Supplementary Material

The following are the Supplementary data to this article:

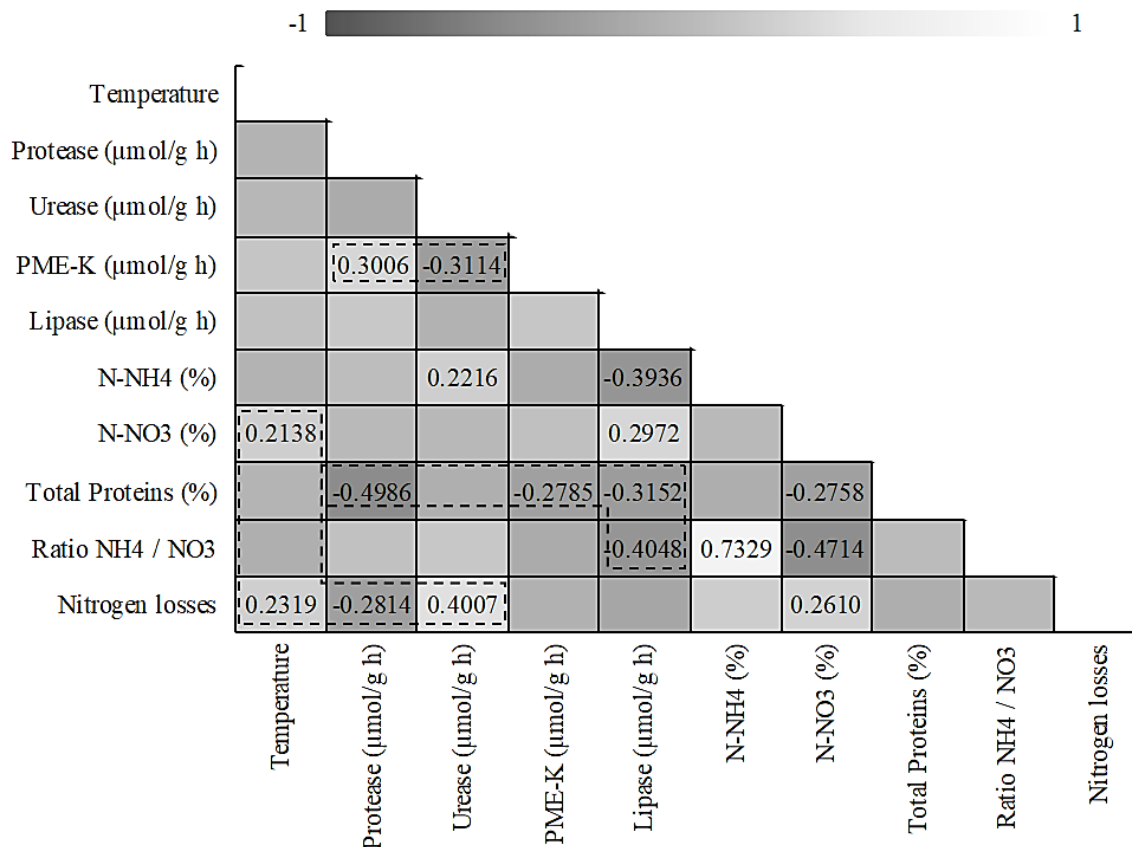
Supplementary data 1

Supplementary data 2

Supplementary data 1. Physical-chemical and enzymatic characterization of samples from composting processes based on raw materials of different origin.

Organic Waste	Sampling	Temperature	Moisture (%)	pH	OM(%)	C/N	Conductivity (mS/cm)	Protease (μmol/g h)	Urease (μmol/g h)	PMN-K (μmol/g h)	Lipase (μmol/g h)	N-NH ₄ ⁺ (%)	N-NO ₃ - (%)	Total Protein (%)	N-losses
Vegetable Waste (VW)	RM	19.50 ^a ± 2.10	85.94 ^f ± 0.13	8.10 ^f ± 0.20	74.06 ^c ± 0.48	12.63 ^a ± 0.14	16.78 ^e ± 0.74	0.02 ^a ± 0.00	0.09 ^{bc} ± 0.00	26.23 ^{bc} ± 6.47	1.33 ^d ± 0.04	0.01 ^a ± 0.00	0.17 ^b ± 0.01	1.73 ^b ± 0.07	0.00 ^a ± 0.00
	MES	36.67 ^b ± 1.67	77.05 ^e ± 0.24	8.43 ^d ± 0.02	70.33 ^d ± 0.61	14.18 ^b ± 1.13	9.27 ^{ab} ± 0.86	0.05 ^{ab} ± 0.00	0.06 ^{ab} ± 0.00	29.97 ^c ± 5.23	0.64 ^c ± 0.03	0.02 ^b ± 0.00	0.19 ^b ± 0.01	2.26 ^{bc} ± 0.27	34.77 ^b ± 2.80
	THER	65.00 ^d ± 2.89	46.97 ^d ± 0.42	5.57 ^a ± 0.06	69.35 ^d ± 0.30	15.45 ^b ± 0.19	16.52 ^c ± 0.75	0.12 ^{bc} ± 0.02	0.05 ^a ± 0.01	15.60 ^{ab} ± 0.43	0.36 ^b ± 0.03	0.09 ^a ± 0.00	0.19 ^b ± 0.00	1.79 ^b ± 0.15	42.74 ^{bc} ± 4.11
	COOL	28.67 ^{ab} ± 1.86	53.42 ^c ± 0.55	6.93 ^b ± 0.01	63.20 ^c ± 2.19	15.05 ^b ± 0.13	11.02 ^b ± 0.93	0.11 ^{bc} ± 0.03	0.08 ^{bc} ± 0.01	10.00 ^a ± 0.75	0.15 ^a ± 0.02	0.05 ^d ± 0.00	0.12 ^{ab} ± 0.01	2.48 ^c ± 0.25	47.61 ^c ± 6.66
	MAT	31.67 ^{ab} ± 7.26	43.92 ^b ± 0.13	8.87 ^e ± 0.06	58.85 ^b ± 0.98	12.34 ^a ± 0.10	8.11 ^a ± 0.45	0.30 ^d ± 0.01	0.10 ^c ± 0.00	10.37 ^a ± 0.99	0.67 ^a ± 0.10	0.04 ^c ± 0.0	0.07 ^a ± 0.01	1.02 ^a ± 0.22	46.89 ^c ± 2.94
	FP	26.67 ^{ab} ± 6.67	41.05 ^a ± 0.55	9.18 ^f ± 0.04	48.43 ^a ± 0.92	11.73 ^a ± 0.18	8.48 ^a ± 0.08	0.18 ^c ± 0.04	0.15 ^d ± 0.02	22.28 ^{bc} ± 1.79	0.43 ^b ± 0.04	0.05 ^d ± 0.00	0.16 ^b ± 0.05	1.06 ^a ± 0.09	62.42 ^d ± 0.82
Urban Solid Waste (USW)	RM	21.00 ^a ± 0.56	78.19 ^d ± 2.69	5.16 ^a ± 0.03	74.73 ^d ± 0.08	28.47 ^c ± 0.30	3.98 ^a ± 0.85	0.28 ^a ± 0.03	0.05 ^a ± 0.01	25.05 ^a ± 3.60	4.12 ^b ± 0.89	0.00 ^a ± 0.00	0.03 ^a ± 0.00	1.27 ^c ± 0.08	0.00 ^a ± 0.00
	MES	20.00 ^a ± 1.21	17.73 ^{ab} ± 2.44	7.84 ^b ± 0.10	66.26 ^c ± 1.16	20.16 ^d ± 0.62	4.63 ^{ab} ± 0.54	1.24 ^a ± 0.08	0.60 ^c ± 0.09	20.56 ^a ± 1.70	0.63 ^a ± 0.11	0.07 ^d ± 0.01	0.14 ^b ± 0.01	0.59 ^b ± 0.04	8.30 ^{ab} ± 3.53
	THER	52.33 ^b ± 1.45	36.70 ^c ± 3.47	8.43 ^d ± 0.02	54.14 ^a ± 1.05	14.03 ^b ± 0.24	6.10 ^b ± 0.82	0.38 ^a ± 0.01	0.17 ^{ab} ± 0.03	28.68 ^a ± 5.31	1.73 ^b ± 0.26	0.03 ^b ± 0.01	0.15 ^b ± 0.01	0.62 ^b ± 0.02	17.77 ^{bc} ± 5.45
	COOL	25.67 ^a ± 0.67	21.07 ^b ± 4.95	8.12 ^c ± 0.17	57.60 ^b ± 0.75	15.76 ^c ± 0.79	4.30 ^{ab} ± 0.41	0.60 ^b ± 0.07	0.20 ^b ± 0.05	42.99 ^b ± 7.92	1.11 ^a ± 0.17	0.05 ^{cd} ± 0.01	0.07 ^a ± 0.02	0.54 ^{ab} ± 0.02	14.67 ^c ± 2.52
	MAT	28.33 ^a ± 8.33	13.05 ^{ab} ± 0.15	8.64 ^d ± 0.01	51.88 ^a ± 0.92	12.09 ^a ± 0.10	6.15 ^b ± 0.32	1.23 ^c ± 0.05	0.21 ^b ± 0.02	19.73 ^a ± 0.89	3.50 ^b ± 0.35	0.04 ^{bc} ± 0.00	0.18 ^{bc} ± 0.01	0.46 ^a ± 0.03	15.15 ^{bc} ± 1.92
	FP	20.00 ^a ± 1.45	11.31 ^a ± 0.16	8.66 ^d ± 0.04	53.91 ^a ± 0.40	11.79 ^a ± 0.18	4.97 ^{ab} ± 0.47	1.60 ^d ± 0.10	0.23 ^b ± 0.05	22.35 ^a ± 2.15	3.09 ^b ± 0.29	0.04 ^{bc} ± 0.00	0.20 ^c ± 0.02	0.60 ^b ± 0.02	8.12 ^{ab} ± 0.48
Sewage Sludges (SS)	RM	20.33 ^a ± 0.33	81.87 ^c ± 0.56	7.95 ^b ± 0.07	71.97 ^c ± 0.42	9.29 ^c ± 0.19	3.02 ^b ± 0.03	0.19 ^{ab} ± 0.03	0.13 ^a ± 0.01	7.11 ^d ± 1.20	1.07 ^a ± 0.15	0.01 ^a ± 0.00	0.08 ^{ab} ± 0.01	2.04 ^b ± 0.20	0.00 ^a ± 0.00
	MES	28.83 ^c ± 0.60	67.09 ^e ± 2.49	8.47 ^d ± 0.02	58.05 ^d ± 0.09	7.32 ^b ± 0.04	4.15 ^{cd} ± 0.17	0.23 ^b ± 0.06	0.16 ^a ± 0.03	2.85 ^{bc} ± 0.25	0.37 ^b ± 0.10	0.02 ^a ± 0.00	0.08 ^{abc} ± 0.01	2.13 ^b ± 0.28	31.03 ^b ± 1.88
	THER	50.00 ^d ± 1.15	73.68 ^d ± 3.56	8.59 ^{bc} ± 0.01	57.18 ^d ± 0.65	8.42 ^c ± 0.04	3.95 ^{cd} ± 0.54	0.31 ^{bc} ± 0.05	0.56 ^a ± 0.29	4.14 ^c ± 0.52	0.79 ^c ± 0.21	0.02 ^a ± 0.00	0.07 ^a ± 0.01	2.34 ^b ± 0.47	41.49 ^c ± 2.57
	COOL	31.67 ^d ± 0.88	38.23 ^b ± 2.81	8.62 ^d ± 0.03	49.40 ^b ± 0.09	8.24 ^c ± 0.17	2.20 ^a ± 0.10	0.22 ^b ± 0.02	5.98 ^c ± 0.27	0.43 ^a ± 0.05	0.05 ^{ab} ± 0.01	0.06 ^b ± 0.01	0.10 ^{bc} ± 0.01	1.19 ^a ± 0.06	56.47 ^d ± 1.87
	MAT	26.27 ^b ± 0.67	35.74 ^{ab} ± 0.48	8.27 ^c ± 0.06	53.38 ^c ± 0.22	6.75 ^a ± 0.07	3.56 ^{bc} ± 0.14	0.39 ^c ± 0.05	1.56 ^b ± 0.11	2.20 ^{ab} ± 0.52	0.02 ^a ± 0.00	0.10 ^c ± 0.01	0.10 ^c ± 0.01	1.23 ^b ± 0.06	39.84 ^c ± 1.33
	FP	21.30 ^a ± 0.89	30.80 ^a ± 0.30	7.72 ^a ± 0.02	47.19 ^a ± 0.42	8.92 ^d ± 0.02	4.67 ^d ± 0.05	0.06 ^a ± 0.00	2.05 ^b ± 0.02	2.39 ^{bc} ± 0.23	0.04 ^{ab} ± 0.00	0.08 ^c ± 0.01	0.08 ^{abc} ± 0.00	1.04 ^a ± 0.07	63.86 ^c ± 0.96
Agrifood Waste (AW)	RM	16.94 ^a ± 0.98	65.59 ^d ± 1.63	6.67 ^a ± 0.06	62.51 ^b ± 0.12	16.66 ^b ± 0.38	2.82 ^{cd} ± 0.07	0.09 ^a ± 0.01	0.11 ^{bc} ± 0.00	5.22 ^a ± 0.28	0.51 ^a ± 0.14	0.06 ^b ± 0.00	0.06 ^a ± 0.01	3.24 ^c ± 0.02	0.00 ^a ± 0.00
	MES	28.40 ^{bc} ± 2.07	66.60 ^d ± 1.82	7.41 ^b ± 0.05	72.95 ^c ± 3.42	19.16 ^d ± 0.33	2.07 ^a ± 0.14	0.50 ^b ± 0.05	0.08 ^{ab} ± 0.01	3.62 ^a ± 0.63	2.14 ^b ± 0.25	0.05 ^{ab} ± 0.00	0.06 ^a ± 0.01	2.17 ^b ± 0.26	4.97 ^{ab} ± 1.14
	THER	50.54 ^d ± 2.43	45.57 ^c ± 2.40	8.44 ^c ± 0.01	66.96 ^b ± 1.32	17.74 ^c ± 0.18	2.34 ^{ab} ± 0.04	0.55 ^{bc} ± 0.07	0.06 ^a ± 0.02	2.82 ^a ± 0.10	0.32 ^a ± 0.07	0.04 ^a ± 0.00	0.05 ^a ± 0.00	0.93 ^a ± 0.05	14.99 ^{bc} ± 7.53
	COOL	32.98 ^c ± 1.68	33.16 ^{ab} ± 1.35	8.60 ^d ± 0.02	50.64 ^a ± 0.47	12.51 ^a ± 0.02	3.24 ^d ± 0.28	1.63 ^d ± 0.09	0.14 ^c ± 0.02	25.02 ^d ± 1.61	0.53 ^a ± 0.10	0.07 ^a ± 0.00	0.05 ^a ± 0.00	0.87 ^a ± 0.06	22.72 ^c ± 0.72
	MAT	25.77 ^b ± 1.93	35.15 ^b ± 0.44	8.72 ^c ± 0.02	52.73 ^a ± 0.20	12.69 ^a ± 0.33	3.08 ^{cd} ± 0.12	0.38 ^b ± 0.07	0.06 ^a ± 0.01	16.87 ^c ± 0.84	0.50 ^a ± 0.05	0.09 ^d ± 0.00	0.22 ^c ± 0.02	0.99 ^a ± 0.09	12.38 ^{bc} ± 5.59
	FP	20.30 ^a ± 0.51	30.46 ^a ± 0.35	8.67 ^{bc} ± 0.00	52.10 ^a ± 0.86	11.83 ^a ± 0.41	2.72 ^{bc} ± 0.16	0.73 ^c ± 0.08	0.23 ^d ± 0.00	12.99 ^b ± 0.24	0.75 ^a ± 0.18	0.08 ^{cd} ± 0.00	0.12 ^b ± 0.02	1.00 ^a ± 0.05	5.13 ^{ab} ± 2.12
Alpeorajo (ALP)	RM	19.87 ^a ± 0.67	62.48 ^c ± 0.19	5.52 ^a ± 0.11	74.85 ^c ± 1.68	19.02 ^b ± 0.87	3.05 ^{ab} ± 0.19	1.33 ^c ± 0.19	0.06 ^a ± 0.00	9.17 ^a ± 0.26	0.38 ^a ± 0.03	0.00 ^a ± 0.00	0.05 ^a ± 0.01	1.39 ^d ± 0.03	0.00 ^a ± 0.00
	MES	24.77 ^{ab} ± 1.03	57.33 ^d ± 0.73	5.91 ^b ± 0.26	73.52 ^c ± 0.21	19.96 ^b ± 0.23	4.47 ^d ± 0.28	0.60 ^{ab} ± 0.04	0.30 ^{bc} ± 0.09	3.58 ^a ± 0.57	2.45 ^b ± 0.25	0.01 ^{ab} ± 0.00	0.06 ^a ± 0.01	0.94 ^c ± 0.04	6.14 ^d ± 2.88
	THER	54.33 ^d ± 3.38	51.17 ^{bc} ± 1.12	6.15 ^b ± 0.01	75.60 ^c ± 0.51	23.97 ^c ± 0.46	3.96 ^{cd} ± 0.19	0.97 ^{bc} ± 0.31	0.16 ^{ab} ± 0.05	49.00 ^b ± 19.35	3.61 ^b ± 0.14	0.01 ^b ± 0.00	0.09 ^a ± 0.02	1.02 ^c ± 0.09	15.17 ^b ± 1.07
	COOL	49.00 ^{cd} ± 5.51	48.01 ^b ± 1.65	9.17 ^c ± 0.05	60.07 ^b ± 0.38	14.82 ^a ± 0.10	3.86 ^{bcd} ± 0.48	0.75 ^{ab} ± 0.05	0.52 ^c ± 0.06	12.31 ^a ± 0.00	0.83 ^a ± 0.30	0.02 ^c ± 0.00	0.29 ^b ± 0.01	0.90 ^{bc} ± 0.03	32.98 ^c ± 0.74
	MAT	33.33 ^{bc} ± 6.67	51.63 ^c ± 0.43	9.28 ^c ± 0.04	55.90 ^a ± 0.26	14.46 ^a ± 0.16	2.43 ^a ± 0.10	0.43 ^a ± 0.05	0.34 ^{bc} ± 0.07	8.50 ^a ± 0.59	3.12 ^b ± 0.88	0.03 ^d ± 0.00	0.32 ^{bc} ± 0.02	0.78 ^b ± 0.01	41.76 ^d ± 1.05
	FP	40.00 ^{cd} ± 0.93	42.01 ^a ± 1.52	9.46 ^c ± 0.02	60.23 ^b ± 1.38	15.65 ^a ± 0.30	3.55 ^{bc} ± 0.23	0.37 ^a ± 0.15	1.47 ^d ± 0.10	3.62 ^a ± 0.99	7.28 ^c ± 0.44	0.03 ^d ± 0.00	0.26 ^c ± 0.01	0.63 ^a ± 0.01	32.35 ^c ± 4.61

Supplementary data 2. Pearson table showing positive (light grey) or negative (dark grey) correlations between the different analyzed parameters (all data included in the table are significant at $p < 0.01$).



Acknowledgements

This work has been funded by the Ministry of Economy and Competitiveness through project AGL2015-64512R.

References

- Albrecht, R., Le Petit, J., Calvert, V., Terrom, G., Périssol, C., 2010. Changes in the level of alkaline and acid phosphatase activities during green wastes and sewage sludge co-composting. *Bioresour. Technol.* 101(1), 228-233. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.08.017>.
- Albuquerque, J.A., De La Fuente, C., Bernal, M.P., 2011. Improvement of soil quality after “alperujo” compost application to two contaminated soils characterised by differing heavy metal solubility. *J. Environ. Manag.* 92(3), 733-741. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2010.10.018>.

3. Ameen, A., Ahmad, J., Raza, S., 2016. Effect of pH and moisture content on composting of Municipal solid waste. *Int. J. Sci. Res. Publ.* 6(5), 35-37. <https://doi.org/10.1051/e3sconf/20183402019>.
4. Andualema, B., Gessesse, A., 2012. Microbial lipases and their industrial applications. *Biotechnology*, 11(3), 100-118. <https://doi.org/10.3923/biotech.2012.100.118>.
5. Ayed, L.B., Hassen, A., Jedidi, N., Saidi, N., Bouzaine, O., Murano, F., 2007. Microbial C and N dynamics during composting process of urban solid waste. *Waste Manage. Res.* 25, 24-29. <https://doi.org/10.1177/0734242X07073783>.
6. Bao, Y., Zhou, Q., Guan, L., 2008. Allantoin-N concentration changes and analysis of the influencing factors on its changes during different manure composting. *Bioresour. Technol.* 99, 8759-8764. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2008.04.037>.
7. Barrena, R., Vázquez, F., Sánchez, A., 2008. Dehydrogenase activity as a method for monitoring the composting process. *Bioresour. Technol.* 99, 905-908. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2007.01.027>.
8. Bernal, M.P., Paredes, C., Sánchez-Monedero, M.A., Cegarra, J., 1998. Maturity and stability parameters of composts prepared with a wide range of organic wastes. *Bioresour. Technol.* 63(1), 91-99. [https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(97\)00084-9](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(97)00084-9).
9. Bremner, J.M., Mulvaney, R.L., 1978. Urease activity in soils. In: Burns, R.G. (Ed.), *Soil Enzymes*. Academic Press, London, UK, pp. 150-196.
- BOE-A-2017-14332, 2017. Real Decreto 999/2017: Spanish Regulation on fertilizers products.
10. Cayuela, M.L., Sanchez-Monedero, M.A., Roig, A., 2006. Evaluation of two different aeration systems for composting two-phase olive mill wastes. *Process Biochem.* 41, 616-623. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2005.08.007>.
11. Cesaro, A., Conte, A., Belgiorno, V., Siciliano, A., Guida, M., 2019. The evolution of compost stability and maturity during the full-scale treatment of the organic fraction of municipal solid waste. *J. Environ. Manage.* 232, 264-270. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2018.10.121>.
12. Cunha-Queda, A.C., Ribeiro, H.M., Ramos, A., Cabral, F., 2007. Study of biochemical and microbiological parameters during composting of pine and eucalyptus bark. *Bioresour. Technol.* 98(17), 3213-3220. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2006.07.006>.

13. EPA (Environmental Protection Agency, USA), 2003. Environmental regulations and technology. Control of pathogens and vector attraction in sewage sludge. EPA625-R-92-013.
14. 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. *J. Environ. Manage.* 248, 109312. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2019.109312>.
15. EU Waste Law, 2018. Directive (EU) 2018/851 of the European Parliament and of the Council, of 30 May 2018, amending Directive 2008/98 on waste.
16. Farnet, A.M., Qasemian, L., Goujard, L., Gil, G., Guiral, D., Ruaudel, F., Ferre, E., 2010. A modified method based on p-nitrophenol assay to quantify hydrolysis activities of lipases in litters. *Soil Biol. Biochem.* 42, 386-389. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2009.11.015>.
17. Geissdoerfer, M., Savaget, P., Bocken, N.M., Hultink, E.J., 2017. The Circular Economy—A new sustainability paradigm? *J. Clean. Prod.* 143, 757-768. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2016.12.048>.
18. Guardia, A.D., Mallard, P., Teglia, C., Marin, A., Le Pape, C., Launay, M., Benoist, J.C., Petiot, C., 2010. Comparison of five organic wastes regarding their behaviour during composting: part 2, nitrogen dynamic. *Waste Manage.* 30(3), 415-425.
19. Guo, R., Li, G.X., Jiang, T., Schuchardt, F., Chen, T.B., Zhao, Y.Q., Shen, Y.J., 2012. Effect of aeration rate, C/N ratio and moisture content on the stability and maturity of compost. *Bioresour. Technol.* 112, 171-178. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.02.099>.
20. Herber, D., Phipps, P., Stronoe, R., 1971. Chemical Analysis of Microbial Cells. In: Norris, J., Ribbons, D. (Eds.), *Methods in Microbiology*. Academy Press, New York. USA.
21. Iglesias-Jiménez, E., Barral, M.T., Marhuenda, F.C., 2008. Indicadores de la estabilidad y madurez del compost. In: Moreno, J., Moral, R. (Eds.), *Compostaje*. Mundi-Prensa, Madrid, Spain, pp. 243-283.
22. Jolanun, B., Towprayoon, S., 2010. Novel bulking agent from clay residue for food waste composting. *Bioresour. Technol.* 101(12), 4484-4490. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.01.116>.
23. Jones, D.L., Shannon, D., Murphy, D.V., Farrar, J., 2004. Role of dissolved organic nitrogen (DON) in soil N cycling in grassland soils. *Soil Biol. Biochem.* 36, 749-756. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2004.01.003>.

24. Jurado, M.M., Suárez-Estrella, F., Vargas-García, M.C., López, M.J., López-González, J.A., Moreno, J., 2014. Evolution of enzymatic activities and carbon fractions throughout composting of plant waste. *J. Environ. Manage.* 133, 355-364. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2013.12.020>.
25. Ladd, J.N., Butler, J.H.A., 1972. Short-term assays of soil proteolytic enzyme activities using proteins and dipeptide derivatives as substrates. *Soil Biol. Biochem.* 4, 19-30. [https://doi.org/10.1016/0038-0717\(72\)90038-7](https://doi.org/10.1016/0038-0717(72)90038-7).
26. Linhardt, K., Walter, K., 1965. Phosphatases (phosphomonoesterases). In: Bergmeyer, H.U., *Methods of enzymatic analysis*. Academic Press, New York, pp. 779-787. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-395630-9.50142-0>.
27. Liu, D., Zhang, R., Wu, H., Xu, D., Tang, Z., Yu, G., Xu, Z., Shen, Q., 2011. Changes in biochemical and microbiological parameters during the period of rapid composting of dairy manure with rice chaff. *Bioresour. Technol.* 102(19), 9040-9049. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.07.052>.
28. López-González, J.A., López, M.J., Vargas-García, M.C., Suárez-Estrella, F., Jurado, M.M., Moreno, J., 2013. Tracking organic matter and microbiota dynamics during the stages of lignocellulosic waste composting. *Bioresour. Technol.* 146, 574-584. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.07.122>.
29. Malinauskaite, J., Jouhara, H., Czajczyńska, D., Stanchev, P., Katsou, E., Rostkowski, P., Thorne, R.J., Colon, J., Ponsá, S., Al-Mansour, F., Anguilano, L., Krzyzyska, R., López, I.C., Vlasopoulos, A., Spencer, N., 2017. Municipal solid waste management and waste-to-energy in the context of a circular economy and energy recycling in Europe. *Energy* 141, 2013-2044. <https://doi.org/10.1016/j.energy.2017.11.128>.
30. Marklein, A.R., Houlton, B.Z., 2012. Nitrogen inputs accelerate phosphorus cycling rates across a wide variety of terrestrial ecosystems. *New Phytol.* 193(3), 696-704. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2011.03967.x>.
31. Mondini, C., Fornasier, F., Sinicco, T., 2004. Enzymatic activity as a parameter for the characterization of the composting process. *Soil Biol. Biochem.* 36, 1587-1594. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2004.07.008>.
32. Onwosi, C.O., Igbokwe, V.C., Odimba, J.N., Eke, I.E., Nwankwoala, M.O., Iroh, I.N., Ezeogu, L.I., 2017. Composting technology in waste stabilization: on the methods, challenges and future prospects. *J. Environ. Manage.* 190, 140-157. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2016.12.051>.

33. Sánchez-García, M., Albuquerque, J.A., Sánchez-Monedero, M.A., Roig, A., Cayuela, M.L., 2015. Biochar accelerates organic matter degradation and enhances N mineralisation during composting of poultry manure without a relevant impact on gas emissions. *Bioresour. Technol.* 192, 272-279. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.05.003>.

34. Sánchez-Monedero, M.A., Roig, A., Paredes, C., Bernal, M.P., 2001. Nitrogen transformation during organic waste composting by the Rutgers system and its effects on pH, EC and maturity of the composting mixtures. *Bioresour. Technol.* 78, 301-308. [https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(01\)00031-1](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(01)00031-1).

35. Sepehri, A., Sarrafzadeh, M. H. 2018. Effect of nitrifiers community on fouling mitigation and nitrification efficiency in a membrane bioreactor. *Chemical Engineering and Processing-Process Intensification*, 128, 10-18. [Hyyps://doi.org/10.1016j.cep.2018.04.006](https://doi.org/10.1016/j.cep.2018.04.006).

36. Song, U., Lee, E. J. 2010. Environmental and economical assessment of sewage sludge compost application on soil and plants in a landfill. *Resources, Conservation and Recycling*, 54(12), 1109-1116. <https://doi.org/10.1016/j.resconrec.2010.03.005>.

37. Sudkolai, S.T., Nourbakhsh, F., 2017. Urease activity as an index for assessing the maturity of cow manure and wheat residue vermicomposts. *Waste Manage.* 64, 63-66. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2017.03.011>.

38. Tabatabai, M.A., Bremner, J.M., 1969. Use of p-nitrophenyl phosphate in assay of soil phosphatase activity. *Soil Biol. Biochem.* 1, 301-307. [https://doi.org/10.1016/0038-0717\(69\)90012-1](https://doi.org/10.1016/0038-0717(69)90012-1).

39. Tognetti, C., Mazzarino, M. J., Laos, F., 2007. Improving the quality of municipal organic waste compost. *Bioresour. Technol.* 98(5), 1067-1076. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2006.04.025>.

40. USCC, 2001. Test methods for the examination of composting and compost, Second edition. U.S. Composting Council, Bethesda, MD. USA

41. Vargas-García, M.C., Suárez-Estrella, F., López, M.J., Moreno, J., 2010. Microbial population dynamics and enzyme activities in composting processes with different starting materials. *Waste Manage.* 30(5), 771-778. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2009.12.019>.

42. Yadav, A., Garg, V.K., 2011. Recycling of organic wastes by employing *Eisenia fetida*. *Bioresour. Technol.* 102(3), 2874-2880. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.10.083>.

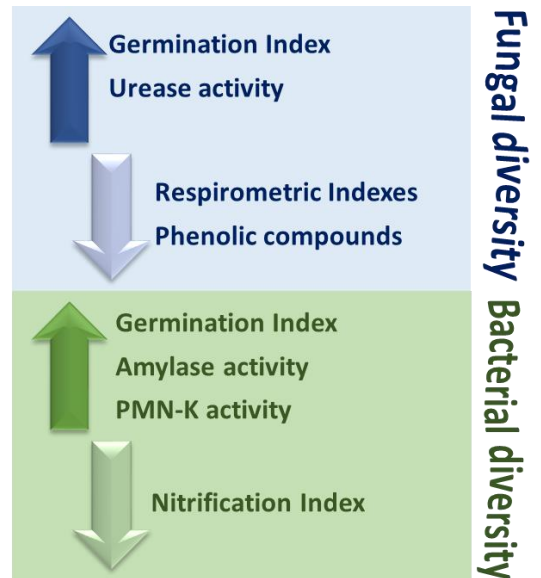
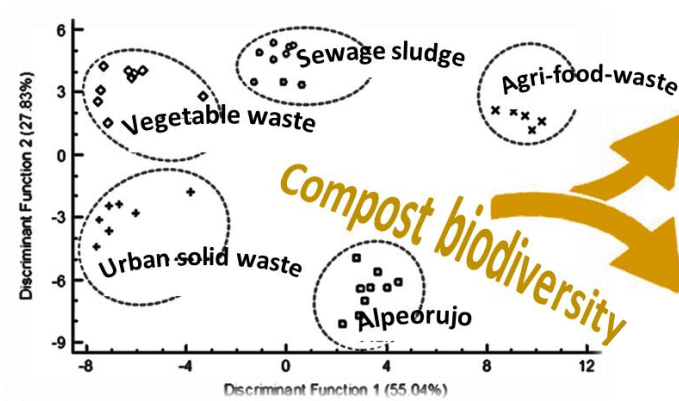
43. Wang, S., Zeng, Y., 2017. Ammonia emission mitigation in food waste composting: a review. *Bioresour. Technol.* 248, 13-19. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.07.050>.

44. Wei, Y., Wu, D., Wie, D., Zhao, Y., Wu, J., Xie, X., Zhang, R., Wei, Z., 2019. Improved lignocellulose-degrading performance during Straw composting from diverse sources with actinomycetes inoculation by regulation the key enzyme activities. *Bioresour. Technol.* 271, 66-74. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.09.081>.

45. Zhang, L., Sun, X., 2016. Influence of bulking agents on physical, chemical, and microbiological properties during the two-stage composting of green waste. *Waste Manage.* 48, 115-126. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2015.11.032>.

46. Zhu, L., Yang, H., Zhao, Y., Kang, K., Liu, Y., He, P., ... & Wei, Z. (2019). Biochar combined with montmorillonite amendments increase bioavailable organic nitrogen and reduce nitrogen loss during composting. *Bioresour. Technol.* 294, 122224. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.01.22224>.

GRAPHICAL ABSTRACT



ARTÍCULO 3

ARTÍCULO III

Uncovering new indicators to predict stability, maturity and biodiversity of compost on an industrial scale.

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.

Publicado en Bioresource Technology (2020), 313, 123557.

Resumen: Actualmente, el estudio metagenómico del proceso de compostaje ha cobrado gran importancia, ya que ha permitido identificar la existencia de microorganismos que, hasta ahora, no habían sido aislados durante el proceso mediante técnicas tradicionales, solo del 1 al 10% de los microorganismos son cultivables. Sin embargo, todavía es complejo determinar qué bioindicadores podrían revelar el grado de madurez y estabilidad de un compost particular. Tradicionalmente, la caracterización fisicoquímica y enzimática del proceso de compostaje ha servido de base para evaluar la estabilidad y el grado de maduración del compost. La evolución de varios parámetros, como la relación C/N, relación húmicos/fúlvicos, relación amonio/nitrato, índice de germinación, consumo de oxígeno (AT₄ o DRI₂₄), así como las actividades de deshidrogenasa, glucosidasa, fosfatasa, esterasa, proteasa o ureasa, se han tenido tradicionalmente en cuenta al establecer el grado de estabilidad y madurez de un compost particular. De este modo, el objetivo principal de este trabajo fue demostrar la posible correlación entre los parámetros tradicionales de madurez y estabilidad del compost, con otros indicadores de biodiversidad en productos altamente heterogéneos procedentes de procesos de compostaje a escala industrial. Los resultados demostraron la enorme influencia de las materias primas en la caracterización de los productos obtenidos. Aun así, se establecieron relaciones importantes entre los índices Chao1 y Shannon, y ciertos parámetros relacionados con la madurez, estabilidad y toxicidad de las muestras, así como el índice de nitrificación, la tasa de humificación, el contenido fenólico, el índice de germinación o el consumo de oxígeno.

Uncovering new indicators to predict stability, maturity and biodiversity of compost on an industrial scale.

Estrella-González, M.J.^a, Suárez-Estrella, F.^{*a}, Jurado, M.M.^a, López, M.J.^a, López-González, J.A.^a, Siles-Castellano, A.B.^a, Muñoz-Mérida, A.^b and Moreno, J.^a

^aDepartment of Biology and Geology, CITE II-B, University of Almería, Agrifood Campus of International Excellence, ceiA3, 04120, CIAIMBITAL, Almería (Spain).

^bCIBIO-InBIO, Universidade do Porto, Campus de Vairão, Rua Padre Armando Quintas, 4485-661 Vairão (Portugal).

*Corresponding author: Phone: +34 950015307; Fax: +34950015476; e-mail: fsuarez@ual.es (F. Suárez-Estrella)

Abstract

Currently, the metagenomic study of the composting process has gained great importance since it has allowed the identification of the existence of microorganisms that, until now, had not been isolated during the process by traditional techniques. However, it is still complex to determine which bioindicators could reveal the degree of maturity and stability of a particular compost. Thereby, the main objective of this work was to demonstrate the possible correlation between traditional parameters of maturity and stability of compost, with other indicators of biodiversity in products highly heterogeneous from composting processes on an industrial scale.

The results demonstrated the enormous influence of the raw materials in characterizing the products obtained. Even so, important relationships were established between the Chao1 and Shannon indexes, and certain parameters related to the maturity, stability and toxicity of the samples, such as nitrification index, humification rate, phenolic content, germination index or oxygen consumption.

Keywords

Industrial compost; biodiversity; stability; maturation; respirometric index

Highlights

Heterogeneity of composting process hinders the establishment of bioindicators

Biodiversity and respirometric index affect phytostimulant power of compost

Phenolic content and nitrification index could impact compost biodiversity

Compost biodiversity is greater the lower the activity of xylanase

Different raw materials evolve similar products by different biostrategies

1. Introduction

Composting is an aerobic biotransformation process of organic matter, which occurs under controlled conditions of humidity, temperature and aeration. In recent years, due to environmental problems related to the generation and accumulation of anthropogenic wastes, composting has become an effective, ecological and sustainable alternative, aimed at the re-valorization of organic waste of enormous agronomic value (Tittarelli et al., 2002; Onwosi et al., 2017).

Some authors have reported that the proper transformation of organic matter and the quality of the final compost depends on the qualitative and quantitative composition of microorganisms associated with composted materials (Pepe et al., 2013). However, deep knowledge of the microorganisms that form a compost pile is not an easy task because of culture medium limitations (Chandna et al., 2013).

Traditionally, physicochemical and enzymatic characterization of composting process have served as a basis for assessing the stability and the degree of compost maturation. The evolution of several parameters, such as the C/N ratio, humic/fulvic ratio (Iglesias-Jiménez and Pérez-García, 1992), ammonium/nitrate ratio (Bernal et al., 1998), germination index (Emino and Warman 2004), oxygen consumption (AT_4 or DRI_{24}) (Barrena-Gómez et al., 2006), as well as dehydrogenase, glucosidase, phosphatase, esterases, protease or urease activities (Tiquia, 2002), have been traditionally taken into account when establishing the degree of stability and maturity of a particular compost.

Metagenomic study of the composting process has gained great importance since it has allowed us to know the existence of microorganisms that until now had not been isolated in this process through traditional techniques. In the last decades, several works have correlated the succession of microorganisms, organic matter degradation, and functions of microorganisms during composting processes using genomic sequencing, and phylogenetic analyses of microbial communities (Langarica-Fuentes et al., 2014, 2015; Wang et al., 2018). However, no previous research has attempted to determine which biodiversity microbial indicators reveal both a successful composting and an optimal-stabilized and mature compost.

Given the problem raised above, the main objectives of this work were (i) to characterize the products derived from 15 composting processes on an industrial scale from different anthropogenic organic wastes from a physical-chemical and enzymatic point of view; (ii) to demonstrate the relationship between physicochemical and enzymatic parameters, and microbial bioindicators (Shannon and Chao1); and (iii) to

determine the influence of raw materials on the biodiversity degree of compost on an industrial scale and the potential relation between stability, maturity and biodiversity.

2. Material and methods

2.1. Sampling strategy

Samples were taken from 15 companies dedicated to the composting of different raw materials. The main criteria to select those companies was the starting materials used. So, 15 full-scale composting facilities operating in the Southeast of Spain were contacted. The entire sampling process took place in one day in facilities working in continuous, i.e. Vegetable Waste (VW), Urban Solid Waste (USW) and Sewage Sludge (SS). In the case of Agri-food Waste (AW) and Olive Mill Waste or “Alpeorujo” (ALP) facilities, due to the seasonality of the raw material, sampling was performed when the specific composting phases were reached

A total amount of 45 samples (5 input wastes, three facilities per waste and one composting phase for each) were collected from November 2016 to November 2017. During each stage, a sample of nine different locations (300 g of each site) was taken, so that all possible areas were covered. These samples were mixed to obtain a representative and homogeneous sample (approximately 3 kg). For analytics, each sample was divided into three parts. In the case of USW samples, all inappropriate materials (plastic, glass, metal, etc.) were removed manually. After this, samples were crushed in a food processor (Moulinex Cousine Companion HF800A13) and then immediately stored in vacuum bags and frozen at -20 °C. They were defrost at room temperature for 24 h before analysis.

All analyses were performed in triplicate.

2.2. Monitoring parameters

To test the quality of the compost samples, four basic physical-chemical parameters were analyzed based on Spanish current legislation (BOE 999/17). Moisture (M) was determined by drying at 105 °C for 24 h. OM content was evaluated by determining the weight loss by ignition at 550 °C. Total nitrogen (TN) and total carbon (TC) were determined in solid dry samples by combustion at 950 °C using a LecoTruSpec C-N elemental analyzer (Leco Co., St. Joseph, MI, USA), and then C/N Ratio was calculated. Temperatures reached in the thermophilic phase was measure on-site by a long-handled (50 cm) PT100 probe. The thermophilic temperature data was provided by the 15 collaborating companies, when thermal peaks were reached in the biooxidative phase of each composting process.

2.3. Maturity parameters

Humic fractions were obtained by the modified method of Cavani et al. (2003). 2 g of sample were incubated 48 h at 65 °C and 120 rpm with 100 mL of 0.1 M NaOH and 0.1 M Na₄P₂O₇ x 10 H₂O in a thermostatic water bath. The extracts were centrifuged 10 min at 10,000 rpm, and then the supernatant filtered using a 0.8 mm cellulose acetate filter (standard MF-Millipore membrane, EMD Millipore Corporation, Billerica, MA, USA, 2013). This filtered solution constituted the total extractable carbon. Fractioning methodology of Ciavatta et al. (1990) was applied to separate humic (C_{HA}) and fulvic (C_{FA}) acids through polyvinylpyrrolidone. Total organic carbon from all fractions was analyzed by combustion in a TOC analyzer (TOC-VCSN, Shimadzu, Japan). The Humification Rate was calculated:

$$HR = ((C_{HA} + C_{FA}) / TC) \times 100$$

where:

C_{HA}: Organic carbon from humic acids (%)

C_{FA}: Organic carbon from fulvic acids (%)

TC: Total Carbon (%)

Samples were diluted 1:5 in distilled water to evaluate nitrate content (N-NO₃⁻). Suspensions were incubated for 10 min at 20 rpm. After the incubation period, the samples were filtered under vacuum. The resulting extracts were used for nitrate measurement using the system Nitracheck 404. On the other hand, to evaluate ammonium content (N-NH₄⁺), fresh samples were diluted 1:10 in distilled water. Suspensions were incubated and filtered under the same conditions above cited. 0.1 M MgSO₄ was added to the supernatant in a 1:10 ratio. The ammonium concentration was measured using a reference electrode (Reference no. 5044, HACH, Loveland, Colorado, USA) and an ammonium ion-selective electrode (Reference no. HI4101, HACH, Loveland, Colorado, USA). Nitrification Index was expressed as the relation between ammonium / nitrate content (Bernal et al., 1998).

2.4. Stability parameters

Phenolic acids were extracted in sodium pyrophosphate (Na₄P₂O₇) following the method described by Morita (1980) and quantified as previously described by Marambe and Ando (1990). It was measured at a wavelength of 725 nm in a multiwell spectrophotometer (Eon-Biotek).

According to Zucconi et al. (1981), phytotoxicity tests were performed using watercress seeds (*Lepidum sativum* L.). Compost was mixed with water to reach a moisture content equivalent to 65%. After 30 min, a 10% aqueous extract was obtained and filtered through a 0.45 mm pore size membrane. Four mL of the filtrate were added to square Petri dishes (12 x 12 cm) with 25 seeds of *L. sativum* located on a sheet of filter paper as a support. Four replicates were used for each sample providing a total of 100 seeds. The same procedure was performed using distilled water instead of compost extracts (control seeds). Plates were placed in a growth chamber at 25 °C for 48 h in the dark. After this period, germination percentage and root lengthening were measured, and finally, Germination Index (GI) calculated based on the following formula:

$$GI = ((G\% \times L) / (G_c\% \times L_c)) \times 100$$

where:

G%: Germination percentage from seeds exposed to compost extracts

L: mean of root lengthening from seeds exposed to compost extracts

G_c%: Germination percentage from control seeds exposed to distilled water

L_c: mean of root lengthening from control sample exposed to distilled water

To analyze the biodegradability of the samples, a modified methodology describes by Barrena et al. (2009) and Ponsá et al. (2010) was applied. 100 g of each compost was placed in a reactor after adjusting the humidity to 50%. Each reactor consisted of a PVC container (30 cm x 10 cm), at whose base a 2 mm diameter pore metal net was arranged to support the material and to provide an air distribution chamber. This system was continuously submerged in a water bath at 37 °C. Airflow in the reactors was adjusted by means of an air flow controller (Bronkhorst Hitec, The Netherlands). Air was passed through a humidifier at the same temperature of the reactor to avoid water losses and moisture changes. Exhaust air from the reactors was sent to an oxygen sensor (Alphasense Ltd., Essex. CM77 7AA UK) prior dehumidification in a water trap. Biodegradability of the samples was evaluated by measuring the total oxygen consumed throughout 4 days after overcoming the delay lag phase (AT₄) (Adani et al., 2001). Results were expressed as g O₂ Kg⁻¹ MO h⁻¹.

2.5. Enzymatic parameters

β-glucosidase (GLUC), lipase (LIP) and phosphomonoesterase (PMN-K) activities were estimated by a colorimetric method at a 400 nm wavelength in an Eon-Biotek multiwell spectrophotometer. Method described by Tabatabai (1982) was used to determine β-glucosidase activity, by measuring p-nitrophenol released from p-

nitrophenyl- β -D-glucopyranoside hydrolyzed for 1 h at 37 °C. Lipase activity was estimated by the method described by Farnet et al. (2010). In this case p-nitrophenyl laureate was hydrolyzed for 2 h at 30 °C releasing p-nitrophenol. Protocol to determine alkaline phosphomonoesterase activity was described by Tabatai and Bremmer (1969), in which p-nitrophenyl- β -D-glucopyranoside was hydrolyzed for 1 h at 37 °C releasing nitrophenyl phosphate.

Determination of cellulose (CEL), amylase (AMY) and xylanase (XYL) activities were based on the colorimetric estimation of glucose released at a 550 nm wavelength in a 96-well multiplate (Eon-Biotek). To detect cellulase activity, samples were incubated during 2 h at 37 °C in presence of substrate (1% carboxy methyl cellulose in 50 mM sodium acetate buffer, pH 5), as described Libmond and Savoie (1993); in the case of amyolytic activity the reaction lasted 24 h at 35 °C in presence of substrate (1% soluble starch in 0.5 M phosphate buffer, pH 5.5), according to the method of Mishra et al. (1979). Xylanolytic activity was determined at 30 °C for 30 min in presence of substrate (1% xylan solution in 50 mM citrate-phosphate buffer, pH 6.5) following the method described by He et al. (1993).

Ureolytic (URE) activity was measured following the method described by Bremner and Mulvaney (1978). 2 g of sample was incubated during 1 h at 37 °C in a solution of sodium hypochlorite and phenol with sodium nitroprusside as catalyst. The released ammonia was determined by measuring the chromogenic complex formed at 640 nm wavelength. In the case of protease activity (PRO), the method of Ladd and Butler (1972) was applied. 1g of sample was incubated in sodium caseinate during 1 h at 37 °C. After reaction with the Folin Ciocalteu reagent, colorimetric estimation was performed at 700 nm in a 96-well multiplate.

2.6. Library preparation and sequencing.

DNA extraction was performed with the DNA isolation kit DNeasy PowerSoil (Qiagen). A total of 45 samples corresponding to 15 treatment plants were processed x 1 samples x 3 repetitions. Bacterial DNA for sequencing was amplified by PCR, using primers Bakt 341F and Bakt 805R, by Supreme NZYTAq 2x Green Master Mix (NZYTech) and with the following cycle conditions: 5 min at 95 °C, continued for 25 cycles from 30 s to 95 °C, 30 s to 50 °C, 30 s to 72 °C, and a final step of 10 min at 72 °C. Secondary amplification was performed to link the index sequences that were required to multiplex different libraries. It was performed with identical conditions, but only 5 cycles and 60 °C as annealing temperature.

For the preparation of the fungal library, a fragment of the ITS2 fungal region of approximately 300 bp was amplified using the ITS86F primers and ITS4 of Supreme

NZYTaq 2x Green Master Mix (NZYTech) and with the following cycle conditions: 5 min at 95 °C, continued for 35 cycles 30 s at 95 °C, 30 s at 47 °C, 30 s at 72 °C, and a final step of 10 min at 72 °C.

In both cases, a secondary amplification was made to join the index sequences which were required for multiplexing different libraries. It was carried out with identical conditions, but only 5 cycles and 60 °C as annealing temperature. Negative controls were included in primary and secondary amplifications using ultrapure water and the purified PCR product from the primary amplification, respectively.

The library products previously obtained were processed in agarose gels stained with GreenSafe (NZYTech) to confirm the absence of nonspecific amplification and verify the size of the library. Then, these products were purified using Mag-Bind RXNPure Plus magnetic beads (Omega Biotek). The final DNA concentration per sample was measured with a Qubit dsDNA HSAssay assay (Thermo Fisher Scientific). Samples were mixed in equimolar amounts and sequencing was performed in a MiSeq PE300 run (Illumina) in AllGenetics & Biology SL (La Coruña, Spain).

2.6.1. Metagenomic data and biodiversity indicators

The raw data set were separated based on the sample-specific barcodes and deleted the indices and sequencing primers. The quality of the demultiplexed FASTQ files was verified by FastQC software. Paired-end assembly of the R1 and R2 reads was performed with FLASH. CUTADAPT software 1.3 was used to eliminate sequences below 300 nt which did not contain the PCR.

Data files were analyzed using “Quantitative Insights into Microbial Ecology” (QIIME) v1.9.0 software (Caporaso et al. 2010). Low abundance of OTUs (below 0.5%) of each sample was removed to correct the index jumping phenomenon.

The sequences were taxonomically assigned using the open-reference approach in QIIME. The OTU picking was run using the Silva_128 Database for bacteria and Unite for fungi. Each OTU was assigned to a microbial taxon using the UCLUST algorithm with a confidence threshold of 97%. Singletons and OTUs with less abundance were excluded from the analysis. Low abundance of OTUs (below 0.05%) of each sample was removed to correct the index jumping phenomenon. Alpha diversity index was calculated from rarefied samples, using Shannon index for diversity and Chao1 index for richness.

2.7. Statistical analyses

Physico-chemical and enzymatic data obtained were subjected to statistical analysis using Statgraphics Centurion XVIII.I (StatPoint Technologies Inc., Virginia, USA). Analysis of variance (ANOVA) was performed to compare mean values for the factors analyzed

(Raw materials and Facilities) ($p < 0.05$). A Discriminant Analysis was used to assess the adequacy of the classification of the samples in groups of raw materials on the basis of physico-chemical and enzymatic variables. Relations among the different physical-chemical and enzymatic parameters were analyzed using principal component analyses, while correlations between those and biodiversity indexes were established by Pearson test at 95% confidence level.

2.8. Data availability

Sequences are stored in the MG-RAST public repository, available by Accession Number mgp94523. The whole datasets generated and analyzed during the current study are available from the corresponding author on reasonable request.

3. Results and Discussion

3.1. Physico-chemical parameters: maturity, stability and toxicity

Concerning the products obtained from the 15 composting processes surveilled in this work, Table 1 shows the main physical-chemical parameters analyzed to determine maturation level of samples. It should be noted that all the compost analyzed derived from composting processes in which a sufficient sanitation temperature was reached during thermophilic phase. The average of thermophilic temperature for each installation complied with the recommendations of the Environmental Protection Agency (EPA, 2003). The highest average temperature was reached in the process performed from plant waste (VW) (60-70 °C). In the rest of the composting facilities, the average temperature in the thermophilic phase ranged around 50 °C.

Both moisture, C/N Ratio and OM are parameters included in the Spanish regulation (BOE 999/17) to determine basic quality compost. According to this regulation, in general, a compost suitable for use must have less than 40% humidity, a C/N Ratio less than 15-20 and an OM percentage greater than 35%. In accordance with these criteria, all the compost analyzed in this work met the basic quality parameters, with some exceptions indicated below. The USW3 and ALP3 products showed higher humidity values than expected (50.95 and 52.68%, respectively). Only the SS2 sample showed values below 35% organic matter (26.09%), while USW3 was the only compost that showed a C/N Ratio higher than 20 (data not shown).

When the products were analyzed statistically according to the nature of raw materials, the results revealed a greater homogeneity of the samples (Table 1). Therefore, no significant differences were observed in terms of moisture and organic matter content, although the USW and ALP compost stood out in relation to the C/N

Ratio, which could be due to the characteristics of the original materials, or even to the hasty completion of composting processes.

Table 1. Monitoring and maturation parameters. Moisture (M), Organic Matter (OM), C/N ratio, C_{HA}/C_{FA} Ratio, Humification Ratio (HR) and Nitrification Index in final compost from 5 types of organic waste. Values followed by same letters are not significantly different ($P < 0.05$) according to Fisher's LSD test. Vegetable Waste (VW), Urban Solid Waste (USW), Sewage Sludge (SS), Agro Waste (AW) and "Alpeorujo" (ALP).

Organic Waste	Moisture (%)	Organic Matter (%)	C/N Ratio	C_{HA}/C_{FA}	HR	Nitrification Index
VW	28.74 ^{ab}	50.45 ^{ab}	12.24 ^a	0.97 ^{ab}	14.90 ^b	0.36 ^{ab}
USW	22.64 ^a	51.87 ^{ab}	16.62 ^b	1.30 ^b	7.96 ^a	0.43 ^b
SS	31.84 ^{ab}	41.15 ^a	10.92 ^a	1.40 ^{bc}	12.57 ^b	0.80 ^c
AW	40.43 ^b	58.42 ^b	11.83 ^a	0.71 ^a	11.67 ^{ab}	0.30 ^{ab}
ALP	40.85 ^b	58.20 ^b	17.22 ^b	1.85 ^c	10.66 ^{ab}	0.12 ^a

In addition to the parameters included in BOE 999/17 (humidity, organic matter and C/N Ratio), other parameters affecting the quality of final product have been studied. Stabilization and humification of composted material occurs during the maturation phase of the process. In order to be useful in agriculture, the product obtained must show low toxicity and high humification level (Jurado et al., 2015).

The humification process could be reflected through the C_{HA}/C_{FA} ratio, which has traditionally been proposed as an important indicator of compost stability (Iglesias-Jiménez et al., 2008). C_{HA} are derived mainly from organic materials with a higher maturity level, in contrast to C_{FA} , which predominate in more immature materials (Martínez-Salgado et al., 2019). According to Iglesias-Jiménez et al. (2008), C_{HA}/C_{FA} values greater than 1 indicate that a proper humification process is occurring, while C_{HA}/C_{FA} values greater than 1.6 indicate that product is already mature. Additionally, Humification Rate (HR) is considered an important indicator of the formation of humic substances during composting, since it can be established with precision if the humification has been carried out successfully (Tittarelli et al., 2002). According to Roletto et al. (1985) the minimum value of HR for a mature compost should be 7.

Based on the results shown in Table 1, the compost obtained from ALP showed the highest C_{HA}/C_{FA} ratio (1.85), followed by the compost made from USW (1.30) and SS (1.40). However, when the total humic content was calculated in relation to total carbon (Humification Rate, RT), the highest values corresponded to materials made of VW and SS

(14.90 and 12.57, respectively) although no real significant differences were observed depending on the raw materials.

On the other hand, some authors consider that compost maturity is related to the ratio between N-NH_4^+ and N-NO_3^- (Nitrification Index) (Bernal et al., 1998; Onwosi et al., 2017). The classification of the compost according to this parameter is carried out based on some guidance values: fully mature compost (less than 0.5), mature compost (between 0.5 and 3.0) and immature product (greater than 3.0). Based on this classification, none of the compost analyzed could be considered immature, although a different degree of maturity could be established (Table 1). Thus, while compost from ALP was considered statistically more mature (0.12), the product obtained from SS was considered the least mature (0.8) (based on Nitrification Index).

In addition to maturity level, in order to establish quality compost some authors consider of great relevancy several parameters of biological stability and phytotoxicity (Adani et al., 2001; Barrena et al., 2006, 2009; Cesaro et al., 2019). In this sense, compost could be classified on the basis of Germination Index (GI). GI values less than 50% are considered a sign of phytotoxicity and immaturity. Phytotoxicity level is considered moderate when GI is around 50-80%, while a compost could be considered non phytotoxic and mature when GI is between 80-100%. GI values higher than 100% are signs of phytostimulant effect in compost. On the other hand, the accumulated oxygen consumption during 4 days (AT_4) could be taken into account as an adequate stability parameter directly related to the microbial activity inside the composting piles. Excessively high AT_4 values could influence the toxic nature of the samples and adversely affect the GI. This effect has also been described when the content in phenolic compounds is too high (Said-Pullicino et al., 2007).

Based on the results shown in Figure 1a, 1b and 1c, the most phytotoxic compost was those obtained from VW and USW (average GI less than 50%). Compost from SS and ALP were considered as mature showing GI average values between 80-100%, while the best phytostimulant effect was reported in the case of AW-based compost (GI average higher than 100%). In general terms, the best GI values (SS, AW and ALP) matched with the lowest average of phenolic compounds content and AT_4 values. However, in view of the results obtained in this work, this last correlation is not clear and it could be influenced by other different factors such as the content of organic acids, volatile compounds, heavy metals, salts, as well as the differences in the chemical structure or the hydrophobic character of the different phenolic compounds present in the samples (Barral and Paradelo, 2011; Pinho et al., 2017).

3.2 Enzymatic characterization of the final products

The great influence of the starting materials could affect the standardization of the enzymatic activity at the end of composting process (Jurado et al., 2014; Estrella-González et al., 2019).

In this work, enzymatic characterization of the samples was very different depending on the raw material and the enzymatic activity analyzed in each case. In general terms, enzymatic activity observed in the sewage sludge samples (SS) was comparatively lower than that observed in the rest of the compost (Fig. 2a, 2b and 2d). However, the same did not happen in the case of urease activity (Fig. 2c), since, in this case, the highest activity values were detected in the SS compost. As expected, GLUC, CEL, XYL and AMY activities stood out in the samples composed of an important plant fraction. This was the case of the VW, AW and ALP compost (Fig. 2a and 2b). LIP activity was more notable in the case of samples from “alpeorujo” (ALP), which was directly related to the composition of the starting mixtures (Fig. 2d). Otherwise, PMN-K activity was higher in the case of the USW and AW samples (Fig. 2d), while PRO activity stood out in the samples made from USW (Fig. 2c).

The differences observed in relation to the different enzymatic activities analyzed could be due not only to the nature of the materials but also to the duration of the processes. In this sense, one of the main problems related to composting on an industrial scale is the heterogeneity of the treatments and the maturity criteria and stability of the final compost. Previous works support that the differences at the enzymatic level of industrial composting processes are mainly due to the material complexity, the duration of the processes and the entry of fresh material in advanced phases of the organic matter biotransformation (Tiquia, 2002; Estrella-González et al., 2019). Therefore, composting strategies and raw materials could influence the speed of composting, the time needed to complete stability and maturation degree and, consequently, the enzymatic activity in the final products.

The results published in previous works with respect to final compost show comparatively lower β -glucosidase, xylanase and lipase activities than those obtained in this work. On the contrary, the final urease activity in this work turned out to be much lower than that obtained by Jurado et al. (2014).

Figure 1. Toxicity and stability parameters. (a) Phenolic compounds (g kg^{-1}); (b) Accumulated respiration activity after 4 days, AT_4 ($\text{g O}_2 \text{ kg}^{-1} \text{ MO h}^{-1}$) and (c) Germination Index (%) in compost samples from industrial scale composting facilities (Box plots). Vegetable Waste (VW), Urban Solid Waste (USW), Sewage Sludge (SS), Agro Waste (AW) and “Alpeorujo” (ALP).

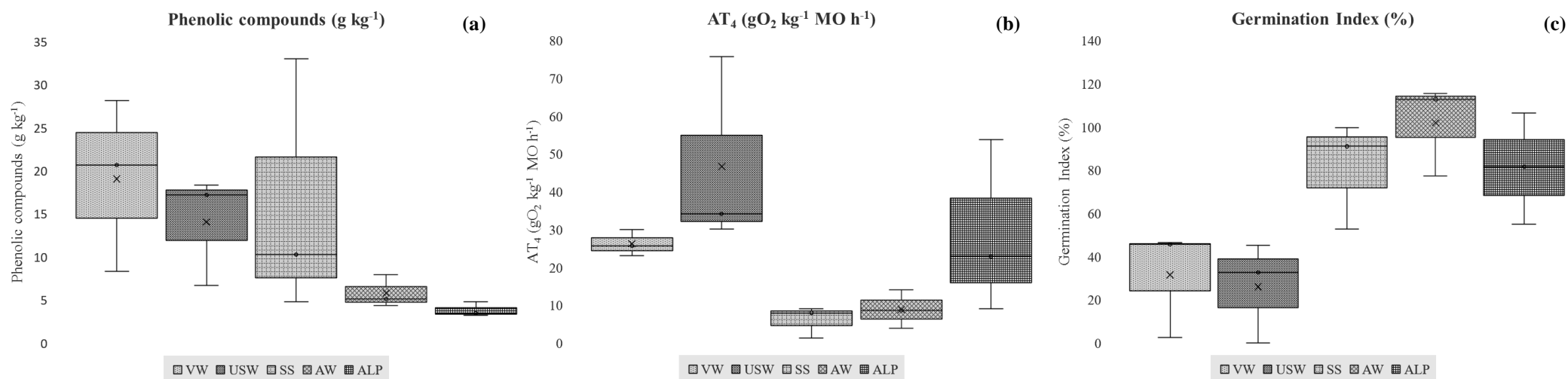
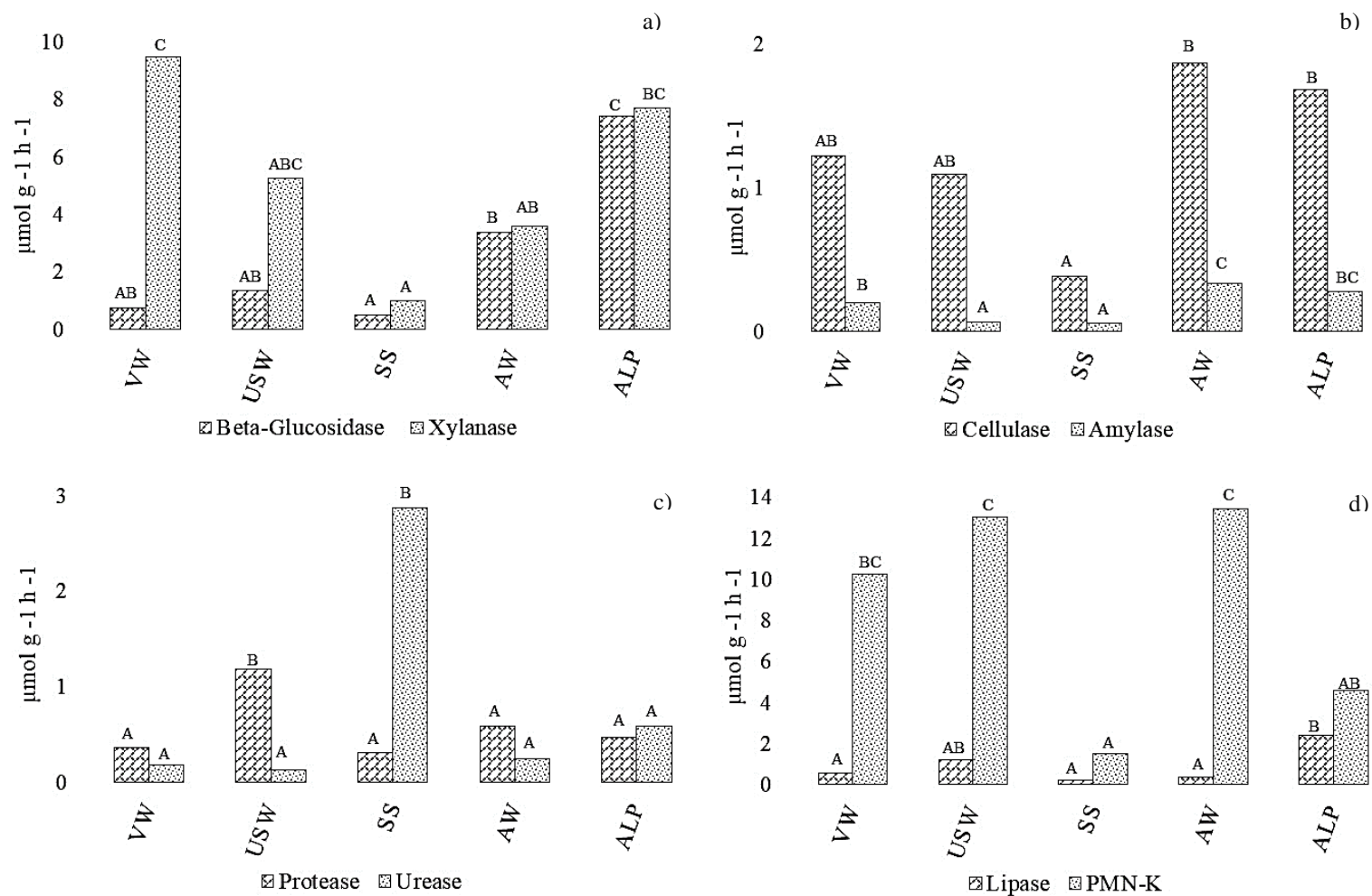


Figure 2. Quantification of enzymatic activities ($\mu\text{mol g}^{-1} \text{h}^{-1}$) in composts samples from different industrial scale composting facilities. a) β -Glucosidase and Xylanase; b) Cellulase and Amylase; c) Protease and Urease; d) PMN-K and Lipase. Vegetable Waste (VW), Urban Solid Waste (USW), Sewage Sludge (SS), Agro Waste (AW) and “Alpeorujo” (ALP).



3.3 Biodiversity Indexes

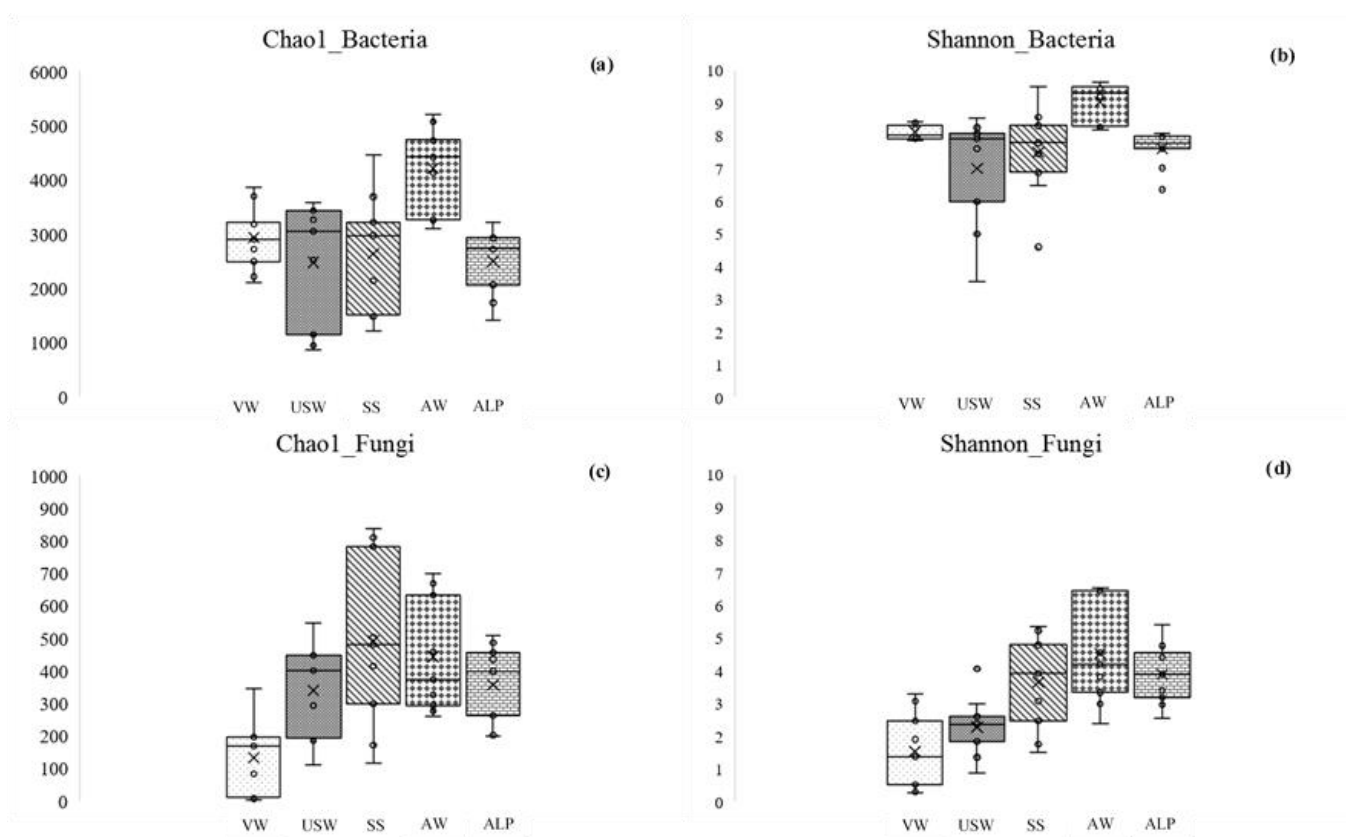
The values of Chao1 and Shannon indexes for bacterial and fungal community are represented in Figure 3. These values were corresponding to raw data without chimeras and singletons. The biodiversity Chao1 index is generally useful to know species richness, while Shannon index is more related to abundance. During the last decade numerous authors have used both indexes to know the biodiversity of compost samples (Liu et al., 2018; De Corato et al., 2019; Zhao et al., 2019). Traditionally, biodiversity has been based on cultivable microbiota (López-González et al., 2015), though deeper analysis closer to the reality consider the total microbiota by polymerase chain reaction denaturing gradient gel electrophoresis (PCR-DGGE) (Wang et al., 2015) or more recently by metagenomic analyses.

Figures 3a and 3b show the biodiversity indexes of bacteria for Chao1 and Shannon, respectively. On the one hand, highest values were obtained in the AW samples, showing a mean Chao1 index around 4000 and a mean Shannon index near of 9 (Fig. 3a and 3b). By the other hand, mean values of diversity in the rest of the samples analyzed were not noticeably different, ranging between 2500-3000, in the case of Chao1 index, while Shannon index mean fluctuated between 7-8. Here, it is possible to emphasize a greater dispersion of the data in the case of the USW, SS and AW samples, which could be related to a greater heterogeneity in the composition of the composting piles, as well as in the operating protocols (overall in the case of USW samples). Despite the differences detected according to the different processes and materials analyzed, the results revealed a very diverse bacterial community in all cases. Shannon values were even higher than those obtained by Liu et al. (2018) after 22 days from the beginning of the composting process. These authors determined that the biodiversity in the compost samples may be affected by the initial particle size, as well as by the application of commercial cellulose or specific microbial inoculum.

The indexes of Chao1 and Shannon for fungal communities are shown in Figures 3c and 3d, respectively. In general terms, fungal diversity was noticeable lower than bacterial diversity. Regarding to Chao1 index, values were approximately ten times lower than those corresponding to bacterial communities. Mean Chao1 Index was lower in VW samples (around 150), while these values ranged between 400-500 in the rest of samples. On the other hand, the highest average Chao1 values were observed for the SS and AW samples, although the data range was very wide in both cases. Mean of Shannon Index in fungi were higher in SS, AW and ALP, ranging from 4 to 5 and matched the range established by other authors (De Corato et al., 2019; Zhao et al., 2019), while USW and VW samples showed a very low level of diversity.

Bearing in mind the heterogeneity of the different processes, results concerning the metagenomics profile were practically unique and exclusive for each process. Despite that disadvantage, several previous works support the results here obtained respect to bacterial and fungal metagenomic from similar composted raw materials (Langarica-Fuentes et al, 2014; Silva et al., 2016).

Figure 3. Characterization of biodiversity indexes in compost samples from industrial scale composting facilities (Box plots). Chao1 and Shannon Bacterial indexes (a, b); Chao1 and Shannon Fungal indexes (c, d). Vegetable Waste (VW), Urban Solid Waste (USW), Sewage Sludge (SS), Agro Waste (AW) and “Alpeorujo” (ALP).



Figures 4 and 5 show the bacterial and fungal families after filtering the metagenomic results at a 0.5% abundance. Globally, the most representative bacterial Phyla were Firmicutes (44.8%), Bacteroidetes (28.7%), Proteobacteria (15.2%) and Actinobacteria (11.3%) (data not shown), being *Rhodospirillaceae*, *Bacillaceae*, *Flavobacteriaceae* and *Nocardiopsaceae* the most widely distributed bacterial families (Fig. 4). These were present in all type of samples but at different proportions. On the contrary, the *Chitinophagaceae* family was exclusively present in samples from AW1 process (94.5%), *Marinilabiaceae* family was only detected in samples from ALP1

process (49.06%) and *Lactobacillaceae* family almost exclusive in samples from USW3 process (31.21%).

Figure 4. Relative abundance of bacterial family in compost samples from industrial scale composting facilities. Vegetable Waste (VW), Urban Solid Waste (USW), Sewage Sludge (SS), Agro Waste (AW) and “Alpeorujo” (ALP). The figure represents the percentage of presence of each bacterial family in the 15 sampled composting plants.

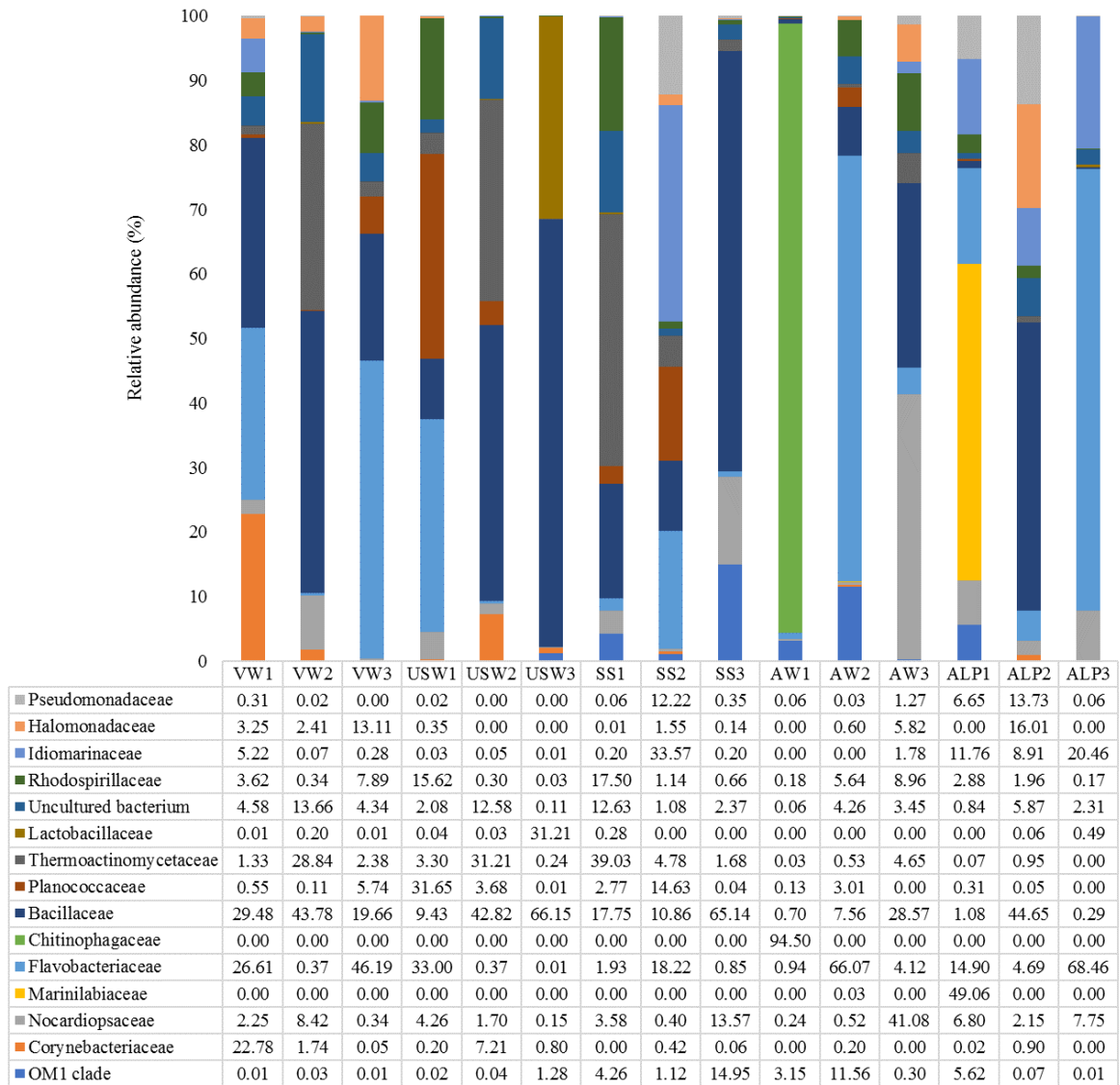
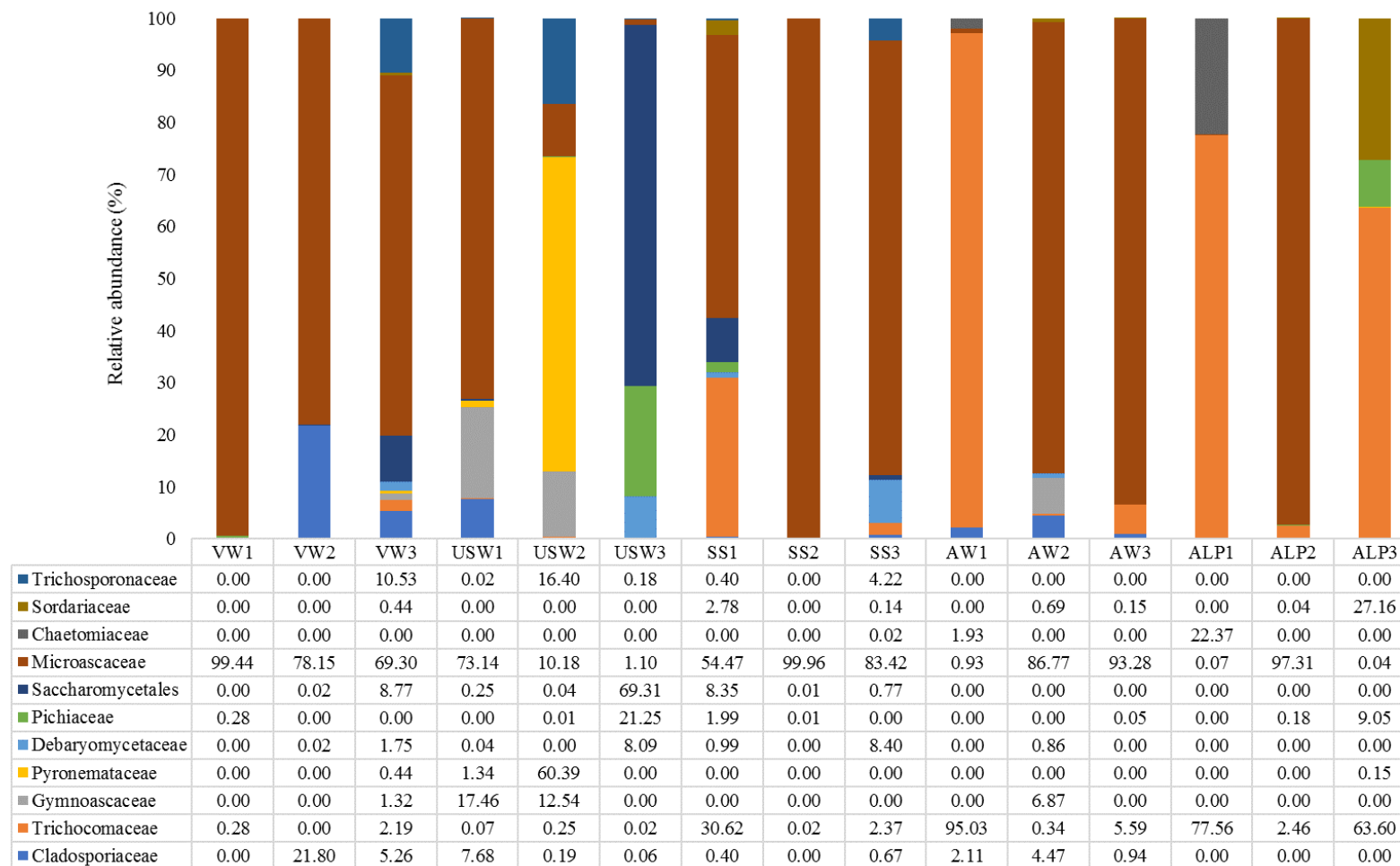


Figure 5. Relative abundance of fungal family in compost samples from industrial scale composting facilities. Vegetable Waste (VW), Urban Solid Waste (USW), Sewage Sludge (SS), Agro Waste (AW) and “Alpeorujo” (ALP). The figure represents the percentage of presence of each fungal family in the 15 sampled composting plants.



Members of *Flavobacteraceae* family (Bacteroidetes phylum) participate in the degradation of macromolecules such as cellulose and chitin. According to Fracchia al. (2006) this group of bacteria is dominant in mature compost and vermicompost. Likewise, members of Actinobacteria play an important role in the later stages of the composting process (Tian et al., 2013), so it was atypical to find it at low level in several compost samples (*Nocardiopsaceae* and *Corynebacteriaceae* families). Proteobacteria phylum was represented by *Rhodospirillaceae*, *Idiomarinaceae*, *Halomonadaceae* and *Pseudomonadaceae* families. Most of them are typical of composting processes, and they could be detected at different maturation stages (Silva et al., 2016).

Regarding the abundance of fungi (Fig. 5), Ascomycota was the most representative phylum (97.2%). The majority family was *Microascaceae*, being detected in all the samples analyzed. *Trichocomaceae* was the second family most abundant but it was not globally detected. The other fungal families do not represent more than 24.8% each. These results agree with those found by Langarica-Fuentes et al. (2014, 2015). On the other hand, the phylum Basidiomycota only represented 2.1% of the total, being *Trichosporonaceae* the only representative family.

3.4 Statistical analyses

Taking into account the great diversity of parameters analyzed in this work (monitoring, maturation, stability, toxicity and enzymatic parameters), it could be of interest to determine the influence of all of them when obtaining different composting products. On one side, Figure 6a shows a discriminant analysis that helps to verify how different the compost samples from each process were, on the basis of the raw material used. The discriminant analysis revealed two discriminant functions responsible for more than 80% of the variability observed between the data. In this case, data corresponding to the compost elaborated from Agri-food Waste (AW) and “Alpeorujo” (ALP) stand out as being the most distant groups in relation to the rest, while compost made from USW, SS and VW were more nearby to each other. On the other hand, the compost made from sewage sludge occupies an intermediate place in the analysis of main components shown in the Figure 6a.

Two Principal Component Analyses were performed bearing in mind the groups of physico-chemical and enzymatic parameters as independent way (Fig. 6b and 6c). The cumulative contribution rate of two principal components (PC1 and PC2) in the case of physico-chemical parameters reached 51.3% (Fig. 6b), while both PCs contributed around 48.4% to the variability of enzymatic data (Fig. 6c).

In Figure 6b, PC1 had a weight of 29.8%, being the most influential variables C/N Ratio, OM and HR. PHEN compounds, GI, M and AT₄ were too significant parameter that

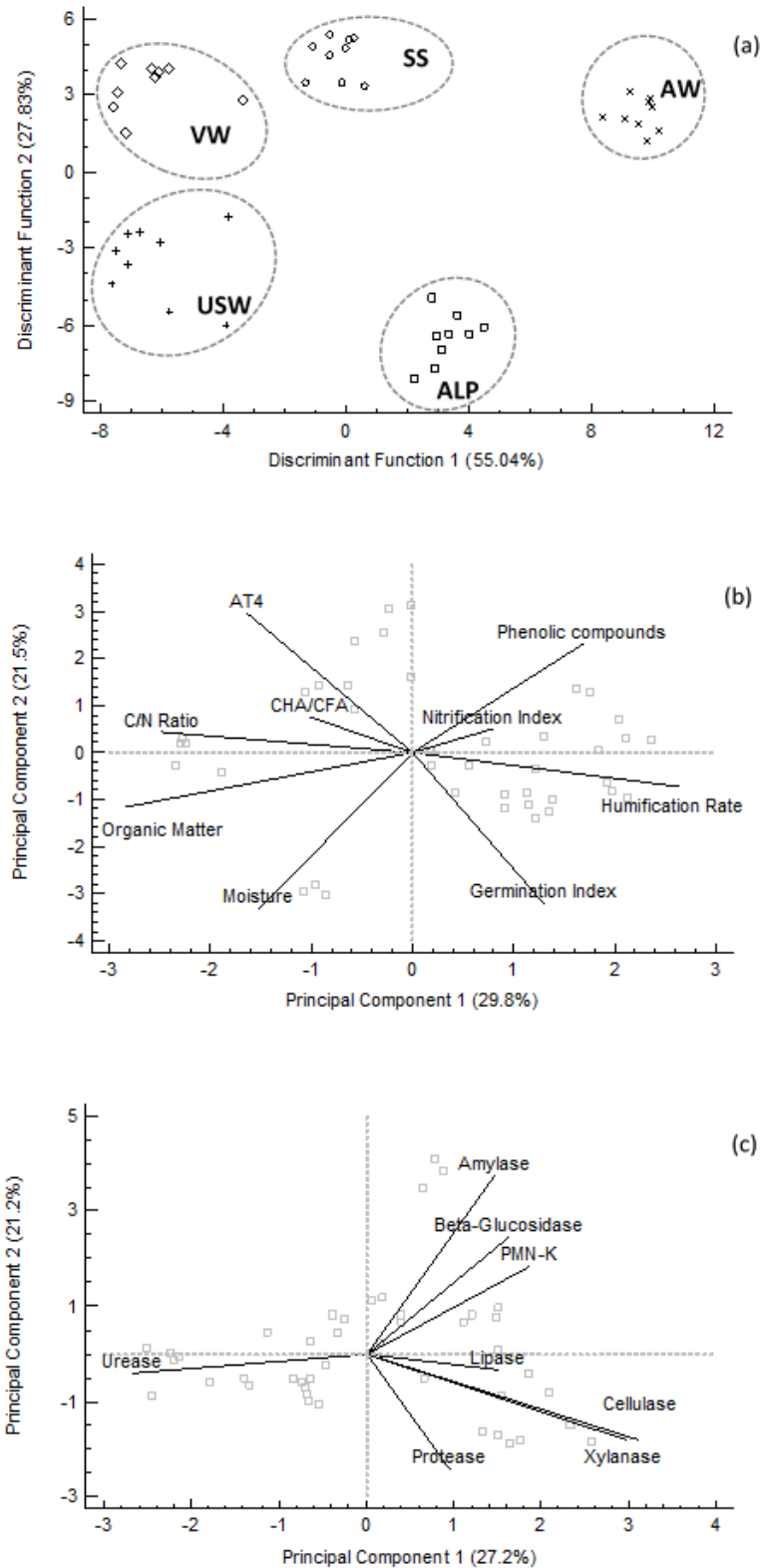
contributed to the variability of samples. It should be noted that those parameters that have a greater weight during the biooxidative phase were grouped, such as C/N Ratio, OM, M and AT₄; while PHEN compounds, HR, GI and NI appear as representatives of more advanced stages of maturation.

Regarding PC2 (21.5%), M and GI had a significant negative weight while phenolic compounds and AT₄ had a significant positive weight. Highlighted the opposite weight detected between AT₄ and GI, which would imply that, in theory, at a lower respiration rate, higher germination rates are expected in the final compost.

On the other hand, a second analysis of main components was carried out taking into account parameters of an enzymatic nature (Fig. 3c). PC1 (27.2%) was useful to determine the different and opposite behavior of urease activity with respect to the rest of the enzymatic parameters. Likewise, GLUC, AMY and PMN-K activities showed closeness (activities more related to the degradation of the most readily bioavailable fractions), as did the CEL and XYL activities (activities more related to the degradation of the more complex fractions). In any case, all of them can be considered as biological indicators of earlier or more advanced phases of the process, respectively.

A Pearson's correlation between physical-chemical-enzymatic parameters and the biodiversity indexes for fungi and bacteria (Shannon and Chao1) was carried out ($p < 0.05$). This analysis corresponds to a correlation study in which differences between raw materials were not taken into account. Therefore, the information that arises from it has a global nature, not exclusive to the materials. In this way, correlations have been established that can be useful regardless of the type of starting material. Regarding the monitoring parameters, a significant negative correlation was detected between bacterial biodiversity indexes and C/N Ratio (Chao1 B = -0.4349 and Shannon B = -0.5504), while Moisture was positively correlated with fungal biodiversity (Chao1 F = 0.3408 and Shannon F = 0.5220). Organic matter only correlated as significant way Shannon F (0.3316). In relation to the parameters traditionally considered as indicators of maturity, it should be noted the strongly negative correlation observed between Nitrification Index and bacterial biodiversity (Chao1 B = -0.5002 and Shannon B = -0.5035).

Figure 6. Statistical analyses. a) Discriminant analysis based on composting of different processes, taking into account the monitoring, enzymatic, stability and maturation parameter. Differences were established between different raw materials. VW: Vegetable Waste; USW: Urban Solid Waste; SS: Sewage Sluges; AW: Agrifood Waste; ALP: Alpeorujo. b) Principal Components Analyses taking into account the monitoring, stability, maturation and c) enzymatic parameters.



Regarding the block of parameters related to stability and, the results showed a significantly positive correlation between microbial biodiversity and germination index, in all cases. Surprisingly, the respirometric index AT_4 was negatively correlated with Chao1 F (-0.3441), but not with the rest of bioindicators. Highlighted the negative correlation between phenolic compounds and fungal bioindicators (Chao 1 F= -0.5618 and Shannon F= -0.6293).

On the other hand, the enzyme parameters most related to bacterial biodiversity were amylase (Chao1 B= 0.3593 and Shannon B= 0.3661) and PMN-K (Chao1 B= 0.4174 and Shannon B= 0.3917). In both cases, strong positive correlations were established. Respecting fungal biodiversity, GLUC and AMY activities showed a positive correlation with fungal biodiversity (Shannon F), while did negative in the case of XYL (-0.4614). Urease activity was positively correlated exclusively with Chao1 F (0.4369).

In order to obtain a formula capable of predicting the degree of microbial biodiversity of a compost, two regression analyses were established using the parameters most closely correlated with the bacterial and fungal Shannon indexes. Thus, the predictive approximations obtained were:

$$\text{Shannon B} = 10.5836 + 0.0071 * \text{GI} - 1.9014 * \text{NITRIF} - 0.1756 * \text{C/N}$$

$$\text{Shannon F} = 3.6611 - 0.0898 * \text{XYL} - 0.0837 * \text{PHEN} + 0.0155 * \text{GI}$$

Although the equations obtained did not show a high level of prediction (64% and 62%, respectively), it was possible to establish a way of comparing the degree of biodiversity between different compost samples using a little number of physical-chemical-enzymatic parameters.

Although the work presented does not study the temporal evolution of the physical-chemical-biological parameters throughout the different composting processes analyzed (only the product is analyzed at the end time), a certain increase in fungal and bacterial biodiversity is intuited to as the process progresses. This intuition is based on the apparently found relationship between the biodiversity indexes derived from the analyzed compost samples and some parameters related to phytotoxicity and biological stability.

4. Conclusions

The problem derived from the lack of homogeneity and repeatability of composting processes on an industrial scale is evident. Although numerous attempts have been made to predict the quality of compost based on different traditional parameters, the latest metagenomic advances reveal the complexity of this prediction, since microbial

biodiversity can be almost exclusive to each process. We could conclude with this work that the quality of a compost can not only be measured in physicochemical terms, but it is also necessary to consider other biological parameters, as well as the "biodiverse" nature of each compost pile.

5. Appendix A. Supplementary Material

E-supplementary data for this work can be found in e-version of this paper online.

The following are the Supplementary data to this article:

Supplementary data 1

Supplementary data 2

Supplementary Table 1. General characteristics of the analyzed industrial composting processes: raw material, maximum temperature during the biooxidative phase and duration of the whole process.

Main input waste	Code	Mixture for composting	Temperature ^a (°C)	Time ^b
Vegetable Waste	VW1	Mostly cucumber and zucchini crop residues: stalks, leaves	70	120
	VW2	Mostly cucumber, zucchini crop residues: stalks, leaves	60	120
	VW3	Mostly pepper crop residues: stalks, leaves	65	90
Sewage Sludge	SS1	Sewage sludge + straw (1:1 v/v)	52	105
	SS2	Sewage sludge + pruning wastes (1:1 v/v)	55	90
	SS3	Dried sewage sludge (1:2 v/v)	50	90
Urban Solid Waste	USW1	Municipal solid waste	48	105
	USW2	Municipal solid waste	50	135
	USW3	Municipal solid waste	52	90
Agrifood Waste	AW1	Citric sludge + palmtree prunings (1:3 v/v)	47	240
	AW2	Cull tomatoes + tomato plant (stalks and leaves)	50	180
	AW3	Citric sludge + pig slurry + pruning wastes (mainly palmtree) (3:1:1.5 v/v)	55	120
"Alpeorujo"	ALP1	ALP + chicken manure + straw (20.2:3.6:1 w/w)	50	240
	ALP2	ALP + olive leaves + manure (12.5:3.5:1 w/w)	52	210
	ALP3	ALP + manure + olive leaves (1:0.45:unknown w/w)	61	150

^a Temperature reached in thermophilic phase

^b Total time of composting process (days)

Supplementary Table 2. Pearson table showing positive and negative correlations

		Biodiversity Indicators			
Parameters		Chao1 F*	Shannon F*	Chao1 B*	Shannon B*
Monitoring	Moisture	0.3408	0.5220	0.0137	-0.0963
	Organic Matter	-0.0321	0.3316	-0.0653	-0.1066
	C/N Ratio	0.0215	0.0265	-0.4349	-0.5504
Maturation	C _{HA} /C _{FA}	0.2183	0.1121	-0.3528	-0.1985
	Humification Rate	-0.0182	-0.2461	0.2123	0.2469
	Nitrification Index	0.0438	-0.16	-0.5002	-0.5035
Stability	AT ₄	-0.3441	-0.2869	-0.0789	-0.0834
	Germination Index	0.3409	0.481	0.5219	0.5157
	Phenolic Compounds	-0.5618	-0.6293	-0.1701	-0.0853
Enzymatic activity	βeta-Glucosidase	0.1751	0.4454	0.0969	0.0837
	Amylase	0.2761	0.4615	0.3593	0.3661
	Cellulase	-0.0586	-0.1578	0.0169	0.0451
	Xylanase	-0.2271	-0.4614	-0.0001	0.0747
	PMN-K	-0.0965	0.068	0.4174	0.3917
	Protease	0.0824	-0.1041	0.0351	-0.044
	Urease	0.4369	0.134	-0.0415	0.0372
	Lipase	-0,0199	0,1021	-0,2728	-0,1406

* values in bold were significant at P < 0.05

6. Acknowledgements

This work has been funded by the Ministry of Economy and Competitiveness through project AGL2015-64512R. This research group wishes to thank the enormous help provided by the doctors Teresa Gea and Dr. Raquel Barrena (Autonomous University of Barcelona), and Javier Noguera, Computer Engineer, without whom it would have been impossible to carry out this work.

7. References

1. Adani, F., Lozzi, P., Genevini, P., 2001. Determination of biological stability by oxygen uptake on municipal solid waste and derived products. *Compost Sci. Util.* 9(2), 163-178.
2. Barral, T., Paradelo, R., 2011. A review on the use of phytotoxicity as a compost quality indicator. *Dyn. Soil Dyn. Plant (Special Issue 2)*, 36-44.
3. Barrena, R., d'Imporzano, G., Ponsá, S., Gea, T., Artola, A., Vázquez, F., Sánchez, A., Adani, F., 2009. In search of a reliable technique for the determination of the biological stability of the organic matter in the mechanical–biological treated waste. *J. Hazard. Mater.* 162(2-3), 1065-1072.
4. Barrena-Gómez, R., Lima, F.V., Ferrer, A.S., 2006. The use of respiration indices in the composting process: a review. *Waste Manage. Res.* 24(1), 37-47.
5. Bernal, M.P., Paredes, C., Sánchez-Monedero, M.A., Cegarra, J., 1998. Maturity and stability parameters of composts prepared with a wide range of organic wastes. *Bioresour. Technol.* 63 (1), 91–99.
6. BOE 999/2017 (BOE-A-2017-14332, 2017). Real Decreto 999/2017: Spanish Regulation on fertilizers.
7. Bremner, J.M., Mulvaney, R.L., 1978. Urease activity in soils. In: Burns, R.G. (Ed.), *Soil Enzymes*. Academic Press, London, UK, pp. 150-196.
8. Caporaso, J., Kuczynski, J., Stombaugh, J. et al., 2010. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nat. Methods* 7, 335–336.
9. Cavani, L., Ciavatta, C., Gessa, C., 2003. Identification of organic matter from peat, leonardite and lignite fertilisers using humification parameters and electrofocusing. *Bioresour. Technol.* 86, 45-52.
10. Cesaro, A., Conte, A., Belgiorno, V., Siciliano, A., Guida, M., 2019. The evolution of compost stability and maturity during the full-scale treatment of the organic fraction of municipal solid waste. *J. Environ. Manage.* 232, 264-270.

11. Chandna, P., Nain, L., Singh, S., Kuhad, R.C., 2013. Assessment of bacterial diversity during composting of agricultural byproducts. *BMC Microbiol.*, 13, 99.
12. Ciavatta, C., Govi, M., Vittori, L., Antisari, L., Sequi, P., 1990. Characterization of humified compounds by extraction and fractionation on solid polyvinylpyrrolidone. *J. Chromatogr.* 509, 141-146.
13. De Corato, U., Patrino, L., Avella, N., Lacolla, G., Cucci, G., 2019. Composts from green sources show an increased suppressiveness to soilborne plant pathogenic fungi: Relationships between physicochemical properties, disease suppression, and the microbiome. *Crop Prot.* 124, 104870.
14. Emino, E.R., Warman, P.R., 2004. Biological assay for compost quality. *Compost Sci. Util.* 12(4), 342-348.
15. EPA, 2003. Environmental Protection Agency. Environmental regulations and technology. Control of pathogens and vector attraction in sewage sludge. EPA625-R-92-013.
16. 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. *J. Environ. Manag.* 248, 109312.
17. Farnet, A.M., Qasemian, L., Goujard, L., Gil, G., Guiral, D., Ruaudel, F., Ferre, E., 2010. A modified method based on p-nitrophenol assay to quantify hydrolysis activities of lipases in litters. *Soil Biol. Biochem.* 42, 386-389.
18. Fracchia, L., Dohrmann, A.B., Martinotti, M.G., Tebbe, C.C., 2006. Bacterial diversity in a finished compost and vermicompost: differences revealed by cultivation-independent analyses of PCR-amplified 16S rRNA genes. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 71(6), 942.
19. He, L., Brickerstaff, G.F., Paterson, A., Buswell, J.A., 1993. Purification and partial characterization of two xylanases that differ in hydrolysis of soluble and insoluble xylan fractions. *Enzym. Microb. Technol.* 15, 13-18.
20. Iglesias-Jiménez, E., Perez-Garcia, V., 1992. Determination of maturity indices for city refuse composts. *Agr. Ecosyst. Environ.* 38(4), 331-343.
21. Iglesias-Jiménez, E., Barral-Silva, M.T., Marhuenda-Egea, F.C., 2008. Indicadores de la estabilidad y madurez del compost. J. Moreno, R. Moral (Eds.), *Compostaje*, Mundi-Prensa, Madrid, pp. 243-283

22. Jurado, M.M., Suárez-Estrella, F., Vargas-García, M.C., López, M.J., López-González, J.A., Moreno, J., 2014. Evolution of enzymatic activities and carbon fractions throughout composting of plant waste. *J. Environ. Manag.* 133, 355-364.

23. Jurado, M.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. *Bioresour. Technol.* 186, 15-24.

24. Ladd, J.N., Butler, J.H.A., 1972. Short-term assays of soil proteolytic enzyme activities using proteins and dipeptide derivatives as substrates. *Soil Biol. Biochem.* 4, 19-30.

25. Langarica-Fuentes, A., Zafar, U., Heyworth, A., Brown, T., Fox, G., Robson, G.D., 2014. Fungal succession in an in-vessel composting system characterized using 454 pyrosequencing. *FEMS Microbiol. Ecol.* 88(2), 296-308.

26. Langarica-Fuentes, A., Fox, G., Robson, G.D., 2015. Metabarcoding analysis of home composts reveals distinctive fungal communities with a high number of unassigned sequences. *Microbiology*, 161(10), 1921-1932.

27. Libmond, S., Savoie, J., 1993. Degradation of wheat straw by a microbial community stimulation by a polysaccharidase complex. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 40, 567-574.

28. Liu, L., Wang, S., Guo, X., Zhao, T., Zhang, B., 2018. Succession and diversity of microorganisms and their association with physicochemical properties during green waste thermophilic composting. *Waste Manag.* 73, 101-112.

29. López-González, J.A., Vargas-García, M.C., López, M.J., Suárez-Estrella, F., Jurado, M.M., Moreno, J., 2015. Biodiversity and succession of mycobiota associated to agricultural lignocellulosic waste-based composting *Bioresour. Technol.* 187, 305-313.

30. Martínez-Salgado, M. M. M., Blu, R. O., Janssens, M., Fincheira, P., 2019. Grape pomace compost as a source of organic matter: Evolution of quality parameters to evaluate maturity and stability. *J. Clean. Prod.* 216, 56-63.

31. Mishra, P.C., Mohanty, R.K., Dash, M.C., 1979. Enzyme activity in subtropical Surface soils under pasture. *Indian J. Agr. Chem.* 12, 19-24.

32. Onwosi, C. O., Igbokwe, V. C., Odimba, J. N., Eke, I. E., Nwankwoala, M. O., Iroh, I. N., Ezeogu, L. I., 2017. Composting technology in waste stabilization: on the methods, challenges and future prospects. *J. Environ. Manag.* 190, 140-157.

33. 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 Manag.* 33, 1616-1625.
34. Pinho, I.A., Lopes, D.V., Martins, R.C., Quina, M.J., 2017. Phytotoxicity assessment of olive mill solid wastes and the influence of phenolic compounds. *Chemosphere* 185, 258-267.
35. Ponsá, S., Gea, T., Sánchez, A., 2010. Different indices to express biodegradability in organic solid wastes. *J. Environ. Qual.* 39(2), 706-712.
36. Roletto, E., Barberis, R., Consiglio, M., Jodice, R., 1985. Chemical parameters for evaluating compost maturity *BioCycle*, 26, 46-47.
37. Said-Pullicino, D., Erriquens, F. G., Gigliotti, G., 2007. Changes in the chemical characteristics of water-extractable organic matter during composting and their influence on compost stability and maturity. *Bioresour. Technol.* 98(9), 1822-1831.
38. Silva, M. E. F., Lopes, A. R., Cunha-Queda, A. C., Nunes, O.C., 2016. Comparison of the bacterial composition of two commercial composts with different physicochemical, stability and maturity properties. *Waste Manag.* 50, 20-30.
39. Tabatabai, M.A., Bremner, J.M., 1969. Use of p-nitrophenyl phosphate in assay of soil phosphatase activity. *Soil Biol. Biochem.* 1, 301-307.
40. Tian, W., Sun, Q., Xu, D., Zhang, Z., Chen, D., Li, C., Shen, Q., Shen, B., 2013. Succession of bacterial communities during composting process as detected by 16S rRNA clone libraries analysis. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 78, 58-66.
41. Tabatabai, M.A., 1982. Soil enzymes. In: Page, A.L., Miller, R.H., Keeney, D.R. (Eds.), *Methods of Soil Analyses, Part 2, Agronomy*, second ed., vol. 9. Am. Soc. Agron, Madison, pp. 903-947.
42. Tiquia, S.M., 2002. Evolution of extracellular enzyme activities during manure composting. *J. Appl. Microbiol.* 92(4), 764-775.
43. Tittarelli, F., Trinchera, A., Intrigliolo, F., Benedetti, A., 2002. Evaluation of organic matter stability during the composting process of agroindustrial wastes. In *Microbiology of composting*. Springer, Berlin, Heidelberg, pp. 397-406.
44. Wang, X., Cui, H., Shi, J., Zhao, X., Zhao, Y., Wei, Z., 2015. Relationship between bacterial diversity and environmental parameters during composting of different raw materials. *Bioresour. Technol.* 198, 395-402.

45. Wang, K., Yin, X., Mao, H., Chu, C., Tian, Y., 2018. Changes in structure and function of fungal community in cow manure composting. *Bioresour. Technol.* 255, 123-130.

46. Zhao, X., Wei, Y., Zhang, F., Tan, W., Fan, Y., Xi, B., 2019. How do fungal communities and their interaction with bacterial communities influence dissolved organic matter on the stability and safety of sludge compost? *Environ. Sci. Pollut. Res.* 26(4), 4141-4146.

47. Zucconi, F., Pera, A., Forte, M., De Bertolli, M., 1981. Evaluating toxicity of immature compost. *Biocycle*, 22(2), 54-57.

DISCUSIÓN

5. Discusión

Actualmente, el compostaje es una de las alternativas mejor valoradas para el tratamiento de residuos orgánicos, debido a que se trata de un proceso respetuoso con el medio ambiente, que sirve para revalorizar una amplia gama de residuos antropogénicos y su producto, el compost, se utiliza como una importante enmienda húmica en suelos de cultivo (Guardia et al., 2010; Vargas-García et al., 2010). Durante este proceso, la materia orgánica es biotransformada como resultado de complejas interacciones físico-químicas y microbiológicas que dependerán en gran medida del tipo de residuos y del proceso o sistema que se lleve a cabo. Por tanto, es lógico pensar que un proceso de compostaje a escala industrial diste mucho de lo que se define tradicionalmente como compostaje doméstico o a escala piloto. De hecho, la evolución de ciertos parámetros típicamente considerados de seguimiento puede ser un tanto irregular, en el caso de procesos de compostaje realizados a escala industrial.

Gracias al trabajo desarrollado en esta Tesis Doctoral se ha podido profundizar aún más en el comportamiento de diversos parámetros físico-químicos y biológicos, estrechamente relacionados con los ciclos del Carbono (Artículo 1) y del Nitrógeno (Artículo 2), aunque desde una perspectiva industrial. Además, uno de los principales retos fue buscar la conexión entre los indicadores tradicionales de estabilidad y madurez del compost con otros menos utilizados relacionados con la biodiversidad de los materiales (Artículo 3).

En el primer trabajo publicado, se buscó dilucidar la influencia de las materias primas en la dinámica de biodegradación de las fracciones lignocelulósicas y determinar así la exclusividad de cada proceso de compostaje. Para ello, además de los parámetros básicos de control, se analizó la evolución de la hemicelulosa, la celulosa y la lignina, así como de diferentes parámetros de humificación a partir de los 15 procesos de compostaje a escala industrial estudiados. Además, se evaluó el efecto de diferentes actividades enzimáticas relacionadas con las fracciones de carbono.

Por otra parte, el nitrógeno es uno de los nutrientes más importantes que controlan la producción primaria neta en los ecosistemas (Jones et al., 2004). En este sentido, sería lógico pensar que las poblaciones relativas de microorganismos autótrofos y heterótrofos dentro de una pila de compostaje dependen en gran medida de la relación C/N disponible para la comunidad microbiana (Sepehri y Sarrafzadeh, 2018). Además, la transformación de las fracciones de nitrógeno durante el compostaje es muy compleja, de forma que el manejo inadecuado del proceso podría estar acompañado de pérdidas significativas de nitrógeno (Bao et al., 2008, Zhu et al., 2019). Por todo ello, el segundo artículo se centró en el estudio de un grupo de parámetros físico-químicos y enzimáticos

estrechamente relacionados con la transformación de las fracciones nitrogenadas durante el compostaje a escala industrial, y en averiguar cómo la heterogeneidad y la diversidad de las materias primas pueden afectar a la evolución estándar de los mismos, y a la calidad de los productos obtenidos.

Respecto al tercer trabajo publicado, éste se centró en el análisis del producto final de cada uno de los procesos de compostaje, tanto desde un punto de vista físico-químico y enzimático, como en función de la biodiversidad de las muestras, lo cual se llevó a cabo mediante el análisis metagenómico de las mismas. Gracias a ello, fue posible obtener interesantes indicadores de biodiversidad microbianos relacionados con estabilidad y madurez de los compost.

En cualquier proceso de compostaje, es esencial monitorear ciertos parámetros básicos para controlar, tanto las condiciones iniciales de las materias primas como la evolución del proceso. El primer factor a tener en cuenta es la temperatura (Artículo 1, Tabla S1), ya que influye directamente sobre la tasa de degradación de la materia orgánica y determina la estabilidad del producto. Stentiford (1996) sugirió que temperaturas superiores a 55°C maximizan el saneamiento de los materiales; por otra parte, temperaturas entre 45 y 55°C mejoran las tasas de biodegradación, y aquellas entre 35 y 40°C incrementan la diversidad microbiana a lo largo del compostaje. De acuerdo con la Agencia de Protección Ambiental (EPA, 2003), durante la fase termofílica de un proceso de compostaje, se deben alcanzar temperaturas superiores a 55°C durante, al menos, 3 días consecutivos. En este trabajo, la temperatura promedio alcanzada en la etapa termófila para cada instalación cumplió en términos generales con el mínimo establecido por la EPA. Mientras que la temperatura media más alta se alcanzó en las pilas de Residuo Vegetal (65°C), en el resto de las plantas de compostaje, el promedio de temperatura en la fase termófila osciló entre 50 y 55°C.

El B.O.E. 999/2017 recoge en el Anexo I Grupo 6, algunos de los requisitos que debe cumplir un compost para ser aplicado como enmienda orgánica en suelos, haciendo especial referencia a los valores adecuados de humedad, materia orgánica y relación C/N. En los procesos evaluados en este trabajo, como era de esperar, los valores medios de humedad (Artículo 1, Tabla 1) fueron más elevados durante la fase biooxidativa. La humedad inicial de las pilas fue óptima en el caso de las instalaciones dedicadas a Residuos Agroalimentarios y Alpeorujo, mientras que este parámetro fue mucho mayor en aquellas empresas dedicadas a Residuos Sólidos Urbanos, Residuos Vegetales y Lodos de Depuradora. Durante el proceso, el contenido de humedad contribuye a una mejor degradación de la materia orgánica y al mantenimiento de la temperatura durante un período de tiempo más largo, ya que favorece la actividad microbiana (Silva et al., 2013). Sin embargo, al final del compostaje, la reducción en el contenido de humedad es un

signo positivo de descomposición y madurez del compost (Ameen et al., 2016). En todos los procesos analizados, la humedad de las pilas disminuyó con el tiempo hasta alcanzar valores de alrededor del 30-40% en los productos finales. Solo en el caso de productos elaborados a partir de Residuos Sólidos Urbanos, los valores de humedad estuvieron en torno al 11%, lo que se consideró un valor excesivamente bajo. En cuanto al porcentaje de materia orgánica (Artículo 1, Tabla 1), ésta disminuyó considerablemente durante todos los procesos evaluados. El contenido inicial osciló entre el 62 y 74%, detectándose la mayor pérdida de materia orgánica al final de los procesos elaborados a partir de Residuos Sólidos Urbanos, Residuos Vegetales y Lodos de Depuradora. El tercer parámetro en cuestión es la relación C/N (Artículo 1). Al comienzo del compostaje, una relación C/N alrededor de 25-30 se considera óptima; sin embargo, estos valores iniciales solo se observaron en el caso de procesos realizados a partir de Residuos Sólidos Urbanos. Este hecho confirma que, en muchos casos, el acondicionamiento de los materiales de partida en el compostaje a escala industrial no es del todo adecuado, lo que podría afectar negativamente el equilibrio entre C y N dentro de las pilas. De acuerdo con Guo et al. (2012), la relación C/N influye directamente en la madurez del producto obtenido, afectando a otros parámetros. Por ejemplo, cuando en un proceso de compostaje la relación C/N inicial no es adecuada, éste evoluciona de forma inesperada e influye en el contenido de Carbono Orgánico Soluble (COS) y Carbono de biomasa (C_{bio}). Ambos parámetros, se espera que disminuyan a lo largo del proceso (Jurado et al., 2014, 2015). Sin embargo, probablemente relacionado con una relación C/N incorrecta al principio, C_{bio} podría no mostrar valores más bajos al final del proceso, tal y como se observó en el caso de los procesos realizados a base de Residuos Vegetales y Lodos de Depuradora (Artículo 1, Tabla 1).

La densidad aparente (Artículo 1, Tabla 1) es un factor importante a tener en cuenta para el buen acondicionamiento de las mezclas iniciales en los procesos de compostaje. También influye en las propiedades mecánicas de los materiales a compostar, como son la resistencia, la porosidad y la facilidad de compactación (Agnew y Leonard, 2003). En este trabajo, los valores de densidad aparente aumentaron, en términos generales, a lo largo del proceso de compostaje.

Otros parámetros que se tuvieron en cuenta durante el seguimiento de todos los procesos de compostaje fueron el pH y la conductividad eléctrica (Artículo 1 y 2). El análisis de pH de las muestras de compost de las diferentes pilas mostró una tendencia gradual desde condiciones neutras a alcalinas, coincidiendo con lo descrito por otros autores (Vargas-García et al., 2010; Alburquerque et al., 2011; Liu et al., 2011). Según Wang y Zeng (2017), durante el compostaje de los residuos agroalimentarios, el pH podría aumentar al final del proceso debido a la formación de NH_3 , pudiendo alcanzar

valores de pH superiores a 8. Estos resultados concuerdan con los observados en este trabajo para procesos elaborados a base de restos agroalimentarios.

La conductividad eléctrica (Artículo 2, Figura 1) refleja la salinidad de los sustratos y varios autores lo describen como un buen indicador de madurez del compost (Liu et al., 2011). Los valores más altos observados en este trabajo correspondieron al compost basado en Residuos Vegetales. Estos valores podrían deberse al origen de los residuos, ya que este tipo de material vegetal proviene de sistemas hortícolas intensivos, donde generalmente se aplica una fertilización mineral excesiva (Song y Lee, 2010). Si bien, los valores de conductividad eléctrica disminuyeron a lo largo de los procesos de compostaje de restos vegetales, este parámetro aumentó ligeramente en el resto de los procesos de compostaje. Otros autores (Liu et al., 2011; Yadav y Garg, 2011), obtuvieron resultados similares e indicaron que el aumento podría deberse a la liberación de diferentes iones minerales y a la mineralización de la materia orgánica.

La fracción lignocelulósica es, lógicamente, uno de los componentes más importantes en mezclas de materiales elaboradas a partir de residuos vegetales. No obstante, la información procedente de la literatura referida a la degradación de las fracciones lignocelulósicas durante un proceso de compostaje es muy diversa y contradictoria (Haddadin et al., 2009; Wang et al., 2011). Dada la gran diversidad de materiales que pueden ser compostados y su composición en relación al contenido lignocelulósico, no es de extrañar que la información de la que se dispone sea tan heterogénea (Francou et al., 2008). Generalmente, la biotransformación de la lignina ocurre a una baja tasa de degradación. El contenido de este polímero determina no sólo su propia descomposición, sino también la de otros componentes de la lignocelulosa, como son celulosa y hemicelulosa. La lignina actúa como un factor de protección de estas fracciones, dificultando el acceso de las enzimas microbianas implicadas en los procesos de biodegradación (Barrington et al., 2002; Malherbe y Cloete, 2002). Para una mayor comprensión de la participación de las fracciones lignocelulósicas en el proceso de compostaje, ha sido necesario el empleo de diferentes parámetros, como es el caso del índice Lignina/Holocelulosa (L/H), cuyo valor tiende a aumentar a lo largo del proceso de compostaje. En este trabajo, el índice L/H duplicó su valor al final del proceso (Artículo 1, Figura 2), corroborando lo ya descrito por otros autores (Francou et al., 2008). En cualquier caso, la degradación adecuada de la fracción de lignocelulosa es crucial para lograr un producto maduro, libre de toxicidad para ser aplicado en suelos agrícolas. En este trabajo, los resultados correspondientes a la degradación de las fracciones lignocelulósicas mostraron diferentes perfiles dependiendo de cada tipo de materia prima. Este hecho confirma que las vías de transformación del carbono polimérico en compuestos de carbono solubles, simples y disponibles para los

microorganismos presentes en las pilas son altamente dependientes de los materiales utilizados aunque las tendencias sean muy similares.

Los perfiles de biodegradación de las fracciones lignocelulósicas dependen absolutamente de la actividad de los microorganismos presentes en los procesos de compostaje (Wei et al., 2019). En este trabajo, se han seleccionado un grupo de enzimas altamente involucradas en la degradación de fracciones muy complejas. Tal es el caso de las celulasas, la xilanasas y las ligninasas, que pueden servir como bioindicadores de evolución óptima de los procesos de compostaje. De esta manera, la Figura 2 (Artículo 1) muestra la evolución de las actividades de β -glucosidasa, amilasa, celulasa y xilanasas en los diferentes procesos de compostaje analizados, en función de cada materia prima y de las diferentes etapas del compostaje. La β -glucosidasa es una de las enzimas claves que gobiernan el ciclo del carbono. Su actividad es indicativa de la presencia de materia orgánica lábil, fácilmente utilizable por los microorganismos (Castaldi et al., 2008), cataliza la hidrólisis de celobiosa y otros disacáridos (Fernández-Gómez et al., 2013), hecho que explica lo observado en este trabajo, donde los valores de actividad más altos se registraron al inicio del compostaje, coincidiendo con la mayor disponibilidad de nutrientes (Artículo 1, Figura 2 a,e,i,m,q). Un perfil parecido mostró la actividad amilasa en todos los procesos de compostaje (Artículo 1, Figura 2 b,f,j,n,r). El resto de las enzimas implicadas en el metabolismo de carbohidratos, xilanasas, y celulasa, mostraron perfiles muy diferentes en función de la materia prima empleada en cada proceso y, como se mencionó anteriormente, también se vieron influenciadas fuertemente por la disponibilidad de las diferentes fracciones lignocelulósicas. Según lo descrito por Wei et al. (2019), la actividad xilanólítica en Lodos de Depuradora y Alpeorujos mostró una actividad máxima en la etapa termofílica. Sin embargo, Amira et al. (2012), observaron que la actividad xilanólítica y celulolítica durante el compostaje de restos agroalimentarios, aumentó al final del proceso. No hay que olvidar que, en muchos casos, los diferentes perfiles enzimáticos correspondientes a procesos de compostaje diferentes pueden estar muy relacionados con la entrada accidental o intencionada de material fresco durante los procesos.

Las actividades proteasa y ureasa participan en el proceso de mineralización del nitrógeno durante el proceso de compostaje. En ambos casos, se genera amoníaco a partir de proteínas de bajo peso molecular o urea, respectivamente (Liu et al., 2011). En general, ambas actividades tienden a aumentar a lo largo del proceso de compostaje, pero su evolución puede variar según los materiales de partida (Artículo 2, Figura 4 a-e). El valor más alto de actividad proteolítica se detectó en los procesos realizados a partir de Residuos Sólidos Urbanos, Residuos Agroalimentarios y Alpeorujos, mientras que el más bajo se alcanzó en las muestras de Lodos de Depuradora y Residuos Vegetales. La

actividad proteasa aumentó con el tiempo, excepto en los procesos de Lodos de Depuradora y Alpeorujó, donde se produjo una disminución notable al final del proceso de compostaje. Los datos obtenidos en la Figura 4 (Artículo 2) mostraron tendencias similares a las obtenidas por Jurado et al. (2014), mientras que la evolución observada en las muestras de Alpeorujó fue similar a la obtenida en algunos de los procesos estudiados por Cunha-Queda et al. (2007), donde la disminución de la actividad proteasa se asoció con el origen de la materia prima utilizada. En general, la actividad ureasa alcanzó el valor máximo en la fase de maduración, excepto en los procesos realizados a partir de Residuos Sólidos Urbanos. Los resultados de varias investigaciones han sido contradictorios con respecto al comportamiento de la actividad ureasa durante el proceso de compostaje. Jurado et al. (2014) mostraron cómo la actividad ureasa disminuía durante el proceso, mientras que otros autores observaron que dicha actividad aumentaba en procesos basados en Residuos Vegetales y Lodos de Depuradora, respaldando los resultados obtenidos en este trabajo (Vargas-García et al., 2010; Sudkolai y Nourbakhsh, 2017).

Además de las actividades proteasa y ureasa, otras enzimas están indirectamente relacionadas con el ciclo del nitrógeno. Las fosfatasa catalizan la escisión hidrolítica de los ésteres del ácido fosfórico. Dependiendo de su pH óptimo, se clasifican como fosfatasa alcalinas o ácidas (Linhardt y Walter, 1965). La fosfomonoesterasa alcalina se considera, junto con la fosfomonoesterasa ácida, una de las fosfatasa predominantes en la mayoría de los suelos y residuos (Albrecht et al., 2010). Las fosfatasa son enzimas ricas en N, lo que significa que hay un acoplamiento entre los ciclos P y N (Marklein y Houlton, 2012). La actividad fosfomonoesterasa alcalina (FME-K) es particularmente relevante en el estudio y evaluación de un proceso de compostaje, ya que sólo es sintetizada por microorganismos (Burns, 1982). Los niveles de actividad de esta enzima no sufren prácticamente variaciones en pilas de compostaje mal gestionadas, mientras que sí pueden observarse cambios significativos en procesos que evolucionan de forma adecuada (Godden et al., 1986). La actividad fosfomonoesterasa alcalina mostró un comportamiento irregular basado en las diferentes materias primas utilizadas por cada empresa (Artículo 2, Figura 5 a-e). Los resultados indicaron que los valores más altos de fosfomonoesterasa alcalina se detectaron durante la fase biooxidativa para los procesos derivados de Residuos Vegetales, Lodos de Depuradora y Alpeorujó, mientras que este efecto se detectó durante la fase de maduración en el caso de los Residuos Agroalimentarios. Contrariamente a lo anterior, la actividad de fosfomonoesterasa alcalina no varió significativamente cuando se procesaron Residuos Sólidos Urbanos. Este comportamiento irregular de la actividad fosfomonoesterasa alcalina fue apoyado por Jurado et al. (2014), quienes revelaron picos de esta actividad en la fase termófila y después, al final del proceso. Por otro lado, según Cunha-Queda et al. (2007), esta

actividad aumentó al final del proceso debido a la naturaleza de las materias primas, mientras que Albrecht et al. (2010) detectaron que dicha actividad fosfomonoesterasa disminuyó a medida que avanzaba el proceso. Es, por tanto, evidente, que el comportamiento irregular observado por parte de la actividad fosfomonoesterasa alcalina es dependiente de los materiales de partida utilizados en cada proceso.

Las lipasas microbianas catalizan tanto la hidrólisis como la síntesis de acilglicerolos de cadena larga. En general, la producción de lipasa está influenciada por el tipo y la concentración de fuentes de carbono y nitrógeno y otros parámetros fisicoquímicos (Andualema y Gessesse, 2012). En este trabajo, la actividad lipasa tendió a disminuir al final del proceso de compostaje. Jurado et al. (2014) y Cunha-Queda et al. (2007) detectaron este mismo comportamiento, en términos generales, excepto en los procesos preparados a base de Alpeorajo, donde se detectó un aumento importante de esta actividad durante la fase de maduración. Este efecto podría deberse a un aporte accidental de materia orgánica al final de los procesos.

Las diferencias observadas en relación a las actividades enzimáticas analizadas podrían deberse, no solo a la naturaleza de los materiales y a la heterogeneidad de los tratamientos, sino también a los criterios de madurez y estabilidad del compost final, aplicados por cada empresa. Trabajos anteriores respaldan que las diferencias a nivel enzimático de los procesos de compostaje a escala industrial se deben principalmente a la complejidad de los materiales y la entrada de material fresco en fases avanzadas del proceso de biotransformación (Tiquia, 2002; Estrella-González et al., 2019). Las condiciones operacionales podrían también influir en la evolución de la actividad enzimática en el interior de las pilas y, en consecuencia, en el tiempo necesario para alcanzar un grado de estabilidad y madurez adecuados.

Tradicionalmente, la calidad de un compost se ha determinado mediante un grupo de parámetros físico-químicos, como son el contenido en Materia Orgánica, el ratio C/N, la humedad, la relación húmicos/fúlvicos, o la relación amonio/nitrato, actividad enzimática, indicadores respirométricos o incluso índices de fitotoxicidad (Castaldi et al., 2008). Sin embargo, debido a la gran diversidad de materias primas y a los diferentes protocolos de compostaje que se aplican, es necesario establecer índices de calidad más precisos y específicos (Martínez et al., 2016). Durante la fase de maduración de un proceso de compostaje, se lleva a cabo la estabilización y la humificación de los materiales, obteniéndose, en teoría, un producto exento de toxicidad. En caso contrario, la inestabilidad e inmadurez de un compost podría causar serios problemas de fitotoxicidad, así como el agotamiento de los suelos de cultivo. Por lo tanto, determinar el grado de madurez de un compost a través de indicadores apropiados podría ser de gran interés para controlar la calidad del producto (Jurado et al., 2015).

Durante el proceso de compostaje, la liberación de compuestos que se incorporan a las rutas de humificación se produce a través de numerosas reacciones de reorganización y condensación molecular (Alburquerque et al., 2009). Este hecho conduce a la formación de compuestos más humificados. En este sentido, se sabe que la lignina juega un papel esencial en los procesos de humificación de los residuos lignocelulósicos, ya que la degradación parcial de esta molécula compleja puede dar lugar a la estructura básica de las sustancias húmicas, así como a la liberación de sustancias aromáticas y subproductos fenólicos (Alburquerque et al., 2009; Jurado et al., 2015). Todos estos fenómenos contribuyen a aumentar el contenido de sustancias humificadas durante la fase de maduración del proceso de compostaje. Sin embargo, el tipo de sustancias humificadas (ácido húmico o fúlvico) y la velocidad de generación de las mismas puede variar mucho según los materiales de partida.

En este trabajo, aunque la observación del grado de humificación es más relevante en la fase de maduración, tales parámetros se analizaron tanto al principio como al final de los procesos de compostaje, con objeto de comparar los resultados entre la fase inicial y final. Así, los principales parámetros analizados para determinar la evolución de la dinámica de humificación de los procesos fueron carbono elemental y orgánico (CE y COT), así como los datos relacionados con el porcentaje de carbono no humificado (C_{NH}), la relación húmicos/fúlvicos (C_{AH}/C_{AF}), y la tasa de humificación (HR), (Artículo 1, Tabla 2). Una vez más, se observaron tendencias muy diferentes en función de las materias primas. Como se esperaba, los valores de carbono orgánico y elemental disminuyeron en todos los procesos de compostaje. Muchos autores han propuesto la pérdida de carbono como un parámetro que puede servir como un indicador indirecto del grado de madurez del compost (Jurado et al., 2015). En términos generales, los valores de carbono no humificado tendieron a disminuir durante todos los procesos de compostaje analizados, con la excepción del proceso elaborado a partir de Residuos Vegetales. Por otro lado, como era de esperar, la relación C_{AH}/C_{AF} aumentó en la fase final, principalmente en el caso de los procesos elaborados a partir de Residuos Sólidos Urbanos, Residuos Agroalimentarios y Alpeorujo. La relación C_{AH}/C_{AF} se ha propuesto tradicionalmente como un indicador importante de la estabilidad del compost, ya que debe ser mayor en los compost maduros (Iglesias-Jiménez et al., 2008; Azim et al., 2017). En comparación con los ácidos fúlvicos, los ácidos húmicos derivan principalmente de una fracción más compleja de la materia orgánica. La fracción húmica incluye compuestos que aumentan la capacidad de intercambio catiónico en los suelos (Mindari et al., 2014). Están relacionados con la fertilidad del suelo, el rendimiento del cultivo y mejora del contenido de C, N, P, K y S (Zhang et al., 2017). Mientras tanto, la fracción fúlvica se caracteriza por tener un peso molecular más bajo, un alto nivel de oxidación y una menor cantidad de C, N y P, pero también mejora la capacidad de intercambio

catiónico en el suelo. Por lo tanto, la relación C_{AH}/C_{AF} refleja el grado de polimerización en materiales de naturaleza húmica. De acuerdo con Iglesias-Jiménez et al. (2008), los valores de C_{AH}/C_{AF} superiores a 1 son indicadores de humificación, mientras que los valores de C_{AH}/C_{AF} superiores a 1,6 indican que el producto ya se encuentra maduro. En este trabajo, el mayor grado de humificación se obtuvo en el caso de los procesos elaborados a partir de Alpeorujó.

Durante el compostaje, el contenido en carbono orgánico total disminuye, mientras que el contenido relativo de compuestos húmicos aumenta. Varios autores defienden que la tasa de humificación (HR) es un indicador efectivo de la formación de sustancias húmicas durante el proceso de compostaje, pudiendo establecer con precisión el momento de la estabilización completa (Tittarelli et al., 2002). De acuerdo con Roletto et al. (1985), el valor mínimo de HR para un compost maduro debería ser 7. En este trabajo, la tasa de humificación se incrementó en el caso de los procesos elaborados a partir de Residuos Vegetales, Lodos de Depuradora y Residuos Agroalimentarios, mientras que en el caso de los procesos elaborados a partir de Alpeorujó, se detectó una disminución en la tasa de humificación. Este fenómeno podría deberse al hecho de que los valores de HR dependen del contenido en carbono orgánico total de las muestras y, probablemente, pudo ocurrir la entrada de material fresco hacia el final del proceso, deteniendo el proceso de mineralización. Los resultados observados para todos los procesos de compostaje analizados coinciden en que, durante la degradación de diferentes materiales, la cantidad de compuestos no humificados (C_{NH}) se redujo significativamente con el tiempo, excepto en el caso de los procesos elaborados a partir de Restos Vegetales.

Durante el compostaje, las fracciones solubles de nitrógeno comprenden una mezcla de amonio, NO_2^- , NO_3^- , aminoácidos y péptidos. Los microorganismos proteolíticos y amonificantes prevalecen durante las etapas iniciales del compostaje, dando lugar a la liberación de amonio y proteínas solubles, mientras que la nitrificación predomina durante la fase de maduración (Guardia et al., 2010). Los resultados obtenidos para las proteínas totales, $N-NH_4^+$ y $N-NO_3^-$ se muestran en la Figura 2 (Artículo 2), en función de cada tipo de materia prima. Las proteínas totales, en términos generales, disminuyeron durante el proceso. La disminución más pronunciada se observó en Residuos Agroalimentarios. Estos resultados siguen una tendencia similar a la descrita por López-González et al. (2013). De acuerdo con Sánchez-Monedero et al. (2001) el nivel de $N-NH_4^+$ puede utilizarse, junto con otros parámetros, como un indicador de la estabilidad del compost. Así, se deben detectar bajas concentraciones de $N-NH_4^+$ en muestras de compost consideradas maduras. Sin embargo, la concentración de $N-NH_4^+$ aumentó de forma general al final de los procesos de compostaje analizados. Este aumento fue

progresivo y constante para los procesos elaborados a base de Lodos de Depuradora, Residuos Agroalimentarios y Alpeorujo, mostrando un comportamiento más irregular en el caso de los procesos derivados de Residuos Vegetales y Residuos Sólidos Urbanos. Estos valores fueron similares a los obtenidos por López-González et al. (2013). Por otra parte, de acuerdo con Tognetti et al. (2007), los valores de N-NO_3^- también se incrementaron a lo largo del proceso de compostaje. Vale la pena destacar un aumento significativo en la fracción de N-NO_3^- en el tiempo en el caso de los procesos derivados de Residuos Sólidos Urbanos, Residuos Agroalimentarios y Alpeorujo.

A lo largo del proceso de compostaje, pueden producirse pérdidas de nitrógeno debido a la volatilización del amoníaco y a fenómenos de lixiviación (Zhang y Sun, 2016). La Figura 3 (Artículo 2) muestra el porcentaje de pérdida de nitrógeno en los diferentes procesos de compostaje. De acuerdo con Sánchez-Monedero et al. (2001) el porcentaje de pérdida de nitrógeno depende de la composición inicial de las materias primas utilizadas. En este trabajo, las mayores pérdidas de nitrógeno ocurrieron en la fase de maduración en los procesos derivados de Residuos Vegetales y Lodos de Depuradora. Estos resultados están avalados por Sánchez-García et al. (2015), quienes analizaron diferentes mezclas que mostraron elevadas pérdidas de nitrógeno. En el caso de los procesos derivados de Residuos Sólidos Urbanos, Residuos Agroalimentarios y Alpeorujo, las mayores pérdidas se observaron en las fases termófila, enfriamiento y maduración, respectivamente. Durante las etapas más avanzadas de maduración, las pérdidas de nitrógeno fueron menos notables en los procesos derivados de Residuos Sólidos Urbanos y Residuos Agroalimentarios. En este caso, la disminución en las pérdidas de nitrógeno pudo deberse a la transformación de N-NH_4^+ en N-NO_3^- , evitando así pérdidas debido a la volatilización de amonio (Zhang y Sun, 2016), o incluso a la entrada de nuevos materiales frescos.

En realidad, la relación $\text{N-NH}_4^+/\text{N-NO}_3^-$ (índice de nitrificación) podría ser más útil a la hora de conocer el grado de madurez de un determinado compost (Onwosi et al., 2017). El índice de nitrificación en un proceso de compostaje debe disminuir conforme avanza el mismo, de forma que se puede catalogar el compost como completamente maduro (índice de nitrificación de 0,5), maduro (por encima de 0.5 a 3.0) o inmaduro (por encima de 3.0). De acuerdo con esta clasificación, los productos finales derivados del compostaje de Residuos Vegetales, Residuos Sólidos Urbanos y Alpeorujo podrían considerarse como compuestos totalmente maduros, mientras que los derivados de Lodos de Depuradora y Residuos Agroalimentarios, podrían considerarse como parcialmente maduros. Sin embargo, de acuerdo con las reglas más estrictas de Bernal et al. (1998), una relación $\text{N-NH}_4^+/\text{N-NO}_3^- < 0.16$ significa que el compost está

completamente maduro, valor que únicamente cumplirían los productos obtenidos a partir de los procesos derivados de Alpeorujó.

Además del nivel de madurez, para establecer la calidad de un compost, algunos autores consideran de gran relevancia algunos parámetros de estabilidad biológica y fitotoxicidad (Adani et al., 2001; Barrena-Gómez et al., 2006; Barrena et al., 2009; Cesaro et al., 2019). En este sentido, valores de Índice de Germinación (IG) inferiores al 50% se consideran un signo de fitotoxicidad e inmadurez. El nivel de fitotoxicidad se considera moderado cuando el IG se encuentra alrededor del 50-80%, mientras que un compost podría considerarse no fitotóxico y maduro cuando el IG está entre 80 y 100%. Los valores IG superiores al 100% son indicadores de un efecto fitostimulante del compost. Por otro lado, el consumo de oxígeno acumulado durante 4 días (AT_4) podría tenerse en cuenta como un parámetro de estabilidad adecuado, directamente relacionado con la actividad microbiana dentro de las pilas de compostaje. Así, valores de AT_4 excesivamente altos podrían influir en la naturaleza tóxica de las muestras y afectar negativamente al valor de IG. Este efecto también se ha descrito cuando el contenido en compuestos fenólicos es demasiado elevado (Said-Pullicino et al., 2007). En la Figura 1 (Artículo 3), el compost que presentó un mayor efecto fitotóxico fue el obtenido a partir de Residuos Vegetales y Residuos Sólidos Urbanos (IG promedio menor al 50%). El compost de Lodos de Depuradora y Alpeorujó se consideró maduro, mostrando valores promedio de IG entre 80 y 100%, mientras que el compost derivado de Residuos Agroalimentarios resultó ser fitoestimulante (promedio de IG superior al 100%). En términos generales, los mejores valores coincidieron con el promedio más bajo de contenido de compuestos fenólicos y valores de AT_4 . Sin embargo, a la vista de los resultados obtenidos en este trabajo, no se puede confirmar dicha correlación ya que podría estar influenciada por otros factores diferentes, como el contenido de ácidos orgánicos, la presencia de compuestos volátiles o metales pesados, sales, así como las diferencias en la estructura química o el carácter hidrofóbico de los diferentes compuestos fenólicos presentes en las muestras (Barral y Paradelo, 2011; Pinho et al., 2017).

Hasta hace relativamente pocos años, los estudios de biodiversidad de las pilas de compostaje se basaban en el análisis de la microbiota cultivable (López-González et al., 2015); sin embargo, especialmente en la última década, ha sido imprescindible abordar un análisis más profundo y cercano a la realidad mediante técnicas más avanzadas como son la electroforesis en gel de gradiente desnaturizante (PCR-DGGE) (Wang et al., 2015), o los análisis de metagenómica funcional, los cuáles han ayudado al establecimiento de determinados indicadores de biodiversidad fúngica y bacteriana. El índice de biodiversidad Chao1 es generalmente útil para conocer la riqueza de especies,

mientras que el índice de Shannon está más relacionado con la abundancia. Durante la última década, numerosos autores han utilizado ambos índices para conocer la biodiversidad de los procesos de compostaje y de los productos obtenidos (Liu et al., 2018; De Corato et al., 2019; Zhao et al., 2019).

Los valores de los índices Chao1 y Shannon para la comunidad bacteriana se representan en la Figura 3 a,b (Artículo 3). Los valores más elevados se obtuvieron en las muestras de Residuos Agroalimentarios, con un índice Chao1 medio de alrededor de 4000 y un índice Shannon medio cercano a 9. Por otro lado, los valores medios de diversidad en el resto de las muestras analizadas no fueron notablemente diferentes, oscilando entre 2500 y 3000, en el caso del índice Chao1, mientras que la media del índice de Shannon fluctuó entre 7 y 8. Hay que destacar una mayor dispersión de los datos en el caso de las muestras de Residuos Sólidos Urbanos, Lodos de Depuradora y Residuos Agroalimentarios, lo que podría estar relacionado con una mayor heterogeneidad en la composición de las pilas de compostaje, así como en los protocolos operativos. A pesar de las diferencias detectadas según los diferentes procesos y materiales analizados, los resultados revelaron una comunidad bacteriana muy diversa en todos los casos. Los valores de Shannon fueron incluso más altos que los obtenidos por Liu et al. (2018) después de 22 días desde el inicio del proceso de compostaje. Estos autores determinaron que la biodiversidad en las muestras de compost puede verse afectada por el tamaño de partícula inicial, así como por la aplicación de celulosa comercial o de inóculos microbianos específicos. Por otra parte, la diversidad fúngica (Figuras 3 c,d, Artículo 3) fue notablemente inferior a la diversidad bacteriana. Con respecto al índice Chao1, los valores fueron aproximadamente diez veces más bajos que los correspondientes a las comunidades bacterianas. El índice Chao1 medio fue menor en las muestras de Residuos Vegetales (alrededor de 150), mientras que estos valores oscilaron entre 400 y 500 en el resto de las muestras. La media del índice de Shannon en hongos fue mayor en Lodos de Depuradora, Residuos Agroalimentarios y Alpeorajo, oscilando entre 4 y 5, coincidiendo con el rango establecido por otros autores (De Corato et al., 2019; Zhao et al., 2019). Las muestras procedentes de procesos a base de Residuos Sólidos Urbanos y Residuos Vegetales mostraron un nivel muy bajo de diversidad fúngica.

Teniendo en cuenta la heterogeneidad de los diferentes procesos, los resultados relativos al perfil metagenómico de las muestras (Artículo 3, Figuras 4 y 5), fueron prácticamente únicos y exclusivos para cada proceso. Trabajos previos respaldan los resultados obtenidos aquí con respecto a la metagenómica bacteriana y fúngica de materiales compostados (Langarica-Fuentes et al., 2014; Silva et al., 2016). En términos generales, los Phyla bacterianos más representativos fueron Firmicutes (44,8%),

Bacteroidetes (28,7%), Proteobacteria (15,2%) y Actinobacteria (11,3%) (datos no mostrados), siendo las familias *Rhodospirillaceae*, *Bacillaceae*, *Flavobacteriaceae* y *Nocardiopsaceae* las familias más ampliamente distribuidas. Éstas estuvieron presentes en todos los tipos de muestras, pero en diferentes proporciones. Por el contrario, la familia *Chitinophagaceae* estuvo presente exclusivamente en muestras derivadas de procesos a base de Residuos Agroalimentarios, aunque no en todos los procesos; la familia *Marinilabiaceae*, sólo fue detectada en muestras derivadas de una de las empresas dedicadas al compostaje de Alpeorujo, y la familia *Lactobacillaceae*, casi exclusiva de muestras procedentes de Residuos Sólidos Urbanos. Los miembros de la familia *Flavobacteraceae* participan en la degradación de macromoléculas como la celulosa y la quitina. De acuerdo con Fracchia et al. (2006) este grupo de bacterias es dominante en compost maduros y en vermicompost. Del mismo modo, el grupo de las actinobacterias (donde cabe destacar las familias *Nocardiopsaceae* y *Corynebacteriaceae*), juega un papel muy importante en las etapas posteriores del proceso de compostaje (Tian et al., 2013) por lo que resultó atípico encontrarlo en un nivel tan bajo en algunas muestras de compost. Por su parte el Phylum Proteobacteria estuvo representado por las familias *Rhodospirillaceae*, *Idiomarinaceae*, *Halomonadaceae* y *Pseudomonadaceae*. La mayoría de ellas son típicos de los procesos de compostaje, y podrían detectarse en diferentes etapas del proceso (Silva et al., 2016). En cuanto a la abundancia de hongos, Ascomycota fue el Phylum más representativo (97,2%). La familia mayoritaria fue *Microascaceae*, detectándose en todas las muestras analizadas. *Trichocomaceae* fue la segunda familia más abundante pero no se detectó en todas las muestras. Por otro lado, el filo Basidiomycota solo representó 2,1% del total, siendo *Trichosporonaceae* la única familia representante. Estos resultados concuerdan con los encontrados por Langarica-Fuentes et al. (2014, 2015).

A la vista de los resultados obtenidos en esta Tesis Doctoral, es evidente que existe un grave problema derivado de la falta de homogeneidad y repetitividad de los procesos de compostaje a escala industrial. Aunque se han realizado numerosos intentos para predecir la calidad del compost en función de diferentes parámetros tradicionales, los últimos avances metagenómicos revelan la complejidad de esta predicción, ya que la biodiversidad microbiana puede ser casi exclusiva de cada proceso. Se podría concluir con este trabajo, que la calidad de un compost no solo puede ser medida en términos fisicoquímicos, sino que también es necesario tener en cuenta otros parámetros biológicos, entre ellos actividad enzimática, fitotoxicidad y consumo de oxígeno, así como la naturaleza "biodiversa" de cada proceso de compostaje.

REFERENCIAS

- Adani, F., Lozzi, P., Genevini, P. 2001. Determination of biological stability by oxygen uptake on municipal solid waste and derived products. *Compost Science & Utilization*, 9(2), 163-178.
- Agnew, J.M., Leonard, J.J. 2003. The Physical Properties of Compost. *Compost Science & Utilization*, 11, 238-264.
- Albrecht, R., Le Petit, J., Calvert, V., Terrom, G., Périsol, C. 2010. Changes in the level of alkaline and acid phosphatase activities during green wastes and sewage sludge co-composting. *Bioresource Technology*, 101(1), 228-233.
- Alburquerque, J.A., De La Fuente, C., Bernal M.P., 2011. Improvement of soil quality after “alperujo” compost application to two contaminated soils characterised by differing heavy metal solubility. *Journal of Environmental Management*, 92(3), 733-741.
- Alburquerque, J.A., González, J., Tortosa, G., Baddi, G.A., Cegarra, J. 2009. Evaluation of “alperujo” composting based on organic matter degradation, humification and compost quality. *Biodegradation*, 20 (2), 257-270.
- Ameen, A., Ahmad, J., Raza, S. 2016. Effect of pH and moisture content on composting of Municipal solid waste. *Int. J. Sci. Res. Publ.* 6(5), 35-37.
- Amira, D., Roshanida, A.R., Rosli, M.I. 2012. Effects of xylanase and cellulase production during composting of EFB and POME using fungi. *International Journal of Biological, Biomolecular Agricultural, Food and Biotechnological Engineering*, 6, 340-343.
- Andualema, B., Gessesse, A. 2012. Microbial lipases and their industrial applications. *Biotechnology*, 11(3), 100.
- Azim, K., Soudi, B., Boukhari, S., Perissol, C., Roussos, S., Thami Alam, I. 2017. Composting parameters and compost quality: a literature review. *Organic Agriculture*, 8 (2), 141-158.
- Bao, Y., Zhou, Q., Guan, L. 2008. Allantoin-N concentration changes and analysis of the influencing factors on its changes during different manure composting. *Bioresource Technology*, 99, 8759-8764.
- Barral, T., Paradelo, R. 2011. A review on the use of phytotoxicity as a compost quality indicator. *Dyn. Soil Dyn. Plant (Special Issue 2)*, 36-44.
- Barrena-Gómez, R., Lima, F.V., Ferrer, A.S. 2006. The use of respiration indices in the composting process: a review. *Waste Management & Research*, 24(1), 37-47.
- Barrena, R., d'Imporzano, G., Ponsá, S., Gea, T., Artola, A., Vázquez, F., Sánchez, A., Adani, F. 2009. In search of a reliable technique for the determination of the biological

stability of the organic matter in the mechanical–biological treated waste. *Journal of Hazardous Materials*, 162(2-3), 1065-1072.

Barrington, S., Choiniere, D., Trigui, M., Knight, W. 2002. Effect of carbon source on compost nitrogen and carbon losses. *Bioresource Technology*, 83, 189-194.

Bernal, M.P., Paredes, C., Sánchez-Monedero, M.A., Cegarra, J. 1998. Maturity and stability parameters of composts prepared with a wide range of organic wastes. *Bioresource Technology*, 63(1), 91-99.

BOE-A-2017-14332, 2017. Real Decreto 999/2017. Regulación española sobre productos fertilizantes.

Burns, R. G. 1982. Enzyme activity in soil: location and a possible role in microbial ecology. *Soil Biology and Biochemistry*, 14(5), 423-427.

Castaldi, P., Garau, G., Melis, P. 2008. Maturity assessment of compost from municipal solid waste through the study of enzyme activities and water-soluble fractions. *Waste Management*, 28, 534–540.

Cesaro, A., Conte, A., Belgiorno, V., Siciliano, A., Guida, M. 2019. The evolution of compost stability and maturity during the full-scale treatment of the organic fraction of municipal solid waste. *Journal of Environmental Management*, 232, 264-270.

Cunha-Queda, A.C., Ribeiro, H.M., Ramos, A., Cabral, F. 2007. Study of biochemical and microbiological parameters during composting of pine and eucalyptus bark. *Bioresource Technology*, 98(17), 3213-3220.

De Corato, U., Patrino, L., Avella, N., Lacolla, G., Cucci, G. 2019. Composts from green sources show an increased suppressiveness to soilborne plant pathogenic fungi: Relationships between physicochemical properties, disease suppression, and the microbiome. *Crop Protection*, 124, 104870.

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.

EPA, 2003. Environmental Regulations and Technology. Control of Pathogens and Vector Attraction in Sewage Sludge. EPA625-R-92-013. Environmental Protection Agency, USA.

Fernández-Gómez, M.J., Díaz-Raviña, M., Romero, E., Nogales, R. 2013. Recycling of environmentally problematic plant wastes generated from greenhouse tomato crops through vermicomposting. *International Journal of Environmental Science and Technology*, 10(4), 697-708.

Fracchia, L., Dohrmann, A.B., Martinotti, M.G., Tebbe, C.C. 2006. Bacterial diversity in a finished compost and vermicompost: differences revealed by cultivation-independent

analyses of PCR-amplified 16S rRNA genes. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 71(6), 942.

Francou, C., Linères, M., Derenne, S., Le Villo-Poitrenaud, M., Houot, S. 2008. Influence of green waste, biowaste and paper-cardboard initial ratios on organic matter transformations during composting. *Bioresource Technology*, 99 (18), 8926-8934.

Godden, B., Penninckx, M.J., Castille, C. 1986. On the use of biological and chemical indexes for determining agricultural compost maturity: extension to the field scale. *Agricultural Wastes*, 15(3), 169-178.

Guardia, A.D., Mallard, P., Teglia, C., Marin, A., Le Pape, C., Launay, M., Benoist, J.C., Petiot, C. 2010. Comparison of five organic wastes regarding their behaviour during composting: part 2, nitrogen dynamic. *Waste Management*, 30(3), 415-425.

Guo, R., Li, G.X., Jiang, T., Schuchardt, F., Chen, T.B., Zhao, Y.Q., Shen, Y.J. 2012. Effect of aeration rate, C/N ratio and moisture content on the stability and maturity of compost. *Bioresource Technology*, 112, 171–178.

Haddadin, M. S., Haddadin, J., Arabiyat, O. I., Hattar, B. 2009. Biological conversion of olive pomace into compost by using *Trichoderma harzianum* and *Phanerochaete chrysosporium*. *Bioresource Technology*, 100(20), 4773-4782.

Iglesias-Jiménez, E., Barral, M.T., Marhuenda, F.C. 2008. Indicadores de la estabilidad y madurez del compost, in: Moreno, J., Moral, R. (Eds.), *Compostaje*. Mundi- Prensa, Madrid, Spain, pp. 243-283.

Jones, D.L., Shannon, D., Murphy, D.V., Farrar, J. 2004. Role of dissolved organic nitrogen (DON) in soil N cycling in grassland soils. *Soil Biology and Biochemistry*, 36, 749-756.

Jurado, M.M., Suárez-Estrella, F., Vargas-García, M.C., López, M.J., López-González, J.A., Moreno, J., 2014. Evolution of enzymatic activities and carbon fractions throughout composting of plant waste. *Journal of Environmental Management*, 133, 355-364.

Jurado, M.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.

Langarica-Fuentes, A., Zafar, U., Heyworth, A., Brown, T., Fox, G., Robson, G.D. 2014. Fungal succession in an in-vessel composting system characterized using 454 pyrosequencing. *FEMS Microbiology Ecology*, 88(2), 296-308.

Langarica-Fuentes, A., Fox, G., Robson, G.D. 2015. Metabarcoding analysis of home composts reveals distinctive fungal communities with a high number of unassigned sequences. *Microbiology*, 161(10), 1921-1932.

Linhardt, K., Walter, K. 1965. Phosphatases (phosphomonoesterases). In: Bergmeyer, H.U., *Methods of enzymatic analysis*. Academic Press, New York, pp. 779-787.

Liu, D., Zhang, R., Wu, H., Xu, D., Tang, Z., Yu, G., Xu, Z., Shen, Q. 2011. Changes in biochemical and microbiological parameters during the period of rapid composting of dairy manure with rice chaff. *Bioresource Technology*, 102(19), 9040-9049.

Liu, L., Wang, S., Guo, X., Zhao, T., Zhang, B. 2018. Succession and diversity of microorganisms and their association with physicochemical properties during green waste thermophilic composting. *Waste Management*, 73, 101-112.

López-González, J.A., López, M.J., Vargas-García, M.C., Suárez-Estrella, F., Jurado, M.M., Moreno, J. 2013. Tracking organic matter and microbiota dynamics during the stages of lignocellulosic waste composting. *Bioresource Technology*, 146, 574-584.

López-González, J.A., Vargas-García, M.C., López, M.J., Suárez-Estrella, F., Jurado, M.M., Moreno, J. 2015. Biodiversity and succession of mycobiota associated to agricultural lignocellulosic waste-based composting. *Bioresource Technology*, 187, 305-313.

Malherbe, S., Cloete, T. E. 2002. Lignocellulose biodegradation: fundamentals and applications. *Reviews in Environmental Science and Biotechnology*, 1(2), 105-114.

Marklein, A.R., Houlton, B.Z. 2012. Nitrogen inputs accelerate phosphorus cycling rates across a wide variety of terrestrial ecosystems. *New Phytologist*, 193(3), 696-704.

Martínez, M., Ortega, R., Janssens, M., Angulo, J., Fincheira, P. 2016. Selection of maturity indices for compost derived from grape pomace. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*, 16 (2), 262-267.

Mindari, W., Aini, N., Kusuma, Z., Syekhfani, S. 2014. Effects of humic acid-based cation buffer on chemical characteristics of saline soils and maize growth. *Journal of Degraded and Mining Lands Management*, 2 (1), 259-268.

Pinho, I.A., Lopes, D.V., Martins, R.C., Quina, M.J. 2017. Phytotoxicity assessment of olive mill solid wastes and the influence of phenolic compounds. *Chemosphere*, 185, 258-267.

Onwosi, C.O., Igbokwe, V.C., Odimba, J.N., Eke, I.E., Nwankwoala, M.O., Iroh, I.N., Ezeogu, L.I. 2017. Composting technology in waste stabilization: on the methods, challenges and future prospects. *Journal of Environmental Management*, 190, 140-157.

Roletto, E., Barberis, R., Consiglio, M., Jodice, R. 1985. Chemical parameters for evaluating compost maturity. *BioCycle*, 26, 46-47.

Said-Pullicino, D., Erriquens, F. G., Gigliotti, G. 2007. Changes in the chemical characteristics of water-extractable organic matter during composting and their influence on compost stability and maturity. *Bioresource Technology*, 98(9), 1822-1831.

Sánchez-García, M., Albuquerque, J.A., Sánchez-Monedero, M.A., Roig, A., Cayuela, M.L. 2015. Biochar accelerates organic matter degradation and enhances N mineralisation during composting of poultry manure without a relevant impact on gas emissions. *Bioresource Technology*, 192, 272-279.

Sánchez-Monedero, M.A., Roig, A., Paredes, C., Bernal, M.P. 2001. Nitrogen transformation during organic waste composting by the Rutgers system and its effects on pH, EC and maturity of the composting mixtures. *Bioresource Technology*, 78, 301-308.

Sepehri, A., Sarrafzadeh, M.H. 2018. Effect of nitrifiers community on fouling mitigation and nitrification efficiency in a membrane bioreactor. *Chemical Engineering and Processing Process Intensification*, 128, 10–18.

Silva, M.E.F., Lemos, L.T., Bastos, M.M.S.M., Nunes, O.C., Cunha-Queda, A.C. 2013. Recovery of humic-like substances from low quality composts. *Bioresource Technology*, 128, 624-632.

Silva, M.E.F., Lopes, A.R., Cunha-Queda, A.C., Nunes, O.C. 2016. Comparison of the bacterial composition of two commercial composts with different physicochemical, stability and maturity properties. *Waste Management*, 50, 20-30.

Song, U., Lee, E.J. 2010. Environmental and economical assessment of sewage sludge compost application on soil and plants in a landfill. *Resources, Conservation and Recycling*, 54(12), 1109-1116.

Stentiford, E.I. 1996. *Composting Control: Principles and Practice. The Science of Composting*. Springer, Dordrecht, pp. 49-59.

Sudkolai, S.T., Nourbakhsh, F. 2017. Urease activity as an index for assessing the maturity of cow manure and wheat residue vermicomposts. *Waste Management*, 64, 63-66.

Tian, W., Sun, Q., Xu, D., Zhang, Z., Chen, D., Li, C., Shen, Q., Shen, B. 2013. Succession of bacterial communities during composting process as detected by 16S rRNA clone libraries analysis. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 78, 58-66.

Tiquia, S.M. 2002. Evolution of extracellular enzyme activities during manure composting. *Journal of Applied Microbiology*, 92(4), 764-775.

Tittarelli, F., Trinchera, A., Intrigliolo, F., Benedetti, A. 2002. Evaluation of organic matter stability during the composting process of agroindustrial wastes, in: *Microbiology of composting*. Springer, Berlin, Heidelberg, pp. 397-406.

Tognetti, C., Mazzarino, M.J., Laos, F. 2007. Improving the quality of municipal organic waste compost. *Bioresource Technology*, 98(5), 1067-1076.

Vargas-García, M.C., Suárez-Estrella, F., López, M.J., Moreno, J. 2010. Microbial population dynamics and enzyme activities in composting processes with different starting materials. *Waste Management*, 30(5), 771-778.

Wang, X., Cui, H., Shi, J., Zhao, X., Zhao, Y., Wei, Z. 2015. Relationship between bacterial diversity and environmental parameters during composting of different raw materials. *Bioresource Technology*, 198, 395-402.

Yadav, A., Garg, V.K. 2011. Recycling of organic wastes by employing *Eisenia fetida*. *Bioresource Technology*, 102(3), 2874-2880.

Wang, H.Y., Fan, B.Q., Hu, Q.X., Yin, Z.W. 2011. Effect of inoculation with *Penicillium expansum* on the microbial community and maturity compost. *Bioresource Technology*, 102, 11189-11193.

Wang, S., Zeng, Y. 2017. Ammonia emission mitigation in food waste composting: a review. *Bioresource Technology*, 248, 13-19.

Wei, Y., Wu, D., Wie, D., Zhao, Y., Wu, J., Xie, X., Zhang, R., Wei, Z. 2019. Improved lignocellulose-degrading performance during Straw composting from diverse sources with actinomycetes inoculation by regulation the key enzyme activities. *Bioresource Technology*, 271, 66-74.

Zhang, L., Sun, X. 2016. Influence of bulking agents on physical, chemical, and microbiological properties during the two-stage composting of green waste. *Waste Management*, 48, 115–126.

Zhang, J., Wang, J., An, T., Wei, D., Chi, F., Zhou, B. 2017. Effects of long-term fertilization on soil humic acid composition and structure in black Soil. *PLoS One*, 12 (11), e0186918.

Zhao, X., Wei, Y., Zhang, F., Tan, W., Fan, Y., Xi, B. 2019. How do fungal communities and their interaction with bacterial communities influence dissolved organic matter on the stability and safety of sludge compost? *Environmental Science and Pollution Research*, 26(4), 4141-4146.

Zhu, L., Yang, H., Zhao, Y., Kang, K., Liu, Y., He, P., Wu, Z., Wei, Z. 2019. Biochar combined with montmorillonite amendments increase bioavailable organic nitrogen and reduce nitrogen loss during composting. *Bioresource Technology* 294, 122224.

CONCLUSIONES

6. Conclusiones

Los resultados obtenidos en la presente Tesis Doctoral permitieron extraer las siguientes conclusiones:

i) A la vista de los resultados obtenidos, es evidente que ciertos parámetros tradicionales de seguimiento y control del proceso de compostaje no evolucionan de forma estándar cuando se trata de procesos de compostaje a escala industrial, lo que podría estar relacionado con la heterogeneidad de las materias primas de partida y el acondicionamiento inapropiado de las mezclas iniciales. En consecuencia, ambos aspectos podrían influir en la evolución de las actividades enzimáticas relacionadas con la dinámica de las fracciones de carbono y nitrógeno, ya que el comportamiento de éstas, en algunos casos, fue aleatorio y prácticamente específico para cada tipo de material.

ii) Hay que destacar el papel de ciertas actividades enzimáticas, como la β -glucosidasa y la amilasa, así como la relación lignina/holocelulosa, como excelentes indicadores universales para controlar el proceso de compostaje. Los perfiles observados en términos generales mostraron un comportamiento característico y casi independiente de los materiales de partida.

iii) A pesar de la disparidad de los procesos, las actividades proteasa y ureasa se mostraron estrechamente relacionadas con la actividad fosfomonoesterasa alcalina, así como con las pérdidas de nitrógeno, parámetro éste último que, a su vez, correlacionó con el perfil térmico de las pilas.

iv) Aunque se han hecho numerosos intentos para predecir la calidad de los compost en función de diferentes parámetros tradicionales, los últimos avances en metagenómica revelan la complejidad de esta predicción, ya que la diversidad microbiana puede ser casi exclusiva de cada proceso. Aun así, se intuyó una mayor biodiversidad bacteriana y fúngica en muestras de compost más estables desde un punto de vista biológico (menor consumo de oxígeno) y menos fitotóxicas (mayor índice de germinación).

v) A pesar de que los 15 procesos de compostaje evaluados muestran perfiles físico-químico-biológicos, en algunos casos, muy diferentes, fue posible obtener productos finales que cumplieran con los criterios de calidad legalmente establecidos en lo que se refiere a contenido mínimo en materia orgánica, humedad y relación C/N. Este hecho confirma la eficiencia y versatilidad de los microorganismos y enzimas, y su papel como

agentes transformadores de materia orgánica, incluso cuando la heterogeneidad de los materiales y las condiciones operacionales a escala industrial son tan diversas.