

# TRABAJO FIN DE GRADO

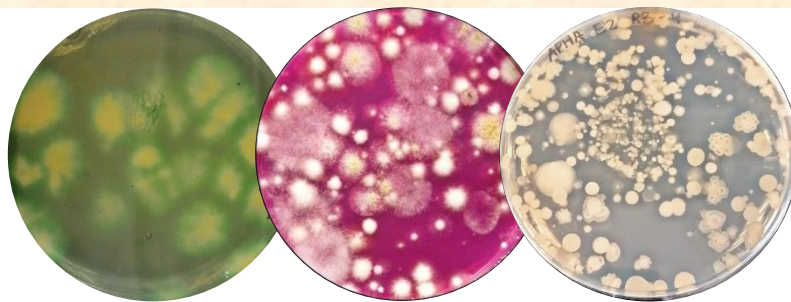
UNIVERSIDAD DE ALMERÍA

*Facultad de Ciencias Experimentales*

Curso académico: 2021-2022



## Evaluación de las funcionalidades de la microbiota asociada al compostaje del alga *Rugulopteryx okamurae*



**Autora:** Alba García Ferrer

**Tutora:** Macarena del Mar Jurado Rodríguez

**Cotutora:** María José Estrella González

**Departamento de Biología y Geología**

**ÁREA DE MICROBIOLOGÍA**

*Grado en Biotecnología*

**Junio, 2022**

## AGRADECIMIENTOS

Curiosidad. Fue lo primero que nos dijo Joaquín Moreno en la asignatura de Microbiología de primer año. Su pasión y dedicación fueron las que despertaron esa sensación en mí, la que hizo que ir a clase fuera algo más que tomar apuntes, la que te hacía querer saber más y más sobre un tema y la que, por suerte, sigo teniendo gracias a él.

En segundo lugar, dar las gracias a María José López, por su amabilidad y por la atención y ayuda que nos ha brindado en cada *Viernes a tope* para pulir las temidas exposiciones.

Quiero hacer especial hincapié en lo agradecida que estoy a Macarena, desde el primer hasta el último momento. En todos los exámenes de prácticas quería que me tocara contigo, porque siempre me has transmitido mucha tranquilidad y decía “es que es la más buena”. Y no me equivocaba, mil gracias por darme esa seguridad que me ha faltado en muchos momentos de agobio, has sacado tiempo de debajo de las piedras para que este trabajo vaya sobre ruedas, siempre con una sonrisa y una positividad contagiosa. Ya sabía que eras una buena profesora y ahora también sé con certeza, que eres una persona increíble.

Y cómo olvidarme de María José Estrella, que ha estado conmigo desde el primer día, desde aquella primera siembra que tardé mil horas en acabar, hasta la última, que ya hacía con los ojos cerrados. Me faltan palabras para agradecerte tu ayuda, por estar cualquier día a cualquier hora y no perder la paciencia con cada metedura de pata. Un millón de gracias por ser como eres y haberlo hecho todo mucho más fácil.

Esta experiencia también me ha permitido conocer a personas maravillosas, todos los integrantes del laboratorio de Microbiología, siempre dispuestos a ayudarme a resolver cualquier problema o duda como si fuera de su propio trabajo y haciendo que las horas fueran mucho más entretenidas.

Gracias a la casualidad, por permitirme conocer a “mis niñas”, lo mejor que me ha dado la UAL, cierro con ellas esta etapa, pero sé que no será la última.

Igualmente, quiero mencionar a mi familia, por confiar en mí cuando ni yo misma lo hacía y ser mi red de seguridad en los momentos de bajón, no solo durante estos cuatro años, durante toda mi vida. También a mis amigas, por seguir conmigo desde hace más de diez años y alegrarse con cada buena noticia como si fuera suya. Mi vida no sería la misma sin vosotras, sin nuestra complicidad. Gracias por dejarme ser.

Y, por último, a mis abuelos. Se me rompe el corazón y se me llena el alma cuando pienso en vosotros, os quiero.

# Índice

RESUMEN .....	4
ABSTRACT .....	5
1. INTRODUCCIÓN .....	6
1.1. Invasiones biológicas en el medio marino: el caso de <i>Rugulopteryx okamurae</i> en el Mediterráneo.....	6
1.2. Características de <i>Rugulopteryx okamurae</i> .....	9
1.2.1. Ciclo de vida .....	10
1.2.2. Características físico-químicas .....	11
1.3. Valorización de arribazones de <i>Rugulopteryx okamurae</i> mediante compostaje: de Residuo a Recurso. ....	12
1.4. Microorganismos que intervienen en el proceso de compostaje .....	15
1.4.1. Capacidad biofertilizante de los microorganismos del compost .....	17
2. OBJETIVOS.....	20
3. MATERIAL Y MÉTODOS .....	20
3.1. Materias primas y diseño experimental .....	20
3.2. Medios de cultivo .....	24
3.3. Análisis microbiológicos del ensayo .....	26
3.4. Análisis estadístico .....	29
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	29
4.1. Evaluación de la microbiota bacteriana, actinomicetal y fúngica .....	29
4.2. Cuantificación de agentes biofertilizantes .....	35
4.3. Evaluación de la microbiota funcional relacionada con el ciclo biogeoquímico del nitrógeno .....	37
4.4. Estudio de la correlación .....	43
5. CONCLUSIONES.....	45
6. BIBLIOGRAFÍA .....	46

## RESUMEN

La invasión descontrolada de los últimos años del alga parda *Rugulopteryx okamurae* en las costas del Mediterráneo ha desatado numerosos inconvenientes relacionados con la reducción de biodiversidad y la pérdida económica en el sector pesquero y del turismo. Pese a que su elevada capacidad competitiva y su desbordante crecimiento suponen una dificultad para su gestión, se ha determinado como posible solución el compostaje de la biomasa algal.

Este estudio se centró en la evaluación general de la microbiota bacteriana, actinomicetal y fúngica, así como en microorganismos con capacidad de movilización de hierro, fósforo y potasio e intermediarios del ciclo del nitrógeno asociados a un proceso de co-compostaje de *R. okamurae*. Para ello, usando como materias primas biomasa algal, restos de frutos (pimiento y calabacín), restos hortícolas y de jardinería, se desarrollaron cuatro pilas de compostaje con distintas combinaciones de los materiales anteriores. Los grupos microbianos de estos tratamientos fueron medidos en cada etapa del proceso de compostaje mediante un exhaustivo recuento empleando diferentes medios de cultivo.

Tras el análisis de los resultados se determinó la presencia en el producto final de una microbiota muy heterogénea, donde destacó una alta concentración de actinobacterias, con gran importancia por su alta capacidad enzimática. Aunque la existencia de solubilizadores de fosfato y potasio fue más limitada, se realzó la capacidad biofertilizante del compost con la notable aparición de amonificantes, nitrificantes y sideróforos. Además, la ausencia total de microbiota desnitrificante supone una ventaja considerable para el proceso.

Palabras clave: *Rugulopteryx okamurae*, compostaje, microbiota, biofertilizantes.

## ABSTRACT

The uncontrolled invasion of the brown alga *Rugulopteryx okamurae* in recent years on the Mediterranean coast has unleashed numerous problems related to the reduction of biodiversity and economic loss in the fishing and tourism sectors. Despite the fact that its high competitive capacity and its overwhelming growth pose a difficulty for its management, the composting of algal biomass has been determined as a possible solution.

This study focused on the general evaluation of the bacterial, actinomycetal and fungal microbiota in a co-composting process of *R. okamurae*, as well as on microorganisms capable of mobilizing iron, phosphorus and potassium and intermediates of the nitrogen cycle. To do this, using algal biomass, fruit remains (pepper and zucchini), horticultural and garden waste as raw materials, four composting piles with different compositions were developed. The microbial groups of these treatments were measured at each stage of composting through an exhaustive count in different culture media.

After analyzing the results, the presence in the final product of a very heterogeneous microbiota was determined, where a high concentration of actinobacteria stands out, with great importance due to its high enzymatic capacity. Although the existence of phosphate and potassium solubilizers was more limited, the biofertilizing capacity of the compost was enhanced with the notable appearance of ammonifying, nitrifying and siderophores. In addition, the total absence of denitrifying microbiota is a considerable advantage for the process.

**Keywords:** *Rugulopteryx okamurae*, composting, microbiota, biofertilizers.

## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1. Invasiones biológicas en el medio marino: el caso de *Rugulopteryx okamurae* en el Mediterráneo.

El Mar Mediterráneo (**Figura 1**) es una de las masas de agua más valiosas de nuestro planeta, capaz de conectar Europa con el continente africano y Asia. Esta zona es protagonista de intensas transacciones comerciales y culturales, además, se posiciona como un punto de interés turístico y, lo que es más importante aún, como emblema de biodiversidad gracias a la variedad de su fauna y flora (Ucha, 2013).



**Figura 1.** Mapa del Mar Mediterráneo. Fuente: Wikipedia.org

Sin embargo, en la actualidad es uno de los más contaminados del mundo, debido a la alta presencia de microplásticos e hidrocarburos. A estas dos amenazas para el equilibrio ecológico se le suma la masificación de la costa, las prácticas de acuicultura no respetuosas con el medio y la invasión por parte de especies alóctonas. Precisamente, por su localización geográfica, el Mediterráneo ha sido muy susceptible a las invasiones biológicas, de modo que, a pesar de la amplia diversidad mencionada, de las 17.000 especies presentes en el ecosistema, un 4% son consideradas invasoras. El aumento de especies exóticas es uno de los mayores peligros que sustenta el cambio ecológico que está sufriendo el Mediterráneo, tal y como afirma Espinosa (2009).

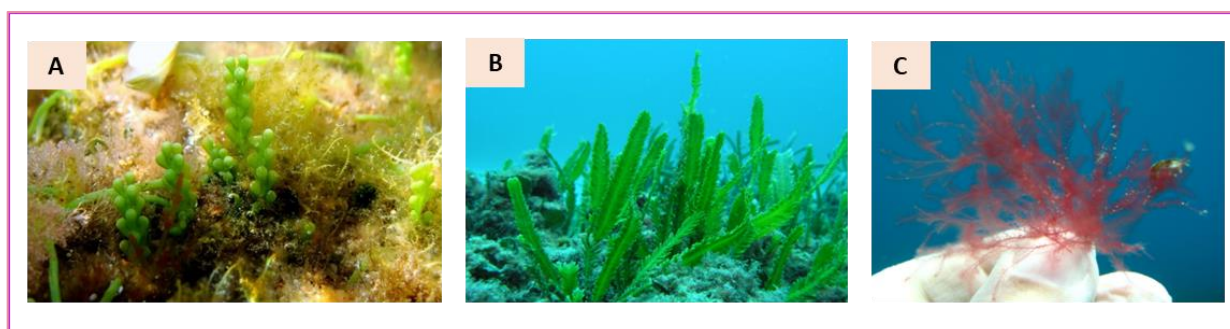
Una especie se define como exótica cuando presenta entre sus características la capacidad para colonizar nuevas áreas que previamente no había habitado y para adaptarse a ellas rápidamente. Esta invasión de zonas donde no estaba presente con anterioridad se debe a que muestra una discontinuidad geográfica con su área natural de distribución. Además, se relaciona directa o indirectamente con la actividad humana, sin embargo, no es necesaria la intervención de las personas para que dichas especies se reproduzcan exitosamente. La capacidad de rápida adaptación es otra característica propia de especies consideradas exóticas e invasoras. Asimismo, se consideran especies invasoras aquellas que son capaces de llevar a cabo la modificación de la estructura y el funcionamiento de los ecosistemas a los que migran,

amenazando así la diversidad biológica nativa y provocando consecuencias sanitarias y/o socioeconómicas negativas (Bernardeau, 2015).

En el caso del Mediterráneo, las causas más comunes de la colonización de este tipo de individuos son, principalmente, el calentamiento global, las prácticas de acuicultura y las aguas de lastre (agua tomada por buques para mantener la estabilidad del navío), y el origen más frecuente, el canal de Suez. La apertura de este último en 1869 permitió la fundación del concepto de “migración lessepsiana”, definida como la entrada de ejemplares invasores (moluscos, algas, peces, decápodos, crustáceos y poliquetos principalmente) que penetran en el Mediterráneo desde el Mar Rojo empleando como puente dicho canal (Espinosa, 2009).

Entre las especies que representan este escenario podemos destacar a *Rhopilema nomadica*, una medusa infiltrada en 1970 (Öztürk e İşinibilir, 2010). Su presencia, sumada a la invasión de otras medusas, está teniendo consecuencias negativas sobre la actividad turística, la salud humana y otras actividades socioeconómicas. Además de estos *cnidarios*, se encuentra una amplia gama de peces invasores entre los que destaca *Siganus luridus* cuya alimentación basada en dos especies nativas, *Sarpa salpa* y *Sparisoma cretense*, ha provocado modificaciones considerables en las comunidades autóctonas. Es importante destacar la facilidad que presentan para emplear recursos tróficos locales favoreciendo así una rápida adaptación al ecosistema (Espinosa, 2009).

Dentro del incremento del número de especies exóticas en el Mediterráneo, más de un centenar son macrófitos, donde se ven incluidas las macroalgas (Zenetos et al., 2004). Cabe destacar a *Caulerpa taxifolia*, *C. cylindracea* y *Lophocladia lallemandii* (**Figura 2**), las cuales afectan a *Posidonia oceánica* (Rubia, 2016), una especie endémica del Mediterráneo que está protegida debido a su papel vital en el ecosistema. Esta planta conforma un factor indispensable en la dinámica sedimentaria, creando zonas de generación de oxígeno, cría y refugio para diversos individuos. Igualmente, permite mantener el agua en un estado limpio y transparente gracias a su capacidad para actuar como grandes filtros (Aquae Fundación, 2013).



**Figura 2.** *Caulerpa cylindracea* (A), *Caulerpa taxifolia* (B) y *Lophocladia lallemandii* (C). Fuente: <https://plantasflores.com>

Sin embargo, ninguna de las algas mencionadas presenta una dispersión tan explosiva como la macroalga *Rugulopteryx okamurae*, identificada por primera vez a partir de arribazones ubicados en el estrecho de Gibraltar (García-Gómez et al., 2018).

Su distribución nativa se ciñe a las costas del Océano Pacífico, englobando Corea, Japón, China, Taiwán y Filipinas. No obstante, su capacidad competitiva y de crecimiento desbordante han permitido la dispersión del alga por otras zonas del mundo (Dawson et al., 2009). En 2015, fueron extraídas más de 5000 toneladas de biomasa en las playas de Ceuta y un año más tarde esta macroalga fue identificada en el lado norte del Estrecho de Gibraltar. Posteriormente, durante los años 2018 y 2019 continuó extendiéndose desde ese punto en dos direcciones, hacia el Atlántico y el Mediterráneo (García, 2020).

En la **Figura 3** se muestra la distribución geográfica del alga invasora *Rugulopteryx okamurae* en la zona de costa del estrecho de Gibraltar.



**Figura 3.** Presencia de *Rugulopteryx okamurae* en el estrecho de Gibraltar (García-Gómez et al., 2018).

Las principales vías de entrada de *Rugulopteryx okamurae* son las aguas de lastre, incrustaciones en la estructura externa de los barcos y cultivos marinos. Por otro lado, entre los vectores de dispersión destacan las corrientes y basura marinas, métodos de pesca y sistemas de fondeo. Esto permite el desarrollo de impactos y amenazas de la macroalga sobre tres ámbitos, el hábitat, las especies autóctonas y los recursos económicos que se asocian al empleo del patrimonio natural (Dawson et al., 2009).

Debido a la inexistencia de características invasoras asociadas a esta especie, no se habían llevado a cabo hasta la actualidad el desarrollo de métodos que confieran experiencias de control que puedan servir de referencia. De este modo, las medidas propuestas para su control no suponen soluciones totalmente efectivas y únicamente se basan en la identificación y vigilancia de los vectores de introducción y dispersión previamente mencionados; en el conocimiento temprano de las zonas más probables a ser invadidas, gracias al estudio de las condiciones ambientales más favorables; o en la sensibilización de la sociedad promoviendo una



educación ambiental para que la ciudadanía pueda ser partícipe en actividades de gestión de la macroalga.

Aunque las estrategias de control siguen desarrollándose, los riesgos que supone esta invasión indican la necesidad de una aceleración de dichas técnicas. El análisis de riesgos realizado por las instituciones determina que la presencia de *Rugulopteryx okamurae* (**Figura 4**) representa un nivel medio de peligrosidad, con una puntuación de 17 puntos sobre un máximo de 19 (Dawson et al., 2009) A pesar de que para ser considerado como un invasor de nivel alto deba presentar la mayor puntuación posible, esta situación no deja de ser problemática.



**Figura 4.** Morfología del alga invasora *Rugulopteryx okamurae* (Lechu, 2018).

No obstante, Dawson et al., (2009) afirman que debería considerarse de riesgo alto debido a diversos argumentos, entre los que destacan el desconocimiento de nuevas vías de entrada internacionales y la inexistencia de métodos de control efectivos que sean aplicables, lo cual implica el mantenimiento de efectos negativos ocasionados por el alga sobre las diferentes comunidades marinas, especialmente sobre las algas fotófilas y corales (algunas especies están incluidas en el Catálogo Nacional y Andaluz de Especies Amenazadas). A lo mencionado anteriormente se suman las pérdidas económicas asociadas al sector pesquero y a la gestión de los arribazones que llegan a las playas.

### **1.2. Características de *Rugulopteryx okamurae***

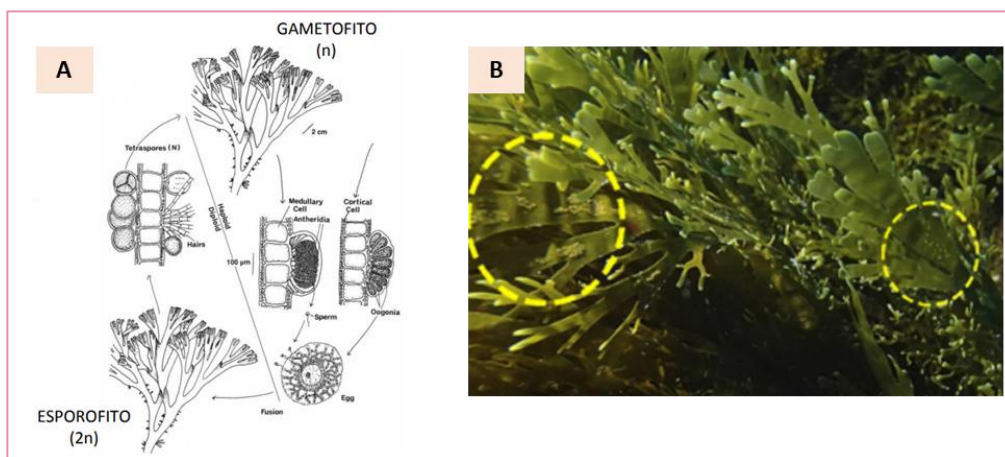
La exitosa colonización de la costa mediterránea por parte de *Rugulopteryx okamurae* implica profundizar en el conocimiento de la especie a todos los niveles, para permitir un establecimiento de estrategias de prevención eficaces. Sin embargo, como señala la Sociedad Española de Ficología, existe poca información acerca del alga y para la creación de medidas de gestión es necesaria una intensa investigación acerca de la fisiología y biología de *R. okamurae*. Cabe añadir que también existe desinformación acerca de las causas que están permitiendo la voraz colonización del alga (Figueroa et al., 2020).

Taxonómicamente, *R. okamurae* se clasifica como sigue (Dawson et al., 2009)

- Reino: *Chromista*
  - Phylum: *Ochrophyta*
    - Clase: *Phaeophyceae*
      - Orden: *Dictyotales*
        - Familia: *Dictyotaceae*
          - Tribu *Dictyoteae*
            - Género: *Rugulopteryx*

### 1.2.1. Ciclo de vida

El ciclo de vida de *R. okamurae* (**Figura 5.A**) es un ciclo digenético isomórfico, donde tienen lugar dos fases morfológicamente iguales, aunque independientes en cuanto a fisiología: una fase gametofítica (haploide) y otra esporofítica (diploide). Los mecanismos de reproducción de esta alga pueden ser tanto sexuales (por tetrasporas meióticas) como asexuales o vegetativos (aunque se desconoce la periodicidad de la producción de estructuras vegetativas) (Dawson et al., 2009). Aunque la reproducción asexual suele ser la predominante y tiene lugar mediante esporangios (**Figura 5.B**) que se sitúan en ambas caras del talo, a excepción del ápice y las zonas marginales. Los esporofitos descargan dos tipos de esporas en la época de reproducción: monosporas y tetrasporas. Las primeras se desarrollan *in-situ* dando lugar a más esporangios, mientras que las tetrasporas son liberadas sin germinar (García-Gómez, 2018). Dawson et al. (2009) destacan que la reproducción de *R. okamurae* se califica únicamente como asexual en las zonas con latitudes altas, ya que varios estudios han demostrado que las estructuras reproductivas se desarrollan a temperaturas superiores a 15 °C.



**Figura 5.** Ciclo de vida de *Rugulopteryx okamurae* (A) (Figuroa et al., 2019). Esporangios en *Rugulopteryx okamurae* (B) (García-Gómez, 2018).

### 1.2.2. Características físico-químicas

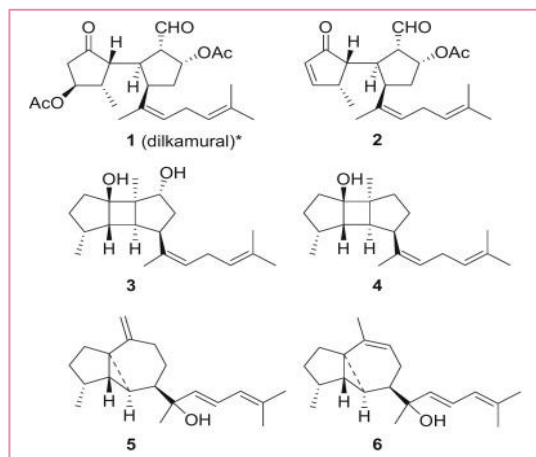
En cuanto a la estructura anatómica de *Rugulopteryx okamurae*, el alga muestra un cuerpo firme, membranoso y de 10-20 cm de altura (**Figura 6**). Tiene ramas dispuestas en forma de abanico y en grupos densos. Asimismo, presenta una fuerte variación morfológica. De hecho, se han descrito dos morfologías principales y una intermedia, aunque estas suelen coexistir, la abundancia de una u otra se ve influenciada por las condiciones ambientales (García-Gómez, 2018):

- **Gruesa:** aparece cuando las aguas son cálidas (20-25 °C) y se clasifica como esporofito. Por lo general, se dispone en racimos grandes, lisos y de color marrón oscuro. El tamaño del talo varía entre 5-10 mm de ancho y 120-180 mm de grosor, en cuyos márgenes se encuentra una médula con varias capas.
- **Fina:** abunda en invierno, debido a las aguas frías (<20 °C) puede reproducirse por esporas o generar gametos. En este caso, el talo se presenta en forma de espiral y con muchas ramificaciones, también es de color marrón. Las dimensiones son inferiores a la morfología gruesa y la médula del talo es unicelular.
- **Intermedia:** tal y como indica su nombre, presenta características intermedias y se muestra en los meses de transición entre las épocas más calurosas y las más frías.



**Figura 6.** Anatomía de *Rugulopteryx okamurae* (Figuerola et al., 2019).

*Paracentrotus lividus*, un herbívoro generalista distribuido por el Atlántico nororiental y las costas del Mediterráneo, es el principal consumidor y regulador de la distribución, abundancia y diversidad de algas marinas nativas y no nativas. Aunque este erizo se ha considerado como un depredador potencial, su tasa de consumo de *R. okamurae* es significativamente inferior a la de otras especies de macroalgas (Casal-Porras et al., 2021). Casal-Porras et al. (2021) llevaron a cabo un estudio para analizar los metabolitos secundarios, con objeto de explicar la escasez de herbivoría en esta alga parda, lo cual ha motivado su rápida transformación de especie exótica a invasora. Tras un análisis espectroscópico, se identificaron seis compuestos (**Figura 7**), donde el metabolito principal fue el dilkamural.



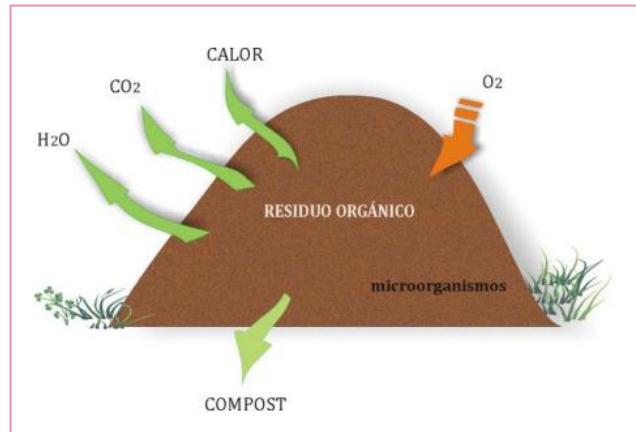
**Figura 7:** Estructuras químicas de los metabolitos secundarios analizados en *R. okamurae* (destacado con un asterisco el compuesto mayoritario) (Casal-Porras et al., 2021).

Este diterpeno es específico de *Rugulopteryx okamurae* y se considera el responsable de la baja preferencia de los depredadores por el alga, ya que es capaz de provocar efectos tóxicos. A parte de presentar una actividad disuasoria de la alimentación contra peces y moluscos, también exhibe una actividad inhibidora frente a *Colletotrichum lagenarium*; un hongo moho, patógeno de plantas, y muestra capacidad antimicrobiana frente a *Bacillus subtilis*. Estas propiedades, junto al resto de metabolitos secundarios, tienen un papel fundamental en la defensa del alga frente a la microbiota presente en los nuevos hábitats que coloniza (Xia et al., 2020; Casal-Porras et al., 2021).

### 1.3. Valorización de arribazones de *Rugulopteryx okamurae* mediante compostaje: de Residuo a Recurso.

Incontables toneladas de biomasa algal son desechadas en vertederos o eliminadas mediante incineración (Castaldi y Melis, 2004). La necesidad de la mejora en la gestión de residuos y el coste de la eliminación han alentado la búsqueda de alternativas más sostenibles ambientalmente. Como indican Han et al., (2014), los residuos de algas han sido empleados en suelos de diversas zonas costeras alrededor de todo el mundo. Sin embargo, el uso de estos materiales no estabilizados y elevadamente recalcitrantes en la agricultura podrían ser la causa de problemas tanto en el suelo como en cultivos. Una posible solución es el empleo del compostaje de la biomasa algal, combinado con otros materiales orgánicos que ayuden a alcanzar una actividad microbiana suficiente para llevar a cabo el proceso de transformación adecuadamente (co-compostaje) (Madejón et al., 2020).

El co-compostaje (**Figura 8**) supone la degradación controlada de materia orgánica en condiciones aeróbicas, empleando más de una materia prima, con objeto de generar compost, un producto estable y no fitotóxico usado en el sector agrícola como abono, acondicionador de suelo, enmienda y fertilizante orgánico (Flores y López, 2017). El compost suele ser de un color entre marrón y negrizco, con una estructura con gránulos irregulares, no muestra un olor desagradable y tiene un pH de neutro a básico, dependiendo del material de partida (Auquilla, 2019). Como indican Madejón et al. (2020), los productos finales provenientes del co-compostaje de restos de algas no presentan fitotoxicidad y su desarrollo es eficaz.



**Figura 8.** Esquema de una pila de compostaje (Villar, 2017).

Durante el proceso de compostaje, los microorganismos quimioheterótrofos utilizan como fuente de carbono y energía los sustratos orgánicos presentes en la pila. Estos organismos llevan a cabo reacciones de distintas rutas metabólicas que acaban en el mismo punto, el ciclo de Krebs, lo que les permite obtener energía en forma de ATP, parte de la cual se disipa en forma de calor (Moreno y Mormeneo, 2011). Como destacan Moreno y Mormeneo (2011), es imprescindible que los sustratos se encuentren formando una pila, ya que, con esta disposición, se evita o al menos se disminuye la pérdida de calor, permitiendo que este quede atrapado en el material, generando a su vez un efecto de retroalimentación (**Figura 8**).

La biotransformación ocurre mediante la actuación de los microorganismos presentes en el material en condiciones adecuadas, y controladas, de temperatura, pH o relación carbono-nitrógeno (C/N) (Flores y López, 2017), siendo clave conocer cómo influyen estos parámetros en el ecosistema para optimizar la eficiencia de la actividad microbiana (Moreno y Mormeneo, 2011). Precisamente, los parámetros más importantes a controlar en un proceso de compostaje son: temperatura, humedad, materia orgánica, relación C/N, aireación, pH y naturaleza del sustrato (López-González, 2015).

En lo que respecta a la relación C/N, en el material de partida esta ha de ser adecuada, de otro modo, el proceso no se desarrollará de manera correcta (Bueno et al., 2008). Como indica López-González (2015), la velocidad de degradación de los microorganismos va a depender en gran medida del porcentaje en el que se encuentren el carbono y el nitrógeno. Los primeros sustratos asimilados por la microbiota serán aquellos que muestren una estructura más sencilla, cuando estos se hayan agotado, los microorganismos recurrirán a aquellos más complejos (como la lignocelulosa). Se ha considerado teóricamente que la proporción óptima de C/N es entre 25-35 (Bueno et al., 2011).

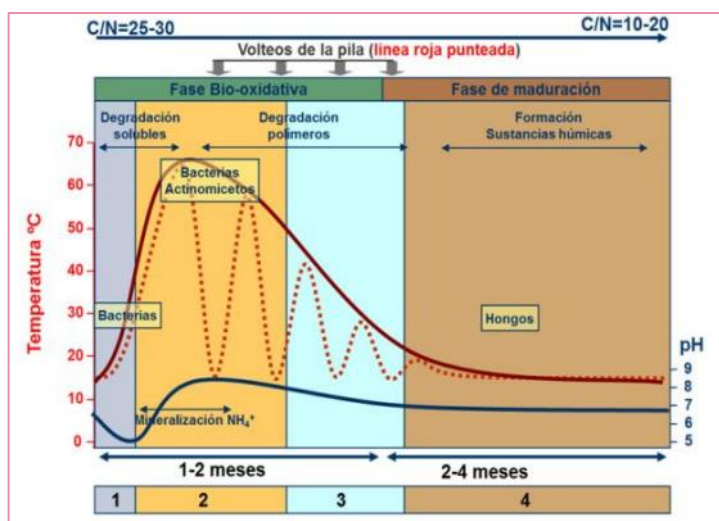
Es importante destacar que los microorganismos presentes en la materia orgánica a degradar pueden clasificarse como beneficiosos o perjudiciales. En este último grupo destacan los patógenos y aquellos capaces de generar malos olores que habitualmente proliferan si no se mantienen condiciones deseadas en un proceso de compostaje, como la presencia suficiente de oxígeno y humedad. Por su parte, los microbios que biotransforman la materia orgánica en

condiciones aerobias; aquellos que degradan sustancias contaminantes; y los que contribuyen a la eliminación de microorganismos perjudiciales, favoreciendo la higienización del material sometido a compostaje, permiten obtener un compost de elevada calidad (Moreno y Mormeneo, 2011).

En el proceso de compostaje podemos distinguir cuatro fases térmicas: mesófila, termófila, enfriamiento y, por último, la fase de maduración (Auquilla, 2019), mostradas en la **Figura 9**. Cada etapa se encuentra bien caracterizada tanto a nivel metabólico como térmico (López-González, 2015):

- Fase mesófila (10-42 °C): los hongos y las bacterias mesófilos del propio residuo inician el proceso de descomposición de azúcares, proteínas y lípidos. Los microorganismos aprovechan estas fuentes sencillas de carbono y nitrógeno y su actividad permite alcanzar una temperatura de aproximadamente 42 °C (Auquilla, 2019).
- Fase termófila (45-70 °C): el aumento de la cantidad de microorganismos termófilos incrementa la demanda de oxígeno y el nitrógeno se transforma en amoníaco, de modo que la temperatura supera los 45 °C, acelerando las actividades metabólicas y facilitando la degradación de las fuentes más complejas de carbono como, por ejemplo, la celulosa o la lignina (Auquilla, 2019). La temperatura continúa su ascenso hasta que la estabilidad de los microorganismos es inviable (suele ocurrir a partir de 60 °C) y, desde ese momento, el proceso entra en la siguiente fase (Moreno y Mormeneo, 2011). Esta fase asegura la higienización y eliminación de patógenos, de larvas y de semillas (Auquilla, 2019).
- Fase de enfriamiento: con la disminución de la temperatura hasta valores comprendidos entre 40-45 °C, la actividad de los termófilos se ve reducida debido a la falta de energía y nutrientes, lo que conlleva la reaparición de los microorganismos mesófilos (Auquilla, 2019).
- Fase de maduración: con el descenso de la actividad microbiana, también se ve disminuida la temperatura (Auquilla, 2019). El proceso se da por finalizado cuando se obtiene un producto final humificado, estable biológicamente, donde no tienen lugar (u ocurren muy lentamente) reacciones de descomposición microbiana (Moreno y Mormeneo, 2011), dando lugar a lo que se denomina compost.

Asimismo, de forma alternativa; como se observa en la **Figura 9**, el proceso de compostaje puede ser dividido en dos grandes etapas, bien diferenciadas en función de la actividad microbiana y del sustrato disponible: fase bio-oxidativa y la fase de maduración. La primera muestra una elevada cantidad de nutrientes biodisponibles y, por ende, ocurre un crecimiento activo de los microorganismos. Por otro lado, en la fase de maduración las condiciones son contrarias, los nutrientes están más limitados y la acción de la microbiota es menor (Moreno y Mormeneo, 2011).



**Figura 9.** Etapas del proceso de compostaje: mesófila (1), termófila (2), enfriamiento (3) y maduración (4) (Moreno y Mormeneo, 2011).

Algunos de los principales beneficios del compostaje y su producto final son, en primer lugar, que al añadir materia orgánica al suelo se fomenta su fertilidad y productividad, permitiendo que se retenga más cantidad de agua y, con ello, favoreciendo el desarrollo vegetal. Además, el compostaje contribuye a la descontaminación del área donde ocurre el proceso, así como de los materiales sometidos al mismo, incluyendo la reducción de compuestos tóxicos y complejos de remediar como metales pesados. También existen ventajas que afectan directamente a los seres humanos, ya que mediante el compostaje se destruyen patógenos tanto de vegetales como de animales y que afectan a las personas. Por último, sumado a todas las ventajas mencionadas, destaca el ahorro económico asociado a que el producto final obtenido, compost, se puede comercializar, permitiendo un beneficio adicional a la gestión del residuo, pero, además, gracias a la reducción de las necesidades del uso de agua, fertilizantes y plaguicidas se pueden destinar más recursos por parte de las instituciones competentes a otras actividades de interés social y ambiental como, por ejemplo, la restauración del paisaje (Docampo, 2013).

#### 1.4. Microorganismos que intervienen en el proceso de compostaje

En el compostaje, sea combinado o con una única materia prima principal, existe una evolución en cuanto al tipo y cantidad de microorganismos mesófilos y termófilos presentes en las pilas en función de la fase en la que se encuentre el proceso (Iglesias-Jiménez, 2014). Estas poblaciones mixtas serán más o menos activas en función de tres parámetros: el tipo de sustrato, la microbiota inicialmente presente durante la constitución de las pilas y la temperatura alcanzada. A medida que evoluciona la temperatura, los microorganismos son sustituidos por otros que se adaptan mejor a las condiciones de la pila, como se muestra en la **Tabla 1** (Laich, 2011), de modo que la descripción de la microbiota del proceso es complicada (Camacho et al., 2014). Aunque entre la amplia diversidad destaquen actinobacterias, hongos filamentosos y bacterias, estas últimas son el grupo mayoritario, con una representación del 80-90%, del número total de microorganismos. Cabe destacar que las bacterias presentan una gran

variedad enzimática y son capaces de degradar distintos compuestos orgánicos (Iglesias-Jiménez, 2014).

En la **Tabla 1** se muestra el tipo de microorganismos en cada etapa del proceso de co-compostaje según su perfil térmico y la carga microbiana aproximada en cada una de ellas.

**Tabla 1.** Distribución de la microbiota más característica (bacterias, actinobacterias y hongos), en UFC/mL, en procesos de co-compostaje (Modificado de Laich, 2011).

Microorganismos	ETAPAS DE COMPOSTAJE			N.º de especies
	MESÓFILA-ASCENDENTE (UFC/mL) (20 °C – 40 °C)	TERMÓFILA (UFC/mL) (40 °C -70 °C)	MESÓFILA-DESCENDENTE (UFC/mL) (70 °C -20°C)	
Bacterias mesófilas	10 <sup>8</sup>	10 <sup>6</sup>	10 <sup>11</sup>	6
Bacterias termófilas	10 <sup>4</sup>	10 <sup>9</sup>	10 <sup>7</sup>	1
Actinobacterias termófilas	10 <sup>4</sup>	10 <sup>8</sup>	10 <sup>5</sup>	14
Hongos mesófilos	10 <sup>6</sup>	10 <sup>3</sup>	10 <sup>5</sup>	18
Hongos termófilos	10 <sup>3</sup>	10 <sup>7</sup>	10 <sup>6</sup>	16

### 1. Fase mesófila

En la materia prima inicial abundan mayormente bacterias mesófilas y hongos filamentosos (mohos). En el caso de las bacterias, podemos encontrar hasta 100 millones de microorganismos por cada gramo de material. En concreto, las bacterias gramnegativas y productoras de ácido láctico presentan las mayores tasas de crecimiento gracias a su capacidad degradadora de los compuestos más sencillos (Laich, 2011).

Los valores de temperatura que se alcanzan pueden llegar fácilmente hasta los 40 °C y limitan la presencia de microbiota termotolerante (Bonito et al., 2010). Predominan microorganismos del género *Bacillus*; cuya variabilidad de especies es estable hasta temperaturas de 50 °C, y familias como *Flabobacteriaceae*, *Nocardiopsaceae* o *Rhodospirillaceae* (Laich, 2011; Estrella-González et al., 2020).

### 2. Fase termófila

Las reacciones exotérmicas producidas por el metabolismo microbiano conllevan el aumento de la temperatura por encima de los 45 °C, dando comienzo a la fase termófila, donde la microbiota mesófila es parcialmente eliminada y aquellos organismos que son termotolerantes incrementan su población (Moreno et al., 2021).

Los microorganismos capaces de soportar la temperatura que se alcanza en esta fase del proceso están presentes en valores de 100-1000 millones de células por gramo (Laich, 2011). Siendo las actinobacterias el grupo predominante, donde *Streptomyces lincolnensis*, *Thermoactinomyces vulgaris* o *Actinobidida chromogena* son las especies más habituales (Laich,



2011; Jurado et al., 2014). En cuanto a las bacterias mesófilas del género *Bacillus*, pueden sobrevivir gracias a su capacidad para formar endosporas, mientras que otros géneros pueden protegerse de estas condiciones desfavorables, por ejemplo, aumentando el grosor de su pared celular con el objetivo de mantenerse estables hasta que el ambiente sea favorable para su reactivación. Estos grupos microbianos llevan a cabo la descomposición de moléculas complejas como celulosa, hemicelulosa o proteínas (López-González et al., 2015).

### **3. Fase de enfriamiento**

El agotamiento de las fuentes de energía hace que disminuya la acción de los microorganismos y, por tanto, hay un descenso de la temperatura. Sin embargo, en esta etapa del compostaje tiene lugar un aumento significativo de la microbiota capaz de degradar aquellos componentes más complejos, como celulosa o lignina, que no han sido eliminados en la fase anterior (Laich, 2011; López-González et al., 2013).

Destaca la presencia de hongos, gracias a la capacidad termorresistente de sus esporas. Las principales familias que aparecen son: *Saccharomycetales*, *Trichocomaceae*, *Microasceae*, *Cladosporiaceae* y *Trichosporonaceae* (Estrella-González et al., 2020).

### **4. Fase de maduración**

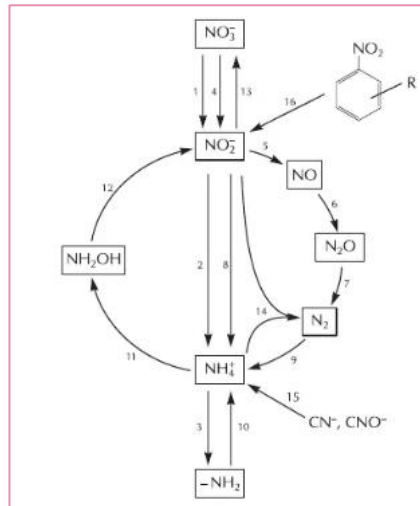
Las bacterias mesófilas de la fase anterior, capaces de resistir altas temperaturas gracias a diversos mecanismos, reaparecen y llegan a representar en total hasta el 80% de la microbiota ( $10^9$ - $10^{11}$  UFC/g). Su presencia favorece diversos procesos, como la descomposición de la materia orgánica y la polimerización de compuestos orgánicos simples. Además, intervienen en la mineralización de hierro, manganeso y fósforo, en la supresión de fitopatógenos, degradación de pesticidas y disminución de la cantidad de metales pesados. También ayudan a la fijación de nitrógeno atmosférico y a la degradación completa de este elemento y de compuestos azufrados (Laich, 2011), consiguiendo valores de 10-15 en la relación C/N, característicos de la materia orgánica estable (Asadu et al., 2020).

#### **1.4.1. Capacidad biofertilizante de los microorganismos del compost**

El rápido aumento de la población ha derivado en la multiplicación del uso de fertilizantes químicos con objeto de obtener mayor cantidad de productos agrícolas en menos tiempo. Sin embargo, resolver un problema ha conllevado otros de múltiple naturaleza como la erosión del suelo o la pérdida de estabilidad y biodiversidad microbiana. Igualmente, ha provocado la contaminación de cursos de agua naturales, haciendo que se acumulen una gran cantidad de residuos orgánicos y xenobióticos en lagos, lagunas y costas. La necesidad de reducir el uso de fertilizantes químicos y productos fitosanitarios ha dado lugar a la búsqueda de microorganismos con capacidad biofertilizante y biopesticida que contribuyan a la mejora de las condiciones agrícolas (Sánchez et al, 2017). Los organismos considerados originalmente biofertilizantes facilitan la absorción de nutrientes y la producción de fitohormonas promoviendo así el crecimiento vegetal (Aristizábal y Cerón, 2012), lo cual puede traducirse asimismo en una capacidad de protección de los vegetales.

- **Ciclo del Nitrógeno**

Como afirma Orchardson (2020), el nitrógeno se posiciona como el nutriente más importante en la producción de los cultivos. En el ciclo del nitrógeno se producen diferentes reacciones a través de las cuales el nitrógeno circula de la atmósfera a la tierra y vuelve a ser liberado a la atmósfera. Los procesos de mineralización de nitrógeno (**Figura 10**) son esenciales para su disponibilidad en el ecosistema terrestre (Aristizábal y Cerón, 2012).



**Figura 10.** Esquema general del Ciclo del Nitrógeno (Castillo-Rodríguez, 2005).

- α **Fijación del nitrógeno:** se lleva a cabo por las bacterias fijadoras de nitrógeno mediante el proceso descrito de Haber-Bosch, donde mediante un catalizador de hierro, el nitrógeno ( $N_2$ ) va a reaccionar con el hidrógeno gaseoso ( $H_2$ ) generando amoníaco ( $NH_3$ ). Este podría emplearse de forma directa en el cultivo, no obstante, se ha demostrado que es más adecuado el uso de nitrato amónico, obtenido tras la oxidación de una parte del amoníaco a ácido nítrico y su posterior recombinación con el resto de amoníaco (Castillo-Rodríguez, 2005).
- α **Amonificación:** consiste en la mineralización del nitrógeno presente en la materia orgánica provocando la liberación de amonio o amoníaco (Castillo-Rodríguez, 2005).
- α **Nitrificación:** tiene lugar en suelos con buena aireación y con un valor de pH neutro, mediante la oxidación del amonio se obtiene nitrato. Este proceso consta de dos fases y es llevado a cabo por un número muy limitado de bacterias autótrofas denominadas nitrificantes. En primer lugar, el amoníaco es transformado en nitrito (*Nitrosomonas* es el género más representativo) y luego, bacterias como las pertenecientes al grupo *Nitrobacter*, completan la oxidación hasta nitrato (Aristizábal y Cerón, 2012).
- α **Desnitrificación:** este proceso requiere condiciones anaerobias, donde el aceptor final de electrones será el nitrato en lugar del oxígeno. Como resultado se generan especies reactivas de oxígeno (ROS), que son perjudiciales para las plantas y, por ende, para la agricultura. Estas ROS generan un empobrecimiento del suelo a nivel de nitrógeno al producir óxidos de nitrógeno, como el  $N_2$ , todos ellos se perderán en la atmósfera al ser elementos gaseosos. Entre los microorganismos que llevan a cabo la desnitrificación

destacan algunas especies pertenecientes a los géneros *Pseudomonas*, *Bacillus* o *Azospirillum* (Castillo-Rodríguez, 2005; Aristizábal y Cerón, 2012).

- **Solubilizadores de fosfato y potasio**

Después del nitrógeno, el fósforo es el elemento más importante para un cultivo. Aunque haya una alta presencia en los suelos, se encuentra mayoritariamente en forma insoluble (99,9%) y las plantas no pueden asimilarlo por sí mismas. Por ello, se requiere la presencia de grupos funcionales capaces de solubilizar el fosfato para mantener el equilibrio en los agroecosistemas (Beltrán, 2014). De forma general, las bacterias son los microorganismos predominantes en la solubilización de fosfato, superando hasta 150 veces a los hongos. Estos últimos constituyen un porcentaje entre 0,1 y 0,5%, mientras que las bacterias con dicha capacidad pueden llegar al 50% del total de la población. Los microorganismos más relevantes son *Bacillus*, *Acinetobacter* o *Pseudomonas* como principales géneros bacterianos solubilizadores de fosfato o *Aspergillus* y *Fusarium* como representantes fúngicos (Aristizábal y Cerón, 2012).

Por otro lado, después del nitrógeno y el fósforo, el potasio se posiciona como el tercer macronutriente indispensable para el cultivo. El potasio que absorbe la planta es el que se encuentra de forma iónica ( $K^+$ ) en el suelo y con una concentración soluble inferior al 10%. En este caso, también encontramos géneros bacterianos como *Pseudomonas* y *Bacillus* para la captación de potasio. Este mineral permite el cumplimiento de funciones muy importantes en el desarrollo vegetal, tales como la formación de raíces o de antocianinas (Guevara, 2010; Zornoza, 2021).

- **Sideróforos**

El hierro es un micronutriente esencial para el metabolismo celular de casi todos los seres vivos y se posiciona como el cuarto metal más abundante en los suelos. A pesar de su elevada presencia, la rápida oxidación que sufre de su forma ferrosa ( $Fe^{2+}$ ) a la férrica ( $Fe^{3+}$ ) hace que esté poco disponible para los cultivos. Los sideróforos microbianos son moléculas secretadas por microorganismos capaces de secuestrar el hierro del entorno, es decir, son quelantes de  $Fe^{3+}$ . Suelen ser sintetizadas por bacterias, gramnegativas en su mayoría, como *Lactobacillus* (Aguado et al., 2012).

## 2. OBJETIVOS

La expansión incontrolada de *Rugulopteryx okamurae* a lo largo de la costa del Mediterráneo está provocando importantes daños en la flora y fauna autóctonas del mar, generando otros numerosos inconvenientes en cadena. La acumulación de esta macroalga está afectando a las actividades pesqueras y al turismo, disminuyendo así el beneficio económico de dichos sectores. A través del co-compostaje se puede convertir dicho residuo en un recurso. Todas las toneladas de biomasa algal acumuladas que están generando contaminación visual y pérdidas económicas y de biodiversidad, pueden llegar a transformarse en productos con alto valor añadido y ambientalmente sostenible.

Teniendo en cuenta que la actividad y naturaleza de los microorganismos son los elementos clave del compostaje, se planteó como **objetivo principal** del presente Trabajo de Fin de Grado el “estudio de la microbiota asociada a un proceso de co-compostaje elaborado con el fin de gestionar y valorizar la biomasa de arribazones del alga invasora *Rugulopteryx okamurae*”. Para lograr el cumplimiento de dicho objetivo general, se desarrollaron los siguientes **objetivos específicos**:

- Estudiar la evolución de la microbiota bacteriana, actinomicetal y fúngica durante el compostaje.
- Medir la presencia de microorganismos con potencial biofertilizante a lo largo del proceso.
- Evaluar la microbiota funcional relacionada con el ciclo biogeoquímico del nitrógeno en las distintas etapas del compostaje.

## 3. MATERIAL Y MÉTODOS

### 3.1. Materias primas y diseño experimental

Para la realización de los ensayos abordados en este trabajo se partió de la constitución A de cuatro pilas de co-compostaje empleando como materia prima principal arribazones de la macroalga *Rugulopteryx okamurae* combinados con diferentes tipos de residuos orgánicos. Las pilas se llevaron a cabo en el Instituto de Investigación y Formación Agraria y Pesquera de Andalucía (IFAPA), La Cañada de San Urbano, Almería (Longitud: 2° 24' 03'' W; Latitud 36° 50' 13'' N; Altitud: 5 m) (**Figura 11**).



**Figura 11:** Imagen de las cuatro pilas de co-compostaje constituidas en el centro IFAPA.

Los arribazones de *R. okamurae* procedían de las costas de Tarifa. Previo a la constitución de las pilas, su almacenaje se realizó en la Planta Industrial de Compostaje Servicios Ambientales Las Chozas (El Ejido, Almería), donde se dejaron secar al aire libre durante el mes de agosto de 2021. El alga (A) fue mezclada con otras materias primas: restos de cultivos hortícolas (RH), restos de poda de jardinería (RJ) y frutos de descarte (F), concretamente, pimiento y calabacín, generados en la provincia de Almería.

Se llevaron a cabo cuatro muestreos correspondientes a las principales fases térmicas del proceso de compostaje: Materia Prima (MPR), Fase Termófila (TER), Fase de Enfriamiento (ENF) y Producto Final (PRF). La composición de cada pila de compostaje se muestra en la **Tabla 2**:

**Tabla 2:** Composición de cada pila analizada en el ensayo.

Referencia	Composición	C/N
<b>Pila 1: A + F + RH + RJ</b>	15% alga + 15% fruto + 30% tallo + hoja hortícola+ 40% poda jardinería	28
<b>Pila 2: A + F + RJ</b>	20% fruto + 40% tallo+ hoja hortícola + 40% poda jardinería	29
<b>Pila 3: A + RJ</b>	35% alga + 65% poda de jardinería	33
<b>Pila 4: F + RH + RJ</b>	30% alga + 20% fruto + 50% poda jardinería	30

En cada uno de los cuatro muestreos realizados se recolectaron aproximadamente 4 kg de muestra por pila de compostaje. Para que el material fuera lo más representativo posible, se recogieron submuestras a partir de diferentes puntos (distintos niveles de altura y profundidad) de las pilas. Las fechas de los muestreos fueron las siguientes:

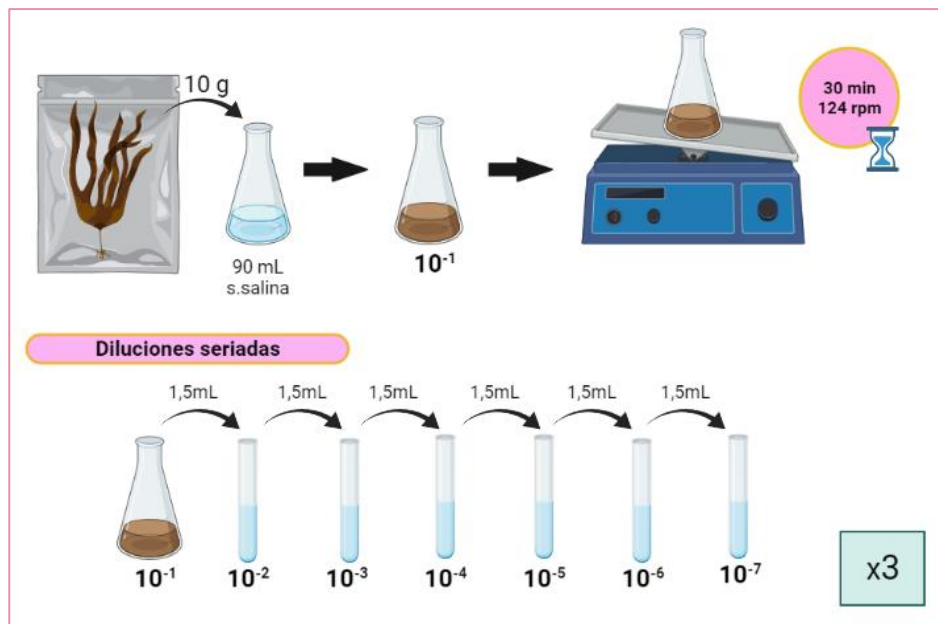
- Fase mesófila: 21/09/2021
- Fase termófila: 29/09/2021
- Fase de enfriamiento: 15/11/2021
- Fase de maduración: 21/04/2022

El procesamiento de la muestra recopilada fue inmediato, aun así, se conservó una parte del material a 4 °C y otra a -20 °C.

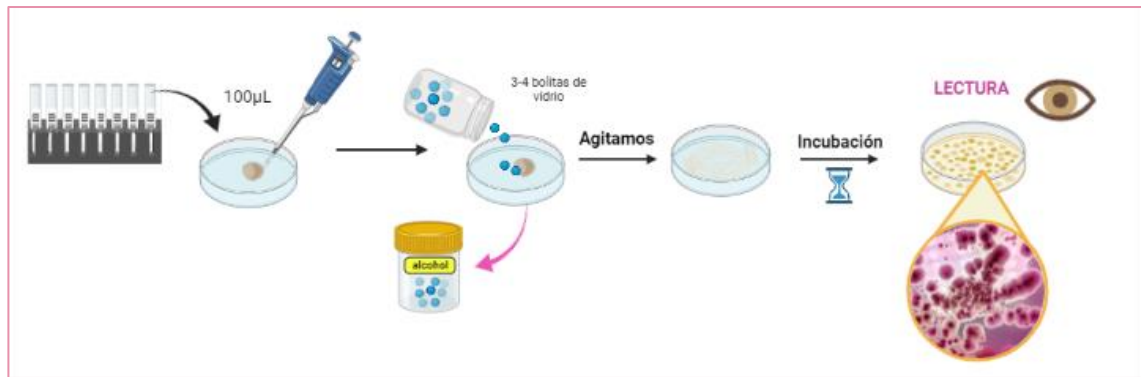
Para cumplir el objetivo principal del presente trabajo, se llevó a cabo un protocolo exhaustivo de cuantificación y caracterización de los microorganismos presentes en las muestras, empleando tres repeticiones en cada ensayo realizado en los distintos muestreos analizados y en las cuatro pilas estudiadas.

En primer lugar, como se muestra en la **Figura 12**, se tomaron 10 g de material y se incorporaron a un matraz con 90 mL de solución salina estéril al 0,9%, siendo esta la dilución  $10^{-1}$ . Transcurridos los 30 minutos en agitación a 124 rpm se llevó a cabo la técnica de diluciones decimales seriadas. Para realizarla, se tomaron 1,5 mL de la suspensión inicial y se incorporaron a un tubo con 13,5 mL de solución salina ( $10^{-2}$ ). Este proceso se repitió hasta alcanzar la dilución  $10^{-7}$ .

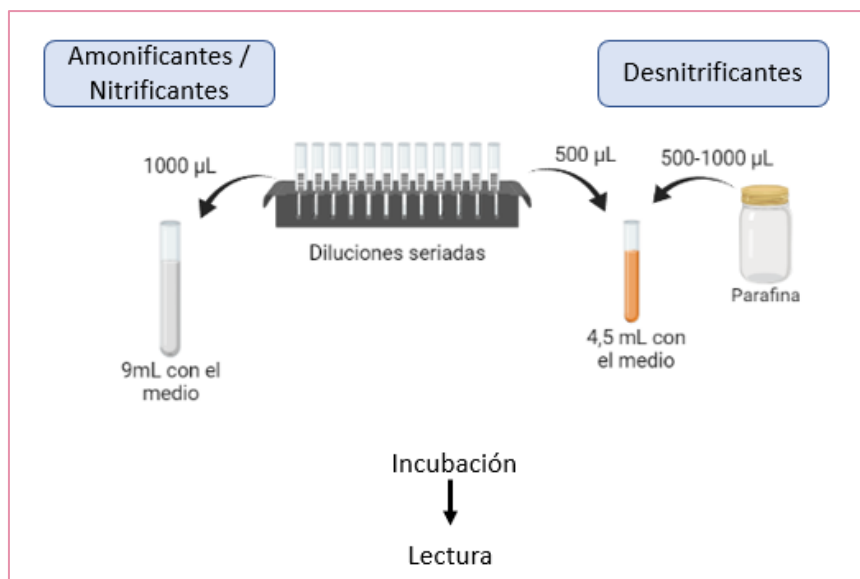
A partir de las diluciones anteriormente preparadas, se realizaron las siembras en los correspondientes medios de cultivo. En la **Figura 13** y la **Figura 14** se recogen los protocolos de siembra en medio sólido y medio líquido, respectivamente.



**Figura 12.** Esquema simplificado para la preparación de las diluciones decimales seriadas.



**Figura 13.** Esquema simplificado para la siembra en medios sólidos.



**Figura 14.** Esquema simplificado para la siembra en medios sólidos.

Las placas de Petri con los medios sólidos se inocularon con 100 µL de la dilución correspondiente, dicho volumen fue extendido por la superficie con bolitas de vidrio estériles para conseguir una distribución homogénea que permita la observación y el recuento de los distintos morfotipos coloniales. En el caso de los medios líquidos, empleados en este trabajo para la determinación de microorganismos nitrificantes y amonificantes, fueron inoculados con 1 mL, excepto en el caso del medio para desnitrificantes inoculado con 0,5 mL. Asimismo, este medio se selló con parafina para asegurar que se cumplieran las condiciones de anaerobiosis necesarias durante su incubación. Todos los medios de cultivo se incubaron a 30 °C durante el periodo de tiempo correspondiente (**Tabla 3**).

**Tabla 3:** Tiempos de incubación para cada medio de cultivo.

MEDIO DE CULTIVO	TIEMPO DE INCUBACIÓN
APHA	48 h
SCA (Agar Caseinato Sódico)	72 h
Rosa de Bengala	2-3 días
Solubilizadores de fosfato	1 semana
Solubilizadores de potasio	1 semana
Sideróforos	1 semana
BSN (Burk Sin Nitrógeno)	48-72 h
Amonificantes	15 días
Nitrificantes	15 días
Desnitrificantes	15 días

### 3.2. Medios de cultivo

Los medios de cultivo empleados para el desarrollo del presente Trabajo Fin de Grado fueron muy diversos, como se muestra en las tablas siguientes (**Tabla 4 -Tabla 6**). Una vez elaborado cada medio de cultivo, con los componentes en las proporciones adecuadas, fueron autoclavados a 121 °C durante 20 minutos. En el caso de los medios sólidos, estos se vertieron en placas de Petri en condiciones de asepsia.

**Tabla 4.** Composición de los medios de cultivo sólidos.

MEDIOS DE CULTIVO SÓLIDOS	COMPOSICIÓN
APHA (PANREAC 413799.1210)	Medio comercial: 23 g/L
Rosa de Bengala (RB) (LiofilChem, 610090)	Medio comercial: 32 g/L
Agar Caseinato Sódico (SCA) (LiofilChem, 610090)	Caseinato sódico 0,20 g/L K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 0,50 g/L MgSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O 0,20 g/L FeCl <sub>3</sub> ·6H <sub>2</sub> O 0,010 g/L Agar bacteriológico 20 g/L
Medio Solubilizadores de Fosfato (Medio de Pikovskaya)	Glucosa 10 g/L Ca <sub>2</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>3</sub> 5 g/L (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 0,5 g/L NaCl 0,2 g/L MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O 0,1 g/L KCl 0,2 g/L Extracto de levadura 0,5 g/L MnSO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O 0,002 g/L FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O 0,002 g/L Agar bacteriológico 20 g/L
Medio Solubilizadores de Potasio / Agar Aleksandrow (Himedia, M1996-500G)	Medio comercial: 29,606 g/L



<b>Medio para sideróforos</b>	Reactivo CAS (Chromeazurols) 60,5 mg/L HDTMA 72,9 mg/L Fe <sub>3</sub> ·6H <sub>2</sub> O 1mM 10 mL/L Piperazina 30,24 mg/L Agar bacteriológico 20 g/L
<b>Burk Sin Nitrógeno (BSN)</b>	Glucosa 5 g/L KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 0,64 g/L K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 0,16 g/L NaCl 0,2 g/L MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O 0,2 g/L CaSO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O 0,05 g/L NaMoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O 0,001 g/L FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O 0,0025 g/L Agar bacteriológico 20 g/L

**Tabla 5.** Composición de los medios de cultivo líquidos.

<b>MEDIOS DE CULTIVO LÍQUIDOS</b>	<b>COMPOSICIÓN</b>
<b>Medio para nitrificantes</b>	Solución salina de Winogradsky 50 mL/L (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 0,5 g/L CaCO <sub>3</sub> 7,5 g/L Agua destilada csp 1 L
<b>Medio para amonificantes</b>	Solución salina de Winogradsky 50 mL/L Asparagina 0,2 g/L Solución de oligoelementos 1 mL/L Agua destilada csp 1 L
<b>Medio para desnitrificantes</b>	Solución salina de Winogradsky 50 mL/L Solución de oligoelementos 1 mL/L Glicerol 10 g/L Extracto de Levadura 3 g/L Peptona 5 g/L KNO <sub>3</sub> 1 g/L Rojo fenol 0,04%aq 20 mL/L Agua destilada csp 1 L

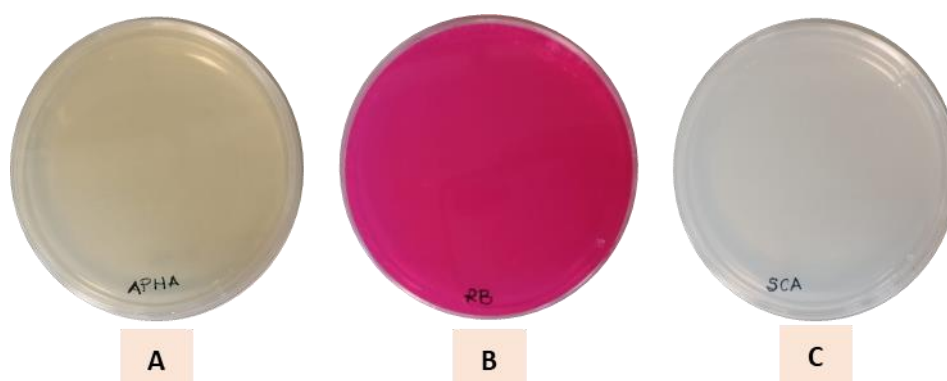
**Tabla 6.** Composición de los reactivos para el revelado y lectura de los medios líquidos.

REACTIVOS PARA LA LECTURA DE MEDIOS LÍQUIDOS	COMPOSICIÓN
Reactivo 1 para revelado de nitrificantes	Difenilamina 1 g/L H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 100 mL/L
Reactivo 2 para revelado de nitrificantes	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 98%
Reactivo de <i>Nessler</i> 1 para revelado de amonificantes	HgI <sub>2</sub> 50 mg/L KI 36,5 mg/L Agua destilada csp 1 L
Reactivo de <i>Nessler</i> 2 para revelado de amonificantes	KOH 150 mg/L Agua destilada csp 1 L

### 3.3. Análisis microbiológicos del ensayo

#### *a. Cuantificación de microbiota bacteriana, actinomicetal y fúngica*

Para la cuantificación de estos grupos microbianos se realizó el recuento colonial en APHA, SCA (Agar Caseinato Sódico) y Rosa de Bengala (**Figura 15**).



**Figura 15.** Medios APHA (A), Rosa de Bengala (B) y Agar Caseinato Sódico (C).

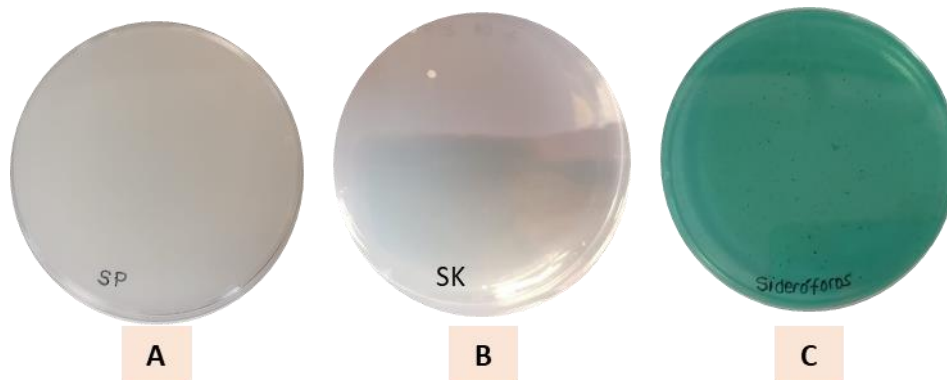
#### *b. Cuantificación de microbiota con potencial fertilizante*

##### ▪ Solubilizadores de fosfato (SP) y de potasio (SK).

En ambos casos, la cuantificación de los respectivos solubilizadores se llevó a cabo realizando la lectura de aquellos morfotipos que presentaron un halo de aclaramiento alrededor. En el caso de los solubilizadores de fosfato (**Figura 17.A**), la aparición de este halo es indicativa de la capacidad de dicho microorganismo de solubilizar el fosfato tricálcico. En cuanto a solubilizadores de potasio (**Figura 17.B**), implica la solubilización de silicato de aluminio y potasio.

- **Sideróforos**

Para realizar la cuantificación de los productores de sideróforos (**Figura 18**) se contaron las colonias que presentaron un halo de color amarillo-rosáceo alrededor de la colonia.



**Figura 16.** Medio de solubilizadores de fosfato (A), solubilizadores de potasio (B) y sideróforos (C).

*c. Cuantificación de microorganismos del Ciclo del Nitrógeno*

- **Medio Burk sin nitrógeno (BSN)**

Este medio se empleó para la cuantificación de fijadores de nitrógeno. La lectura se llevó a cabo mediante el recuento de todos los morfotipos coloniales presentes en el medio de cultivo (**Figura 19**).



**Figura 17.** Medio Burk sin Nitrógeno (BSN).

- **Amonificantes**

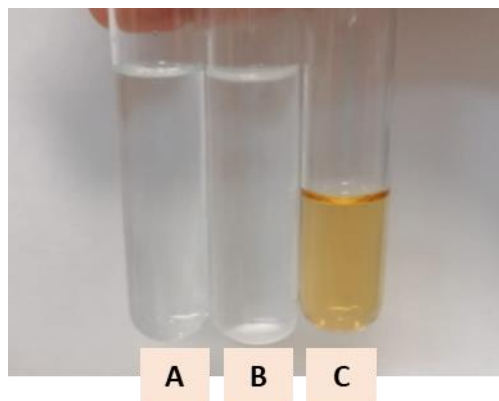
Para la lectura e interpretación del medio de amonificantes (**Figura 18.A**), a 1 mL de medio de cultivo, tras la inoculación y periodo de incubación, se le adicionó 1 mL del reactivo de Nessler (500  $\mu$ L de reactivo 1 y 500  $\mu$ L de reactivo 2). Se considera un resultado positivo cuando el medio vira en contacto con el reactivo de Nessler a color naranja ladrillo, lo cual indica la presencia de amoniaco. La ausencia de este viraje se considera un resultado negativo.

### ▪ Nitrificantes

Para la lectura e interpretación del medio de nitrificantes (**Figura 18.B**) se adicionaron 10 gotas de ácido sulfúrico (98%) y otras 10 de difenilamina. Los dos posibles resultados fueron: positivo y negativo. Se considera un resultado positivo cuando se puede observar la aparición temporal de coloración azulada debida a la presencia de nitratos, la ausencia de esta coloración indica un resultado negativo.

### ▪ Desnitrificantes

Para la lectura e interpretación de este medio (**Figura 18.C**) no fue necesario añadir ningún reactivo, si el color del medio permanecía naranja, pero se observaba turbidez y el tapón de agar era desplazado por la acumulación de gases indicaba que el tubo era positivo. Era considerado negativo si el medio viraba a color amarillo, indicando que se había producido fermentación.



**Figura 18:** Medios líquidos: Amonificantes (A), Nitrificantes (B) y Desnitrificantes (C).

Para calcular la carga microbiana presente en los medios sólidos, APHA, SCA, RB, SP, SK, SID y BURK sin N<sub>2</sub>, se llevó a cabo el recuento colonial total o positivo, en caso de medios que discriminen entre diferentes tipos de morfotipos, y se aplicó la fórmula para calcular la carga microbiana presente en unidades formadoras de colonias (ufc) por unidad de volumen (mL):

$$\frac{ufc}{mL} = \frac{\text{número de colonias}}{\text{Volumen inoculado} \times \text{Dilución}}$$

Para calcular la carga microbiana presente en los medios líquidos, amonificantes, nitrificantes y desnitrificantes, se empleó el método del Número Más Probable (NMP). Esta estrategia, regida por la distribución de Poisson, se basa en la determinación de presencia o ausencia (tubo positivo o negativo) de cada uno de los 9 tubos que hay de cada medio de cultivo líquido. En función de la combinación de resultados y de la dilución empleada se pudo determinar la densidad poblacional en cada caso.

### 3.4. Análisis estadístico

Todos los resultados obtenidos tras la lectura e interpretación de los diferentes muestreos fueron recogidos y procesados con el programa Microsoft Office Excel 2016 en su versión de Windows y con el programa estadístico Statgraphics Centurion 2018. Se realizaron diferentes análisis estadísticos. Se pudo determinar el efecto de diferentes factores (Tratamiento, Fase y Repetición) sobre cada una de las variables a través de un Análisis de Varianza Multifactorial (ANOVA), donde se calculó la Suma de Cuadrados para la evaluación del grado de variación de las interacciones entre los factores de forma general en las pilas, siendo identificables a través del Valor-P. Con el mismo procedimiento, pero empleando un Análisis de Varianza Simple (ANOVA), se establecieron las diferencias entre las fases en cada tratamiento.

Por otro lado, el Análisis de Múltiple Rango indica las diferencias mínimas entre las medias, se llevó a cabo a través del método de diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher. Además, se efectuó un Análisis Multivariado donde se obtuvieron las correlaciones por rango (de -1 a +1) de Spearman entre cada par de variables, para medir la fuerza de asociación entre ellas y también aporta un Valor-P para conocer de las correlaciones significativas. Cabe destacar que todos los análisis presentaron un nivel de confianza del 95%.

## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A continuación, se detallan todos los resultados que se han obtenido durante el desarrollo de este Trabajo Fin de Grado. De acuerdo con los objetivos específicos establecidos, la descripción y discusión de los resultados se organizó en tres apartados: evaluación de la microbiota bacteriana, actinomicetal y fúngica, análisis de microbiota biofertilizante (solubilizadores de fosfato y potasio y quelantes de hierro) y cuantificación de la microbiota relacionada con el ciclo del nitrógeno.

### 4.1. Evaluación de la microbiota bacteriana, actinomicetal y fúngica

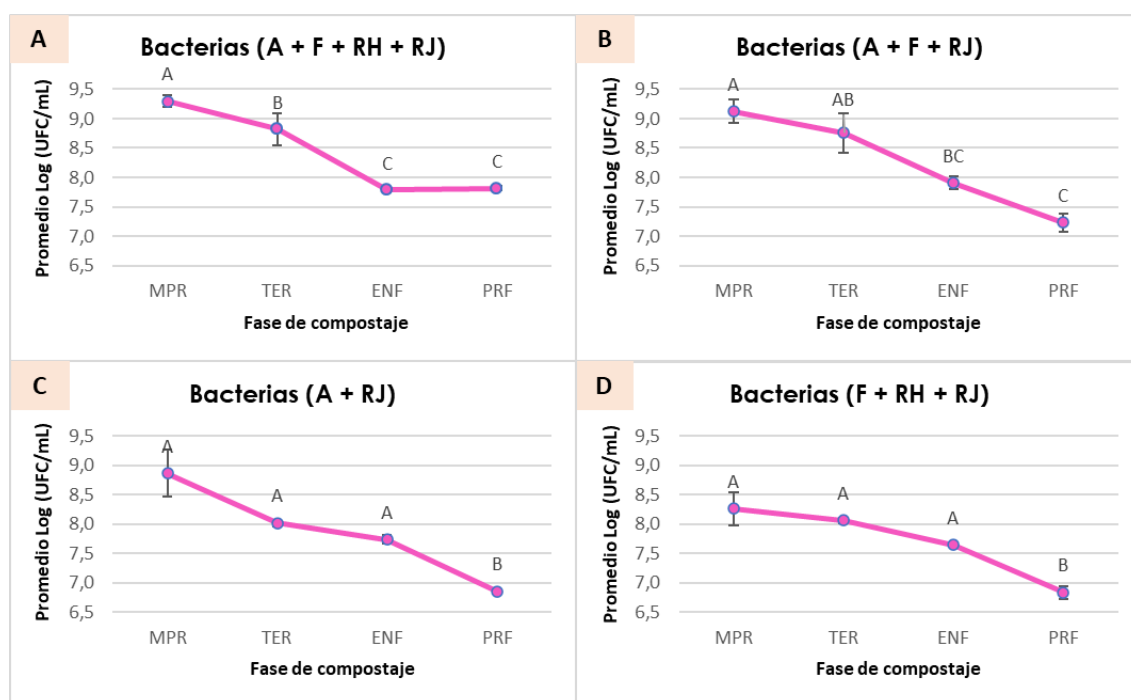
#### I. Microbiota bacteriana

En la **Figura 19** aparece la evolución de la microbiota bacteriana a lo largo del proceso de compostaje. Las gráficas corresponden con cada uno de los tratamientos de estudio. Los resultados, que oscilaron entre 6,5 y 9,5 unidades logarítmicas/mL, muestran de forma general un descenso evidente del recuento bacteriano a lo largo del proceso a excepción de la pila con el tratamiento A + F + RH + RJ (**Figura 19.A**), en la que se observó un ligero aumento desde la fase de enfriamiento hasta el producto final.

Las bacterias representan el grupo de microorganismos que alcanzan las mayores concentraciones en las fases mesófila y termófila. Como se puede observar, en la primera fase del proceso abunda el número de bacterias, mientras que en la fase termófila se produce una

descolonización, probablemente debida al aumento de la temperatura (Laich, 2011). Las características de las bacterias que permiten su superioridad en estas primeras fases frente al resto de la microbiota se fundamentan en su diversidad metabólica y en su elevada capacidad de división y adaptación (por ejemplo, formación de esporas) para resistir las condiciones del proceso (Moreno y Mormeneo, 2011).

Con la recuperación de las condiciones mesófilas reaparecen los microorganismos mesófilos (Auquilla, 2019), pero su número decrece considerablemente en la fase de maduración (Moreno y Mormeneo, 2011) y comienza a mostrar una tendencia a la baja manifestando la disminución de los nutrientes y, por tanto, la estabilización del compost en la última fase (Minda et al., 2018). Los valores finales de bacterias oscilaron en torno a 7 y 8 unidades logarítmicas en todas las pilas, aunque son menores a los establecidos de forma general por otros autores (Laich, 2011) (11 unidades logarítmicas/mL), su diversidad es mayor que la que se da en las fases anteriores, presentando nuevas capacidades esenciales para la maduración del compost (Moreno y Mormeneo, 2011).



**Figura 19.** Cuantificación de la microbiota bacteriana a lo largo del proceso de compostaje en cada una de las cuatro pilas estudiadas: A+F+RH+RJ (A), A+F+RJ (B), A+RJ (C) y F+RH+RJ (D). También se muestra el análisis simple (LSD 95%) para el factor Fase, sobre las barras de error.

Para conseguir un análisis más profundo, de forma adicional se realizó un análisis de la varianza (**Tabla 7.A**) y otro de múltiple comparación para los valores de los diferentes tratamientos de las pilas (**Tabla 7.B**). En el primer caso, se pudo observar que ninguno de los parámetros estudiados (Fase, Repetición y Tratamiento) mostró un Valor-P inferior a 0,05, lo que indica que no existió un efecto estadísticamente significativo sobre la evolución de las bacterias con un 95% de confianza. Por otro lado, en la **Tabla 7.B** se recogen las diferencias estadísticas en función de

la fase, el tratamiento y las repeticiones, de lo que se revela que cada pila se encuentra dentro del mismo grupo de homogeneidad (datos mostrados para el tratamiento), es decir, a pesar de estar constituidas con combinaciones de materias primas diferentes, el comportamiento a nivel de composición bacteriana fue similar en las cuatro pilas estudiadas.

**Tabla 7.A.** Análisis de varianza para la cuantificación de bacterias obtenidas en el proceso, y su correspondiente repetición por analítica<sup>1</sup>.

Parámetros	Suma de cuadrados	GL	Cuadrado Medio	Razón – F	Valor – P
<b>A: TRATAMIENTO</b>	269,30	3	89,77	0,88	0,46
<b>B: FASE</b>	211,71	4	52,93	0,52	0,72
<b>C: REPETICIÓN</b>	209,16	2	104,58	1,03	0,37
<b>RESIDUAL</b>	3970,44	39	101,81		
<b>CORREGIDO</b>	4665,74	48			

<sup>1</sup>GL: Grados de libertad; F: Valor Crítico de la distribución de Fisher; P: Probabilidad (Nivel de Significación).

**Tabla 7.B.** Análisis de múltiple comparación (LSD 95%) para los valores obtenidos en bacterias en las distintas pilas.

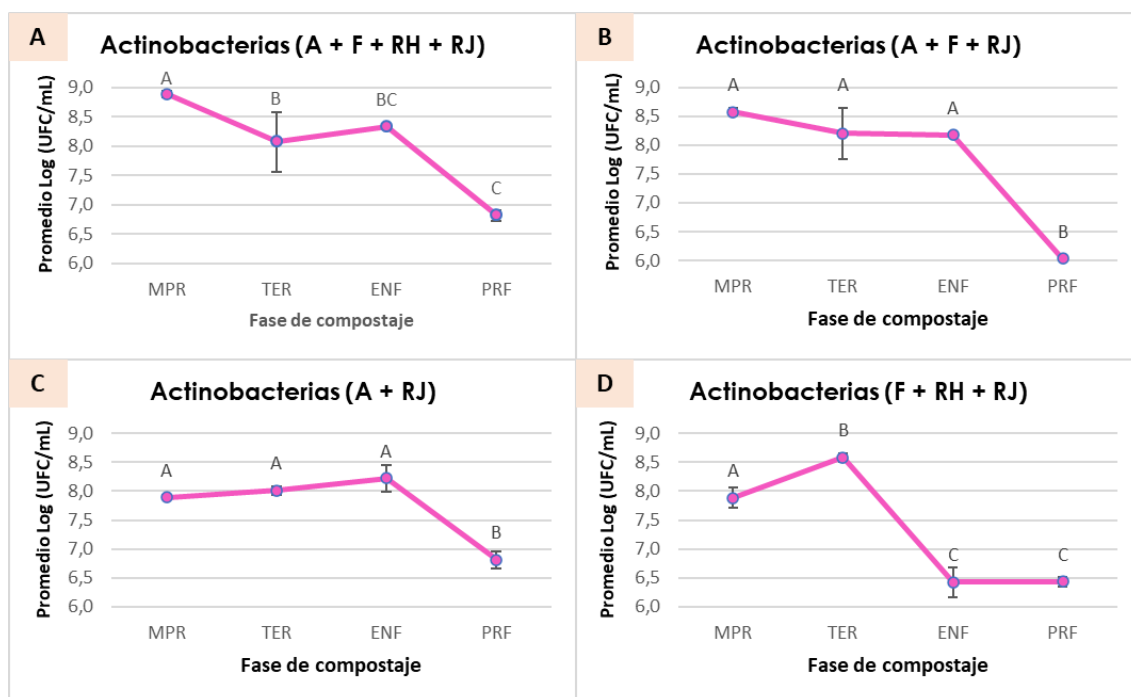
Tratamiento	Media Log (UFC/mL)	Grupo homogéneo
<b>A + F + RH + RJ</b>	8,27	A
<b>A + F + RJ</b>	7,84	A
<b>A + RJ</b>	8,52	A
<b>F + RH + RJ</b>	13,65	A

De manera más específica, en la **Figura 19** se muestra el análisis de rangos múltiples simple de comparación en función del factor Fase en cada una de las pilas. En la **Figura 19.A**, se observaron tres grupos de homogeneidad diferentes, quedando englobados dentro del mismo la etapa de enfriamiento y de maduración. Por otro lado, para el tratamiento A + F + RJ (**Figura 19.B**) El análisis de rangos múltiples dio como resultado 2 grupos de homogeneidad, aunque en general solaparon entre ellos. A su vez, esta se puede asociar con la termófila y con la fase de maduración. Asimismo, los tratamientos mostrados en **Figura 19.C** y **Figura 19.D** revelan un perfil similar en cuanto a tendencia y grupos de homogeneidad. En ambos casos se formaron dos grupos y no se mostraron diferencias estadísticamente significativas entre las muestras de MPR, TER y ENF.

## II. Microbiota actinomicetal

La información obtenida de actinobacterias reflejada en la **Figura 20** muestra un claro descenso del promedio logarítmico de este grupo de microorganismos. La excepción se muestra en la **Figura 20.D**, correspondiente a la pila denominada F + RH + RJ, donde en las dos últimas fases del proceso de compostaje no se observó variación en el recuento de actinobacterias. En cualquier caso, el elevado número de actinobacterias observado en la etapa termófila de la pila F + RH + RJ (**Figura 20.D**) y en la etapa de maduración de la pila A + RJ (**Figura 20.C**) concuerda con los resultados obtenidos por Takaku et al. (2006).

La microbiota actinomicetal es muy relevante durante el compostaje debido a su elevada capacidad enzimática, que permite a este grupo microbiano hidrolizar entramados de sustancias complejas, como celulosa o hemicelulosa (Camacho et al., 2014), por ello, su predominio durante las fases de enfriamiento y maduración, donde los únicos sustratos disponibles son polímeros como la lignina y celulosa, es coherente (Moreno y Mormeneo, 2011). De modo que, su presencia puede incluso llegar a considerarse un indicador de compost maduro (Estrella-González et al., 2020). En todas las pilas se obtuvo un producto final con una concentración entre 6 y 6,5 unidades logarítmicas/mL, que se aproxima al valor de 5 unidades logarítmicas/mL establecido por otros autores (Laich, 2011).



**Figura 20.** Cuantificación de la microbiota actinomicetal a lo largo del proceso de compostaje en cada una de las cuatro pilas estudiadas: A+F+RH+RJ (A), A+F+RJ (B), A+RJ (C) y F+RH+RJ (D). También se muestra el análisis simple (LSD 95%) para el factor Fase, sobre las barras de error.



Los datos obtenidos fueron sometidos a varios análisis estadísticos. Con el análisis de varianza de la **Tabla 8.A**, se aprecia que las diferentes fases influyen significativamente en los resultados, ya que tiene un Valor-P igual a 0. En cuanto al análisis de rangos múltiples realizado al factor tratamiento (**Tabla 8.B**), no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los diferentes tratamientos por lo que formaron un único grupo de homogeneidad.

Los resultados del análisis de varianza se ven representados en el análisis ANOVA simple de comparación de la **Figura 20**. En la **Figura 20.A**, se formaron tres grupos de homogeneidad, aunque se observó solape entre algunos de ellos. En los tratamientos A + F + RJ (**Figura 20.B**) y A + RJ (**Figura 20.C**) se formaron dos grupos de homogeneidad, donde no presentaron diferencias estadísticamente significativas las fases MPR, TER y ENF. En análisis realizado para los datos del tratamiento F+RH+RJ (**Figura 20.D**) se comprobó la formación de tres grupos de homogeneidad, pero no se observaron diferencias significativas entre la fase de ENF y PRF.

**Tabla 8.A.** Análisis de varianza para la cuantificación de bacterias obtenidas en el proceso, y su correspondiente repetición por analítica<sup>1</sup>.

Parámetros	Suma de cuadrados	GL	Cuadrado Medio	Razón – F	Valor – P
<b>A: TRATAMIENTO</b>	1,71	3	0,57	1,43	0,25
<b>B: FASE</b>	28,39	4	7,09	17,75	<b>0,00</b>
<b>C: REPETICIÓN</b>	0,093	2	0,05	0,12	0,89
<b>RESIDUAL</b>	15,59	39	0,40		
<b>CORREGIDO</b>	46,45	48			

<sup>1</sup>GL: Grados de libertad; F: Valor Crítico de la distribución de Fisher; P: Probabilidad (Nivel de Significación).

**Tabla 8.B.** Análisis de múltiple comparación (LSD 95%) para los valores obtenidos en bacterias en las distintas pilas.

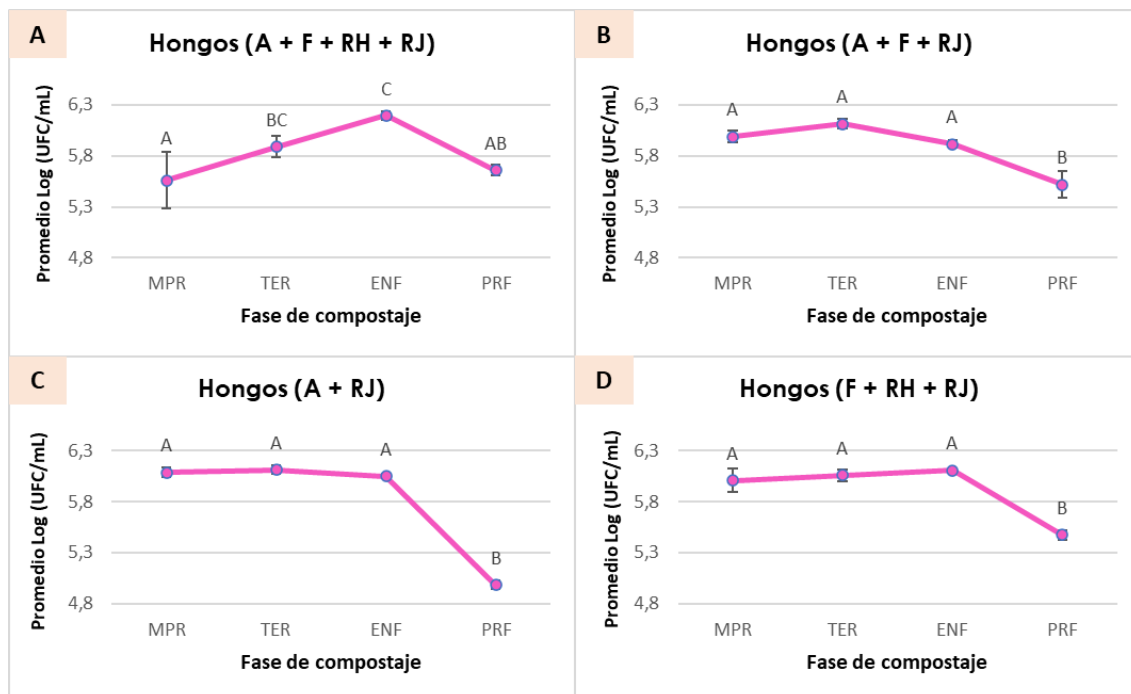
Tratamiento	Media Log (UFC/mL)	Grupo homogéneo
<b>A + F + RH + RJ</b>	7,51	A
<b>A + F + RJ</b>	7,12	A
<b>A + RJ</b>	7,56	A
<b>F + RH + RJ</b>	7,59	A

### III. Microbiota fúngica

En la **Figura 21** se representan los recuentos fúngicos realizados en cada una de las fases de los diferentes tratamientos. La tendencia general fue una ligera disminución de los mismos hasta la fase de enfriamiento a partir de la cual se observó una drástica disminución. En cambio, para el tratamiento A+F+RH+RJ (**Figura 21.A**) se produjo un aumento de la concentración de hongos, presentando un pico en la etapa de enfriamiento para posteriormente decaer en el producto final.

La presencia y abundancia de microbiota fúngica se ve condicionada fundamentalmente por la temperatura (Moreno y Mormeneo, 2011), este grupo microbiano es menos tolerante a este parámetro que las actinobacterias y bacterias (López-González et al., 2015). Sin embargo, en los resultados no se muestra un declive muy acentuado de concentración en la fase termófila, de hecho, se pudo observar un ligero aumento en todos los procesos de compostaje, aunque en la combinación de A + F + RH + RJ (**Figura 21.A**) fue más notable.

Tras el aumento del perfil térmico, en la fase de enfriamiento se espera que destaque la presencia de hongos gracias a la capacidad colonizadora de estos, así como a la termorresistencia de sus esporas (Estrella-González et al., 2020). La cantidad de microbiota fúngica del compost se adapta al porcentaje establecido por Laich (2011), que estima un valor final aproximado de 5 unidades logarítmicas.



**Figura 21.** Cuantificación de la microbiota fúngica a lo largo del proceso de compostaje en cada una de las cuatro pilas estudiadas: A+F+RH+RJ (A), A+F+RJ (B), A+RJ (C) y F+RH+RJ (D). También se muestra el análisis simple (LSD 95%) para el factor Fase, sobre las barras de error.

Al igual que en el caso de las actinobacterias, los datos del análisis de varianza de la **Tabla 9.A** indican que el único parámetro que influyó significativamente fue el factor Fase. Asimismo, los diferentes tratamientos de las cuatro pilas se agruparon en un mismo grupo de homogeneidad, lo cual implica que no existieron diferencias estadísticamente significativas entre los diferentes procesos realizados (**Tabla 9.B**).

**Tabla 9-A.** Análisis de varianza para la cuantificación de bacterias obtenidas en el proceso, y su correspondiente repetición por analítica<sup>1</sup>.

Parámetros	Suma de cuadrados	GL	Cuadrado Medio	Razón – F	Valor – P
<b>A: TRATAMIENTO</b>	0,22	3	0,07	0,98	0,41
<b>B: FASE</b>	4,37	4	1,09	14,93	<b>0,00</b>
<b>C: REPETICIÓN</b>	0,02	2	0,01	0,14	0,87
<b>RESIDUAL</b>	2,86	39	0,07		
<b>CORREGIDO</b>	7,42	48			

<sup>1</sup>GL: Grados de libertad; F: Valor Crítico de la distribución de Fisher; P: Probabilidad (Nivel de Significación).

**Tabla 9-B.** Análisis de múltiple comparación (LSD 95%) para los valores obtenidos en bacterias en las distintas pilas.

Tratamiento	Media Log (UFC/ml)	Grupo homogéneo
<b>A + F + RH + RJ</b>	5,70	A
<b>A + F + RJ</b>	5,75	A
<b>A + RJ</b>	5,85	A
<b>F + RH + RJ</b>	5,86	A

Los grupos de homogeneidad formados en el análisis ANOVA simple, en función del factor Fase, quedan reflejados en la **Figura 21**. En el primer tratamiento (**Figura 21.A**) se formaron dos grupos de homogeneidad, aunque se soplaron entre ellos. En el resto de los tratamientos se observó un patrón estadístico similar, PRF presentó diferencias estadísticamente significativas con el resto de muestreos.

#### 4.2. Cuantificación de agentes biofertilizantes

Para el estudio de los microorganismos sideróforos y solubilizadores de fosfato y potasio se llevó a cabo un análisis cualitativo donde se fijó una escala desde “no presente” hasta “muy presente”, representados con “-” y “+++”, respectivamente, para establecer la concentración de agentes biofertilizantes en cada una de las cuatro fases de cada proceso en función del tipo de tratamiento (**Tabla 10**).

## I. Solubilizadores de fosfato

Como se muestra en la **Tabla 10**, en el caso de la combinación de residuos algales con restos de poda de jardinería (A + RJ), se observó “presencia escasa” en la etapa de enfriamiento y PRF. Por otro lado, la pila A + F + RH + RJ mostró una mayor presencia de este grupo microbiano a medida que el proceso fue avanzando, finalizando con una “*presencia moderada*”. En el resto de tratamiento se observó “presencia escasa” en la etapa termófila, y “presencia escasa” en enfriamiento del tratamiento F + RH + RJ.

La presencia de solubilizadores de fosfato en el producto final es un indicador importante de la capacidad biofertilizante, ya que el fósforo es uno de los elementos vitales para el desarrollo vegetal (Constanza et al., 2014). Su escasa biodisponibilidad en algunos de los tratamientos pudo ser debida a la propia evolución de la microbiota asociada a esta capacidad durante el co-compostaje, resultados que coinciden con los descrito por Wei et al. (2017).

**Tabla 10.** Evaluación cualitativa según escala<sup>1</sup> del número de biofertilizantes a lo largo del proceso de compostaje en cada uno de los cuatro tratamientos del ensayo.

Tratamiento	Fase de compostaje	Solubilizadores de P	Solubilizadores de K	Sideróforos
<b>A + F + RH + RJ</b>	<i>MPR</i>	-	-	-
	<i>TER</i>	+	+	-
	<i>ENF</i>	+	-	+
	<i>PRF</i>	++	-	+++
<b>A + F + RJ</b>	<i>MPR</i>	-	+	-
	<i>TER</i>	+	++	+
	<i>ENF</i>	-	-	+
	<i>PRF</i>	-	-	++
<b>A + RJ</b>	<i>MPR</i>	-	+	+
	<i>TER</i>	-	++	++
	<i>ENF</i>	+	-	+
	<i>PRF</i>	+	-	+++
<b>F + RH + RJ</b>	<i>MPR</i>	-	+	-
	<i>TER</i>	+	++	+
	<i>ENF</i>	+	-	-
	<i>PRF</i>	-	+	++

<sup>1</sup>Escala:

- = no presencia (0 colonias)    + = presencia escasa (1-5 colonias)    ++ = presencia moderada (6-10 colonias)

+++ = presencia elevada (>10 colonias)

## II. Solubilizadores de potasio

Según la **Tabla 10**, sólo en la pila F + RH + RJ se llegó a detectar la presencia de organismos solubilizadores de potasio en el producto final, mientras que en el resto de los tratamientos sólo se encontró este tipo de microbiota especializada en las etapas iniciales del proceso. En la mayoría de tratamientos se observó una “presencia moderada” en la etapa termófila, salvo en A + F + RH + RJ donde fue “presencia escasa”. Estos resultados ponen de manifiesto la escasa presencia de estos microorganismos en las fases finales del proceso.

## III. Sideróforos

La presencia de los quelantes de hierro es muy evidente en todos los tratamientos (**Tabla 10**), siendo A + F + RH + RJ y A + RJ donde se han alcanzado una “*elevada presencia*” en el producto final. Mientras que en las pilas A + F + RJ, A + RJ y F + RH + RJ se encuentran sideróforos en las fases más tempranas, lo cual puede indicar una posible capacidad termorresistente de los mismos. Su importancia no solo reside en la obtención de hierro, si no que su secreción es capaz de inhibir el crecimiento de otros microorganismos gracias a su capacidad antibiótica, impidiendo así el crecimiento de patógenos al limitar la cantidad de hierro disponible (Aguado et al., 2012).

## 4.3. Evaluación de la microbiota funcional relacionada con el ciclo biogeoquímico del nitrógeno

### I. Fijadores de Nitrógeno

En la **Figura 22** se observan los recuentos de los microorganismos capaces de fijar nitrógeno, con valores que oscilaron entre 5,0 y 6,4 unidades logarítmicas/mL. Aunque se aprecian fluctuaciones entre las diferentes fases, y no hay un patrón establecido, en todos los tratamientos el producto final presentó una concentración similar de fijadores de nitrógeno.

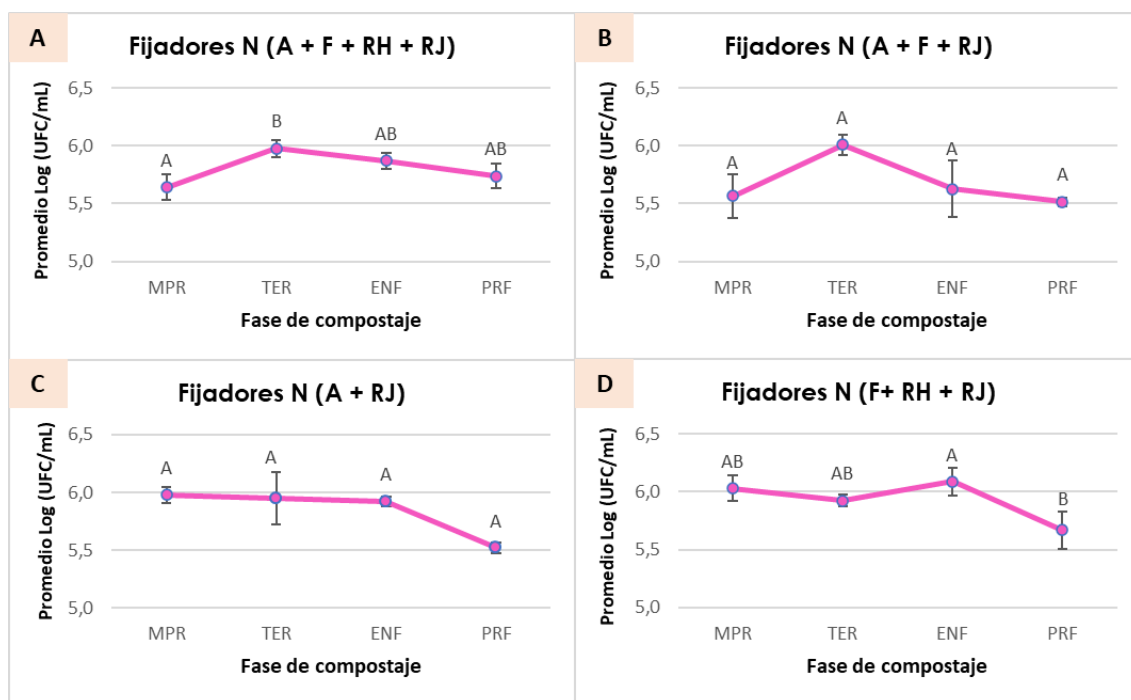
En el estudio de Pahuara y Zúniga (2011) se encontraron poblaciones variables entre 10.000 y 40.000 UFC/mL y, a pesar de considerarlos números muy bajos, en dicho trabajo se destacó la importancia de la presencia de estos microorganismos en las plantas, gracias a su capacidad para fijar nitrógeno atmosférico, formar ATP y otras moléculas orgánicas, como vitaminas. Sin embargo, el nitrógeno no es fácilmente asimilable (Florida, 2019). En los resultados obtenidos, el producto final contenía valores iguales o superiores a 5,5 unidades logarítmicas/mL, siendo el tratamiento A + F + RH + RJ (**Figura 22.A**) en el que se observó mayor presencia de este tipo de microorganismos funcionales.

El aumento inicial de la microbiota fijadora de nitrógeno mostrada en los tratamientos A + F + RH + RJ (**Figura 22.A**) y A + F + RJ (**Figura 22.B**) pudo ser ocasionado por la oxidación de la materia orgánica, que supone la liberación de calor que arrastra con él una parte de nitrógeno en el vapor de agua. Además, esto también permite la reducción del porcentaje de carbono por la expulsión de CO<sub>2</sub> tras la transformación aerobia de la materia orgánica de las pilas. El posterior descenso en las fases de enfriamiento y maduración, observado en todos los tratamientos, es

consecuencia de la disminución de la materia orgánica que supone el avance del compostaje (Montalvo et al., 2018).

El análisis de la varianza (**Tabla 11.A**) refleja que los factores Tratamiento y Fase tienen un Valor-P inferior a 0,05, lo cual indica diferencias significativas entre los diferentes tratamientos y entre las diferentes fases. Por otro lado, al realizar el análisis de rangos múltiples para el factor tratamiento se observó que se formaron dos grupos de homogeneidad, aunque se produjeron solapes como ocurrió con los tratamientos A + F + RH + RJ y A + RJ.

En el análisis ANOVA simple de cada uno de los tratamientos, donde solo se tiene en cuenta el factor Fase, mostró que no hubo diferencias estadísticamente significativas entre las diferentes fases de los tratamientos A + F + RJ (**Figura 22.B**) y A + RJ (**Figura 20.C**). En cambio, en la **Figura 20.A**, se muestra que existen diferencias significativas entre la fase inicial y la fase termófila. En cambio, en el tratamiento F + RH + RJ fueron las etapas finales del proceso en las que se observó la presencia de diferencias significativas en las fases.



**Figura 24.** Cuantificación del número de fijadores de nitrógeno a lo largo del proceso de compostaje en cada una de las cuatro pilas estudiadas: A+F+RH+RJ (A), A+F+RJ (B), A+RJ (C) y F+RH+RJ (D). También se muestra el análisis simple (LSD 95%) para el factor Fase, sobre las barras de error.

**Tabla 11.A.** Análisis de varianza para la cuantificación de bacterias obtenidas en el proceso, y su correspondiente repetición por analítica<sup>1</sup>.

Parámetros	Suma de cuadrados	GL	Cuadrado Medio	Razón – F	Valor – P
<b>A: TRATAMIENTO</b>	0,53	3	0,18	2,93	<b>0,05</b>
<b>B: FASE</b>	0,69	4	0,17	2,88	<b>0,04</b>
<b>C: REPETICIÓN</b>	0,13	2	0,06	1,07	0,35
<b>RESIDUAL</b>	2,34	39	0,06		
<b>CORREGIDO</b>	3,67	48			

<sup>1</sup>GL: Grados de libertad; F: Valor Crítico de la distribución de Fisher; P: Probabilidad (Nivel de Significación).

**Tabla 11.B.** Análisis de múltiple comparación (LSD 95%) para los valores obtenidos en bacterias en las distintas pilas.

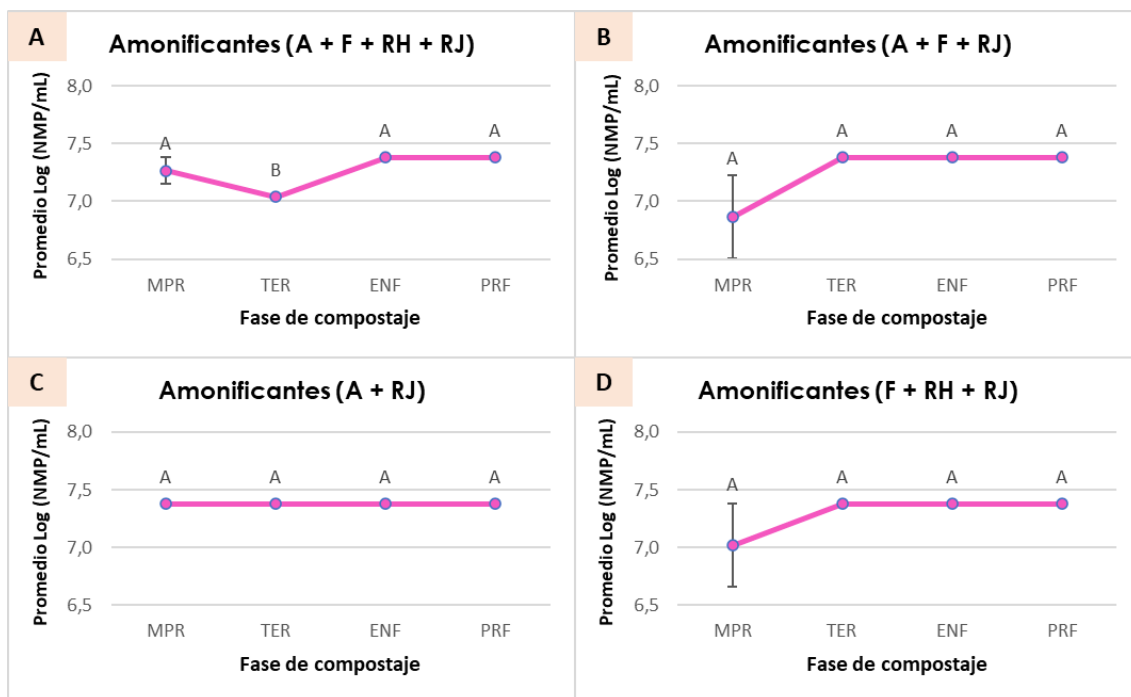
Tratamiento	Media Log (UFC/ml)	Grupo homogéneo
<b>A + F + RH + RJ</b>	5,74	AB
<b>A + F + RJ</b>	5,58	A
<b>A + RJ</b>	5,77	AB
<b>F + RH + RJ</b>	5,87	B

## II. Amonificantes

La cuantificación de microorganismos amonificantes se muestra en la **Figura 23**, donde se observan unos niveles elevados desde el comienzo del compostaje. El rango de valores osciló entre 6,9 y 7,4 unidades logarítmicas/mL.

Aunque la actividad amonificante se manifiesta en todas las etapas del compostaje, ocurre fundamentalmente durante la fase bio-oxidativa, cuando el nitrógeno orgánico se transforma a su forma inorgánica (López, 2015). Sin embargo, en los datos obtenidos, las mayores concentraciones aparecen al final de proceso.

El tratamiento A + RJ (**Figura 23.C**) alcanzó la máxima concentración desde la fase mesófila, y se mantuvo hasta la obtención del producto final (PRF). En el caso de A + F + RJ (**Figura 23.B**) y F + RH + RJ (**Figura 23.D**), hubo un aumento en la fase termófila que se mantuvo a lo largo del proceso. En cuanto al tratamiento A+F+RH+RJ (**Figura 23.A**) presentó un ligero descenso en la fase termófila, pero se incrementó en las fases finales, presentando valores superiores a los mostrados en MPR.



**Figura 23.** Cuantificación del número de amonificantes a lo largo del proceso de compostaje en cada una de las cuatro pilas estudiadas: A+F+RH+RJ (A), A+F+RJ (B), A+RJ (C) y F+RH+RJ (D). También se muestra el análisis simple (LSD 95%) para el factor Fase, sobre las barras de error.

La influencia del factor Fase en los resultados se ve reflejada en el análisis de varianza (**Tabla 12.A**), con un Valor-P de 0,0445, lo cual indica diferencias estadísticamente significativas a lo largo del proceso. Por otro lado, la **Tabla 12.B** muestra el análisis de rangos múltiples para el factor tratamiento. Según lo observado en la tabla, solo hubo un grupo de homogeneidad por lo que no se apreciaron diferencias significativas entre los diferentes tratamientos. En el análisis ANOVA simple respecto al factor fases, se formó en todos los casos un único grupo de homogeneidad, a excepción del tratamiento A + F + RH + RJ (**Figura 23.A**), donde se formaron dos grupos de homogeneidad, siendo la etapa termófila donde se observaron diferencias con respecto a las otras fases del proceso.

**Tabla 12.A.** Análisis de varianza para la cuantificación de bacterias obtenidas en el proceso, y su correspondiente repetición por analítica<sup>1</sup>.

Parámetros	Suma de cuadrados	GL	Cuadrado Medio	Razón – F	Valor – P
<b>A: TRATAMIENTO</b>	0,12	3	0,04	0,72	0,55
<b>B: FASE</b>	0,49	3	0,16	2,95	<b>0,04</b>
<b>C: REPETICIÓN</b>	0,10	2	0,05	0,92	0,41
<b>RESIDUAL</b>	2,15	39	0,06		
<b>CORREGIDO</b>	2,85	47			

<sup>1</sup>GL: Grados de libertad; F: Valor Crítico de la distribución de Fisher; P: Probabilidad (Nivel de Significación).



**Tabla 12.B.** Análisis de múltiple comparación (LSD 95%) para los valores obtenidos en bacterias en las distintas pilas.

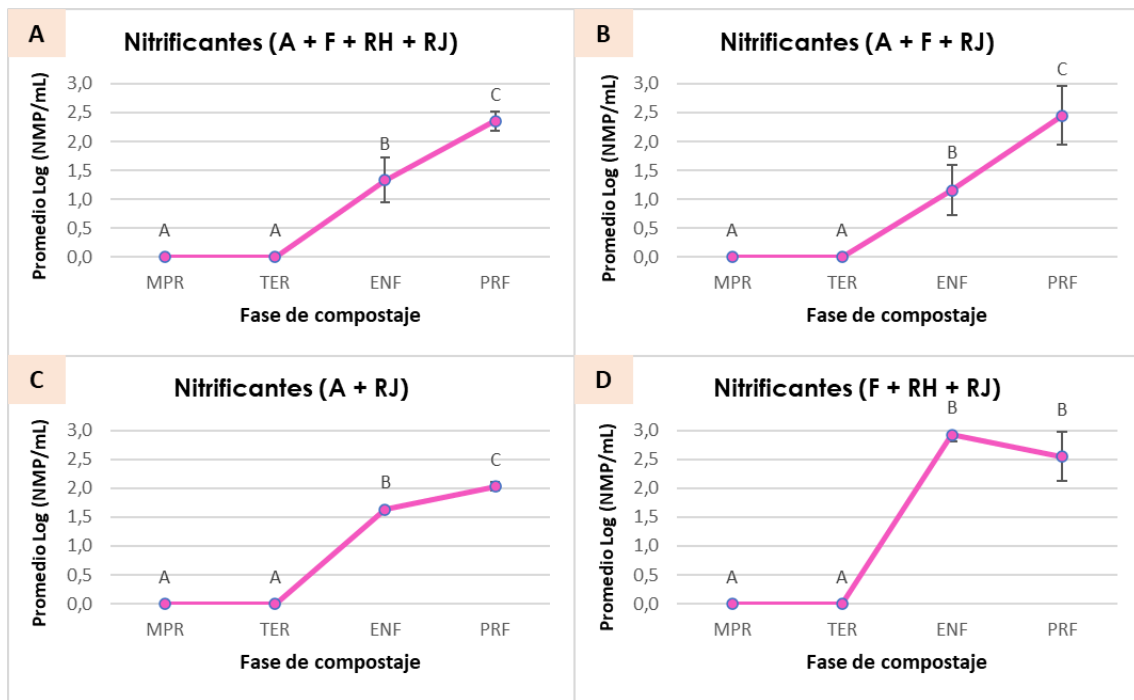
Tratamiento	Media Log (UFC/ml)	Grupo homogéneo
<b>A + F + RH + RJ</b>	7,27	A
<b>A + F + RJ</b>	7,25	A
<b>A + RJ</b>	7,29	A
<b>F + RH + RJ</b>	7,38	A

### III. Nitrificantes

Los valores obtenidos para el estudio de los microorganismos con capacidad nitrificante oscilaron entre 0 y 3 unidades logarítmicas/mL. Aparecen representados en la **Figura 24**. Independientemente del tratamiento, se pudo observar un patrón claro entre todos los tratamientos de compostaje estudiados: ausencia en las primeras etapas y presencia en las últimas fases.

Al inicio del proceso la concentración de nitrificantes fue nula, ya que los microorganismos con esta capacidad probablemente se vieron inhibidos por las altas temperaturas y la excesiva presencia de amonio. Sin embargo, a partir de la fase termófila comenzó su ascenso (Montalvo, 2019). Todos los tratamientos siguieron esta pauta, excepto F + RH + RJ (**Figura 24.D**), que en la fase de maduración descendió ligeramente.

Es importante que estos microorganismos estén en el producto final, ya que su presencia está estrechamente relacionada con la reducción o solución de problemas de toxicidad que pueden llegar a generar la microbiota amonificante. Además, su formación se asocia a la estabilidad del compost y al alcance de su madurez (Siles-Castellano et al., 2020).



**Figura 26.** Cuantificación del número de nitrificantes a lo largo del proceso de compostaje en cada una de las cuatro pilas estudiadas: A+F+RH+RJ (A), A+F+RJ (B), A+RJ (C) y F+RH+RJ (D). También se muestra el análisis simple (LSD 95%) para el factor Fase, sobre las barras de error.

Como se puede observar en la **Tabla 13-A** el factor Fase es el único con un Valor-P < 0,05, lo cual implica la presencia de diferencias estadísticamente significativas de manera global en función de la fase del proceso. En cuanto al análisis de rangos múltiples en función del factor tratamiento (**Tabla 13-B**), no se observaron diferencias entre los diferentes tratamientos.

La influencia del factor Fase se manifiesta en el análisis ANOVA simple, donde en los tratamientos de las **Figuras A-C**, se observó un patrón común en cuanto a grupos de homogeneidad se refiere: MPR-TER, ENF y PRF. En cambio, para el tratamiento F + RH + RJ (**Figura 24.D**), se diferenciaron claramente dos grupos de homogeneidad correspondientes a MPR-TER y ENF-PRF.

**Tabla 13-A.** Análisis de varianza para la cuantificación de bacterias obtenidas en el proceso, y su correspondiente repetición por analítica<sup>1</sup>.

Parámetros	Suma de cuadrados	GL	Cuadrado Medio	Razón – F	Valor – P
<b>A: TRATAMIENTO</b>	1,01	3	0,34	1,67	0,19
<b>B: FASE</b>	50,53	3	16,84	83,30	<b>0,00</b>
<b>C: REPETICIÓN</b>	0,94	2	0,47	2,33	0,11
<b>RESIDUAL</b>	7,89	39	0,20		
<b>CORREGIDO</b>	60,37	47			

<sup>1</sup>GL: Grados de libertad; F: Valor Crítico de la distribución de Fisher; P: Probabilidad (Nivel de Significación).

**Tabla 13-B.** Análisis de múltiple comparación (LSD 95%) para los valores obtenidos en bacterias en las distintas pilas.

Tratamiento	Media Log (UFC/mL)	Grupo homogéneo
A + F + RH + RJ	0,90	A
A + F + RJ	0,91	A
A + RJ	0,92	A
F + RH + RJ	1,25	A

#### IV. Desnitrificantes

El estudio de desnitrificantes describió una ausencia total de estos microorganismos. Se emplearon las diluciones  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$  y  $10^{-3}$  para realizar el ensayo, pero todos los tubos fueron negativos, de modo que no se pudo aplicar la Técnica del Número Más Probable.

Su presencia es esperada en las últimas fases del compostaje, donde las condiciones son más óptimas para su crecimiento. Sin embargo, la falta de desnitrificantes supone una clara ventaja para el proceso, ya que implica una pérdida de nitrógeno en el producto final. Los desnitrificantes se encargan de transformar el nitrato en nitrógeno atmosférico, haciendo que deje de ser accesible para las plantas (Aristizábal y Cerón, 2012).

#### 4.4. Estudio de la correlación

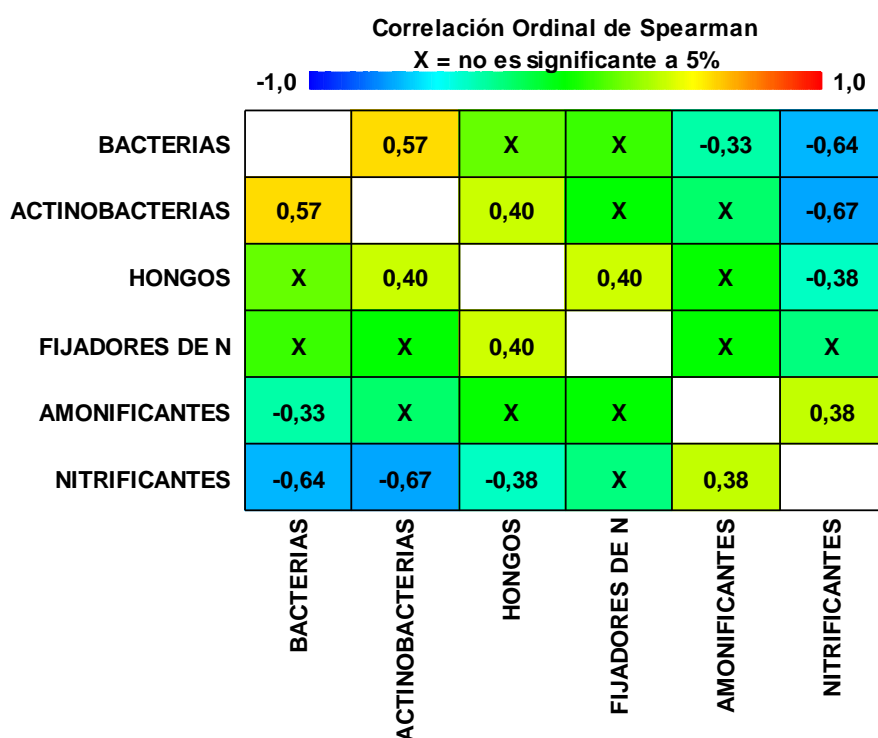
La fuerza de asociación entre las variables se analizó mediante la correlación ordinal de Spearman, que genera una tabla donde se muestra la dependencia estadística entre las variables que se han analizado de forma cuantitativa (Bacterias, Actinobacterias, Hongos, Fijadores de Nitrógeno, Amonificantes y Nitrificantes) (**Figura 25**). La interpretación del coeficiente de Spearman varía entre los valores -1 y +1, aquellos que son próximos a 1 indican que la correlación es fuerte y positiva, mientras que los cercanos a -1 señalan lo contrario. Por otro lado, afirma que no existe correlación lineal si el resultado es 0 y se considera insignificante cuando es inferior a 0,05.

En este caso, en cuanto a la microbiota bacteriana, se pudo observar una correlación positiva con actinobacterias, presentando el valor máximo de correlación alcanzado en todo el análisis (0,57); lo cual puede ser indicativo de que ambas aumentaron al mismo tiempo. Esto pudo deberse a que las actinobacterias pertenecen al dominio Bacteria, de modo que su comportamiento en la pila de compostaje podría considerarse similar (López-González et al., 2013). Sin embargo, con los microorganismos amonificantes y nitrificantes se observó lo contrario, obteniendo valores de -0,33 y -0,64, respectivamente. Los nitrificantes comenzaron con valores nulos y tras la fase termófila aumentaron considerablemente hasta la etapa final, mientras que el patrón de las bacterias fue descendente desde la primera fase, donde mostraron

valores elevados. En cuanto a los amonificantes, su estabilidad durante prácticamente todo el compostaje supuso la correlación negativa con las bacterias.

Por otro lado, aunque las actinobacterias sean un filo bacteriano, no se encuentra ningún tipo de relación con los amonificantes, pero sí con los nitrificantes. La capacidad termorresistente característica de actinomicetos contrasta con la ausencia de termotolerancia de estos microorganismos del ciclo del nitrógeno (-0,67). Además, la microbiota actinomicetal se correlacionó de forma positiva con los hongos (0,40). Aunque, según bibliografía, estos microorganismos eucariotas disminuyen su concentración en la fase termófila, los resultados del estudio desvelaron lo contrario, de modo que se asemejaron al modelo seguido por las actinobacterias.

Al igual que en actinobacterias, la asociación entre la microbiota fúngica y nitrificante generó una correlación negativa (-0,38). No obstante, compartió una correlación de 0,40 con otro de los grupos del ciclo del nitrógeno, los fijadores de nitrógeno, que aumentó con la subida de las temperaturas y, posteriormente, descendió su concentración en el resto de fases del compostaje. Cabe destacar que los fijadores de nitrógeno solo mostraron asociación con los hongos.



**Figura 25.** Correlación de Spearman (LSD 95%) para todas las variables analizadas de forma cuantitativa (Bacterias, Actinobacterias, Hongos, Fijadores de Nitrógeno, Amonificantes y Nitrificantes).

La microbiota asociada al proceso de compostaje es la última responsable no sólo de transformar la materia orgánica en general, sino aquella difícilmente biodegradable en particular. En este contexto, la aplicación de procesos de transformación como el compostaje que permitan, además, obtener subproductos con valor añadido como el compost, parece una ventaja y una necesidad para alcanzar sistemas económicos más sostenibles a partir de materias a priori altamente recalcitrantes como la biomasa del alga *Rugulopterix okamurae*, considerada un residuo orgánico contaminante que se acumula con cada vez más asiduidad en las costas del Mediterráneo. Esta propuesta tiene sentido, ya que la microbiota funcional asociada a los procesos de compostaje del alga demuestra el potencial agronómico de los productos finales obtenidos del co-compostaje con distintos materiales residuales también típicos del área de impacto. Además, gracias a los microorganismos presentes en las pilas, a pesar de emplearse diferentes combinaciones de materias primas, el proceso logra alcanzar evoluciones similares, lo cual permite diversificar el empleo de los residuos combinados durante los procesos de co-compostaje con el alga invasora.

## 5. CONCLUSIONES

En base a los resultados obtenidos durante la ejecución del presente trabajo, se extrajeron las siguientes conclusiones:

1. Todas las pilas de compostaje mostraron la presencia de una microbiota heterogénea compuesta por bacterias, actinobacterias y hongos termotolerantes, lo cual permite la adaptación de estos microorganismos tanto a condiciones mesófilas como termófilas.
2. Los microorganismos amonificantes y nitrificantes se posicionan como los más representativos del ciclo del nitrógeno en el compost, siendo este un aspecto muy beneficioso gracias a su intervención a la hora de mejorar la biodisponibilidad de este elemento para los cultivos.
3. La inexistencia de microbiota desnitrificante en todas las pilas de compostaje estudiadas es indicativo de que el nitrógeno permanece biodisponible para las plantas y no se disipa durante el proceso de transformación.
4. La presencia de agentes solubilizadores de fosfato y potasio en el compost final es limitada. Pese a la ausencia de estos microorganismos con gran capacidad biofertilizante, encontramos una alta densidad de quelantes de hierro en todas las pilas de compostaje.
5. El tratamiento que ha generado los mejores resultados y se presenta como el más prometedor es A + F + RH + RJ, el compost con más componentes, ya que muestra la mayor proporción de actinobacterias y microbiota con capacidad biofertilizante.

**FINANCIACIÓN:** Este trabajo ha sido financiado por el Proyecto “Estudio de caracterización del alga invasora *Rugulopteryx okamurae* y posible valorización de su biomasa en las costas de Andalucía.” Código PP.FEM.DIP2019.001, y encuadrada en la Acción Fondo Europeo Marítimo y de Pesca.

## 6. BIBLIOGRAFÍA

- Aguado, G. A., Moreno, B., Jiménez, B., García, E. y Preciado, R. E. (2012). Impacto de los sideróforos microbianos y fitosideróforos en la asimilación de hierro por las plantas: una síntesis. *Fitotecnia Mexicana*, vol.35, 9-21.
- Aquae Fundación. (2013). Posidonia oceánica, la planta esencial del Mediterráneo. Recuperado el 7 de marzo de 2022 de <https://www.fundacionaquae.org/wiki/posidonia-una-planta-no-alga-marina-imprescindible/>.
- Aristizábal, F. A., y Cerón, L. E. (2012). Dinámica del ciclo del nitrógeno y fósforo en suelos. *Colombiana de Biotecnología*, vol.14, 285–295.
- Asadu, C. O., Ike, I. S., Onu, C. E., Egbuna, S. O., Onoh, M. I., Mbah, G. O., y Eze, C. N. (2020). Investigation of the influence of biofertilizer synthesized using microbial inoculums on the growth performance of two agricultural crops. *Biotechnology Reports*, vol.27, e00493.
- Aquilla, E. S. (2019). Co-compostaje de gallinaza de la Granja Avícola Fernandita de la ciudad de Riobamba. Trabajo de Titulación. Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Riobamba, Ecuador.
- Beltrán, M. E. (2015). La solubilización de fosfatos como estrategia microbiana para promover el crecimiento vegetal. *Ciencia y Tecnología Agropecuaria*, vol.15, 101-130.
- Bernardeau, J. (2015). Ecología de Macroalgas Marinas Exóticas: aproximación a los factores que regulan la colonización de *Caulerpa cylindracea* en el Mediterráneo y su interacción con los hábitats bentónicos (praderas de *Posidonia Oceánica*). Recuperado el 1 de abril de 2022 de [https://rua.ua.es/dspace/bitstream/10045/53702/1/tesis\\_jaime\\_bernardeau\\_esteller.pdf](https://rua.ua.es/dspace/bitstream/10045/53702/1/tesis_jaime_bernardeau_esteller.pdf).
- Bonito, G., Isikhuemhen, O. S., y Vilgalys, R. (2010). Identification of fungi associated with municipal compost using DNA-based techniques. *Bioresource Technology*, vol.101, 1021-1027.
- Bueno, P., Díaz, M. J., y Cabrera, F. (2011). Factores que afectan al proceso de compostaje. En: Moreno, J., Moral, R. *Compostaje*, 93-110. Mundi-prensa, Madrid.
- Bueno, P., Tapias, R., López, F., y Díaz, M. J. (2008). Optimizing composting parameters for nitrogen conservation in composting. *Bioresource Technology*, vol.99, 5069-5077.

- Camacho, D., Martínez, L., Ramírez, H., Valenzuela, R. y Valdés, M. (2014). Potencial de algunos microorganismos en el compostaje de residuos sólidos. *Terra Latinoamericana*, vol.32, 291-300.
- Casal-Porras, I., Zubía, E., y Brun, F. G. (2021). Dilkamural: A novel chemical weapon involved in the invasive capacity of the alga *Rugulopteryx okamurae* in the Strait of Gibraltar. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, vol.257, 107398.
- Castaldi, P., y Melis, P. (2004). Growth and yield characteristics and heavy metal content on tomatoes grown in different growing media. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, vol.35, 85-98.
- Castillo-Rodríguez, F. (2005). *Biotecnología Ambiental*. Tébar Flores, 1ª ed, Madrid.
- Constanza, L., Yurieth, Z., y Moreno, V. E. (2014). Solubilización de fosfatos: una función microbiana importante en el desarrollo vegetal. *Científica en Ciencias Biomédicas*, vol.12, 1794-2470.
- Dawson, E. Y., Hwang, I. K., Lee, W. J., Kim, H. S. (2009). Catálogo español de especies exóticas invasoras. Recuperado el 12 de abril de 2022 de [https://www.miteco.gob.es/es/biodiversidad/temas/conservacion-de-especies/mtjrugulopteryxokamurae\\_tcm30-523165.pdf](https://www.miteco.gob.es/es/biodiversidad/temas/conservacion-de-especies/mtjrugulopteryxokamurae_tcm30-523165.pdf).
- Docampo, R. (2013). Compostaje y compost. *Revista INIA Las Brujas*. Recuperado el 10 de abril de 2022 de <http://www.ainfo.inia.uy/digital/bitstream/item/1839/1/128221231213112259.pdf>
- Espinosa, E. (2009). Especies invasoras en el Mediterráneo. *Ecologistas en Acción*. Recuperado el 10 de marzo de 2022 de: <https://www.ecologistasenaccion.org/18369/especies-invasoras-en-el-mediterraneo/>
- Estrella-González, M. J., Suárez-Estrella, F., Jurado, M. M., López, M. J., López-González, J. A., Siles-Castellano, A. B., Muñoz-Mérida, A., y Moreno, J. (2020). Uncovering new indicators to predict stability, maturity and biodiversity of compost on an industrial scale. *Bioresource Technology*, vol.313, 123557.
- Figueroa, F. L., Mercado, J. M., Moreno-Ostos, E., Sánchez, P., Franco, F., Bañares, E., Alarcón, F., Recuna, M., y Noriega, J. (2020). Invasión de la especie exótica *Rugulopteryx okamurae* en Andalucía: II. *Boletín de la Sociedad Española de Ficología. Foro Alga Invasora*. Recuperado el 7 de marzo de 2022 de [http://www.repositorio.ieo.es/e-ieo/bitstream/handle/10508/11780/Algas%20II\\_Figueroa%20et%20al.pdf?sequence=1&isAllowed=y](http://www.repositorio.ieo.es/e-ieo/bitstream/handle/10508/11780/Algas%20II_Figueroa%20et%20al.pdf?sequence=1&isAllowed=y).
- Figueroa, F., Serrano, T., Vega, J., Sánchez, R., y Gómez, M. (2019). Control del alga invasora *Rugulopteryx okamurae* con un enfoque de Biotecnología y Desarrollo Azul. *Jornadas de Estudio e Investigación. Departamento de Ecología, Facultad de Ciencias, Universidad de Málaga*. Recuperado el 9 de mayo de 2022 de

[http://www.galpcadizestrecho.com/wp-content/uploads/2019/07/P6.-F%C3%A9lix\\_L%C3%B3pez-Figueroa\\_JORNADA-RUGULOPTERYX-1-JULIO-v3.ok\\_.pdf](http://www.galpcadizestrecho.com/wp-content/uploads/2019/07/P6.-F%C3%A9lix_L%C3%B3pez-Figueroa_JORNADA-RUGULOPTERYX-1-JULIO-v3.ok_.pdf).

- Flores, M. E., y López, V. (2017). Biotransformación de residuos orgánicos en la Secretaría Distrital de Salud. Trabajo Fin de Grado. Universidad Distrital Francisco José de Caldas, Bogotá, Colombia.
- Florida, N., Hildauro, J., García, P., Santos, J., Escobar, F., y Torres, J. (2019). Efecto de compost y NPK sobre los niveles de microorganismos y cadmio en suelo y almendra de cacao. *Investigaciones Altoandinas*, vol.21, 264-273.
- García, T. (2020). La invasión del alga asiática tiende a la estabilización. *Diario de Cádiz*. Recuperado el 9 de marzo de 2022 de: [https://www.diariodecadiz.es/noticias-provincia-cadiz/invasion-alga-asiatica-resultados-estudio\\_0\\_1529847234.html](https://www.diariodecadiz.es/noticias-provincia-cadiz/invasion-alga-asiatica-resultados-estudio_0_1529847234.html).
- García-Gómez, J. C., Sempere-Valverde, J., Ostalé-Valriberas, E., Martínez, M., Olaya-Ponzone, L., González, A. R., Espinosa, F., Sánchez-Moyano, E., Megina, C., y Parada, J. A. (2018). *Rugulopteryx okamurae* (EY Dawson) IK Hwang, WJ Lee y HS Kim (*Dictyotales, Ochrophyta*), alga exótica “explosiva” en el estrecho de Gibraltar. Observaciones preliminares de su distribución e impacto. *Almoraima*, vol.48, 97-113.
- Guevara, M. F. (2010). Aislamiento e identificación de microorganismos solubilizadores de potasio a partir de muestras de suelo y raíces de cultivos de alcachofa en la localidad de la remonta, cantón Cayambe. Proyecto de titulación previo a la obtención del título de Ingeniería en Biotecnología. ESPE, Sangolquí, Ecuador, vol.63.
- Han, W., Clarke, W., y Pratt, S. (2014). Composting of waste algae: A review. *Waste Management*, vol.34, 1148-1155.
- Iglesias, E. (2019). Aspectos físico-químicos, bioquímicos y microbiológicos del proceso de compostaje. Evaluación de la calidad - *Unidad temática, 4*, 3-4.
- Jurado, M. M., Suárez-Estrella, F., Vargas-García, M. C., López, M. J., López-González, J. A., y Moreno, J. (2014). Increasing native microbiota in lignocellulosic waste composting: Effects on process efficiency and final product maturity. *Process Biochemistry* vol.49, 1958–1969.
- Laich, F. (2011). El papel de los microorganismos en el proceso de compostaje. Unidad de Microbiología Aplicada. Instituto Canario de Investigaciones Agrarias, Santa Cruz de Tenerife, España.
- Lechu, J. S. (2018). *Rugulopteryx okamurae* (E.Y.Dawson) I.K.Hwang, W.J.Lee y H.S.Kim. Biodiversidad Virtual Peces. Recuperado el 12 de abril de 2022 de [https://www.biodiversidadvirtual.org/peces/Rugulopteryx-okamurae-\(E.Y.Dawson\)-I.K.Hwang-W.J.Lee-y-H.S.Kim-img8919.html](https://www.biodiversidadvirtual.org/peces/Rugulopteryx-okamurae-(E.Y.Dawson)-I.K.Hwang-W.J.Lee-y-H.S.Kim-img8919.html).
- López-González, J. A. (2015). Aspectos microbiológicos del proceso de compostaje de restos vegetales. Tesis Doctoral. Universidad de Almería, Almería, España.



- López-González, J. A., López, M. J., Vargas-García, M. C., Suarez-Estrella, F., Jurado, M., y Moreno, J. (2013). Tracking organic matter and microbiota dynamics during the stages of lignocellulosic waste composting. *Bioresource Technology*, vol.146, 574–584.
- López-González, J. A., Suárez-Estrella, F., Vargas-García, M. C., López, M. J., Jurado, M. M., y Moreno, J. (2015). Dynamics of bacterial microbiota during lignocellulosic waste composting: Studies upon its structure, functionality and biodiversity. *Bioresource Technology* vol.175, 406– 416.
- Madejón, E., Madejón, P., García de Arboleya, C., Puente, C., y Pérez de Mora, A. (2020). Proceso de compostaje de algas marinas. Limitaciones y perspectivas. *Compostaje Webinars 2020*, 232-236.
- Mar Mediterráneo. (2015). En Mapa del Mar Mediterráneo. Recuperado el 8 de abril de 2022 de [https://es.wikipedia.org/wiki/Mar\\_Mediterr%C3%A1neo](https://es.wikipedia.org/wiki/Mar_Mediterr%C3%A1neo).
- Minda, Y., Xiaosong, H., Jiaomei, Liu., Yuefeng, W., Beidou, X., Dan, L., Hui, Z., y Yang, C. (2018). Characterization of isolated fractions of dissolved organic matter derived from municipal solid waste compost. *Science of The Total Environment*, vol.635, 275-283.
- Montalvo, J., Aurelia, P., Ortiz, L. P., Calle, J. L., Asunción, L., Flor, M y Figueroa, L. (2018). Transformación del nitrógeno durante el compostaje de bosta de caballo. *Producción + Limpia*, vol.13, 77-88.
- Moreno, J., López-González, J. A., Arcos-Nievas, M. A., Suárez-Estrella, F., Jurado, M. M., Estrella-González, M. J., y López, M. J. (2021). Revisiting the succession of microbial populations throughout composting: A matter of thermotolerance. *Science of The Total Environment* vol.773, 145587.
- Moreno, J., y Mormeneo, S. (2008). Microbiología y bioquímica del proceso de compostaje. En: Moreno, J., y Moral, R. *Compostaje*, 111-140. Mundi-prensa, Madrid.
- Orchardson, E. (2020). Aplicación óptima de fertilizantes nitrogenados para arroz y trigo en las llanuras indogangéticas de India. International Maize and Wheat Improvement Center. Recuperado del 25 de marzo de 2022 de <https://www.cimmyt.org/es/noticias/el-nitrogeno-en-la-agricultura/>.
- Öztürk, B., e İşinibilir, M. (2010). An alien jellyfish *Rhopilema nomadica* and its impacts to the Eastern Mediterranean part of Turkey. *Black Sea Mediterranean Environment*, vol.16, 149-156.
- Pahuara, D., y Zúñiga, D. (2001). Efecto del fósforo sobre la población microbiana en suelos con pasturas en la zona altoandina de Junin. *Ecología Aplicada*, vol.1, 57-64.
- Plantasflores.com. Identificación de Plantas. Recuperado el 12 de abril de 2022, de <https://plantasflores.com>

- Rubia, N. (2016). Expansión e impactos de 3 algas invasoras que amenazan las praderas de *Posidonia oceánica* (L.) Delile (Posidoniaceae). Trabajo Fin de Grado. Universidad de Almería, Almería, España.
- Sánchez, O. J., Ospina, D., y Montoya, S. (2017). Compost supplementation with nutrients and microorganisms in composting process. *Waste Management*, vol.69, 136-153.
- Siles-Castellano, A. B., López, M. J., Jurado, M. M., Suárez-Estrella, F., López-González, J. A., Estrella-González, M. J., y Moreno, J. (2020). Industrial composting of low carbon/nitrogen ratio mixtures of agri-food waste and impact on compost quality. *Bioresource Technology*, vol.316.
- Takaku, H., Kodaira, S., Kimoto, A., Nashimoto, M., Takagi, M. (2006). Microbial communities in the garbage composting with rice hull as an amendment revealed by culture-dependent and independent approaches. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, vol.101, 42–50.
- Ucha, F. (2013). Importancia del Mar Mediterráneo. Recuperado el 7 de marzo de 2022 de <https://www.importancia.org/mar-mediterraneo.php>.
- Villar, I. (2017). Estudio de la dinámica microbiana durante la fase de maduración del compostaje de residuos orgánicos. Vermicompostaje como alternativa de tratamiento. Tesis Doctoral. Universidad de Vigo, Vigo, España.
- Wei, Y., Zhao, Y., Fan, Y., Lu, Q., Li, M., Wei, Q., Zhao, Y., Cao, Z., y Wei, Z. (2017). Impact of phosphate-solubilizing bacteria inoculation methods on phosphorus transformation and long-term utilization in composting. *Bioresource Technology*, vol.241, 134-141.
- Xia, X., Li, B., Hou, Y., Zhang, J., y Yan, X. (2020). Diterpenes from the marine brown algae of the genus *Dilophus*. *SAGE*, vol.15, 1934578X20907786.
- Zenetos, A. S., Gofas, G., Russo y Templado, J. (2004). Atlas of exotic species in the Mediterranean. CIESM, Mónaco.
- Zornoza, R. (2021). Papel de los microorganismos edáficos en la fertilidad y salud de los suelos. Universidad Politécnica de Cartagena. Departamento de Ingeniería Agronómica. Recuperado el 9 de abril de 2022, de <https://sftt.info/descargas/110321/Microorganismos-beneficiosos.pdf>