



Facultad de Ciencias Experimentales

Trabajo Fin de Grado en Ciencias Ambientales

Naia Crespo González

Incremento de la biodegradabilidad de los residuos lignocelulósicos mediante inoculantes microbianos: aplicación en compostaje

Increasing the biodegradability of lignocellulosic wastes by microbial inoculants: application in composting

Tutora: María José López López

Co-tutor: Jesús Salinas Nieto

Junio 2022

*“Eta indarrak ongi errotuz,
gure sustraiak lurrari lotuz.”*

-Mikel Laboa.

(Y arraigando bien las fuerzas,
uniendo nuestras raíces a la tierra.)

Agradecimientos

Agradezco a Joaquín Moreno por fundar el grupo BIO-175, su sabiduría aún reside en cada uno de los integrantes. A mi tutora María José López, que me ha dado la oportunidad de realizar este trabajo, por sumergirme desde 2º de carrera en el pequeño-gran mundo de los microorganismos y por guiarme, junto con Paqui Suárez, en mi formación en el laboratorio. También a mi cotutor, Jesús Salinas, por enseñarme que en todas partes hay sitio para una ambientóloga.

A Mila, por ser más amiga que compañera, por todas esas excursiones a desayunar y confidencias... Los días de digestores no serían lo mismo sin ti.

A Víctor y Raúl por la paciencia que habéis tenido explicándome cualquier duda (y por alcanzarme los botes más altos), Ana Toribio y Paloma por todos vuestros consejos, y todo el personal del área de Microbiología que han hecho mi aprendizaje en el laboratorio más llevadero.

A mi persona favorita, amatxu, por estar siempre conmigo, darme los mejores consejos y escucharme. Siempre sabes qué necesito... Con una mirada cómplice te basta. Sin tu confianza incondicional nunca habría llegado a estar donde estoy, a ser la mujer que soy ahora. Te quiero hasta la raíz.

A aitite y amama por criarme como a una hija y acompañarme al cole desde el primer día.

A mis ambientólocxs y Palo por aguantar mis dramas tantos años y apoyarme cuando más estresada estoy. Habéis hecho de mi vida un poquito mejor.

Tabla de contenido

Resumen.....	5
Abstract.....	6
1. Introducción.....	7
1.1. Agricultura intensiva y residuos.....	7
1.2. Problemática y consecuencias de los residuos vegetales.....	9
1.3. Proceso de compostaje.....	11
1.4. Microorganismos ligninolíticos.....	15
2. Objetivos.....	19
3. Material y Métodos.....	20
3.1. Fase experimental.....	20
3.2. Colección de microorganismos inoculantes.....	21
3.3. Material vegetal.....	22
3.4. Tratamiento del material vegetal.....	23
3.4.1. Preinóculo.....	23
3.4.2. Inoculación e incubación de las muestras.....	24
3.4.3. Muestreos.....	24
3.5. Parámetros analíticos.....	25
3.5.1. Humedad.....	25
3.5.2. Materia orgánica.....	26
3.5.3. Análisis respirométrico.....	26
3.5.4. Análisis de fibras.....	27
3.6. Análisis de datos.....	30
4. Resultados y Discusión.....	30
4.1. Humedad.....	30

4.2. Materia orgánica	33
4.3. Análisis respirométrico.....	35
4.4. Contenido en celulosa y hemicelulosa	38
4.5. Análisis multiparamétrico	43
5. Conclusiones	45
6. Financiación	46
7. Bibliografía.....	47

Resumen

El sector agrícola produce anualmente grandes cantidades de residuos vegetales en todo el mundo. Actualmente, el tratamiento propuesto como proceso sostenible y efectivo para gestionar estos residuos es el compostaje, por el que se valorizan los restos obteniendo un producto estabilizado llamado compost. No obstante, la fracción lignocelulósica de los residuos vegetales presenta un reto en el proceso de compostaje al dificultar la acción de los microorganismos, extendiendo el proceso más de lo deseado e incluso pudiendo generar un producto de mala calidad. En este trabajo se propone la inoculación de agentes microbianos con actividad lignocelulolítica con objeto de incrementar la biodegradabilidad de los residuos como un pretratamiento del material antes de su compostaje. Para ello, se emplearon tres cepas microbianas (*Bacillus safensis*, *Bacillus licheniformis* y *Fusarium oxysporum*) pertenecientes a la colección BIO-175 de la Universidad de Almería, que fueron inoculadas en restos vegetales como cultivo puro y como un consorcio de las tres y a dos dosis diferentes. La evaluación de la efectividad de los tratamientos se llevó a cabo mediante el análisis de parámetros como humedad, materia orgánica, índice respirométrico AT4 y contenido en celulosa y hemicelulosa, tras incubación a 10 y 45 días. Los resultados obtenidos demostraron que la biodegradación de los residuos lignocelulósicos puede variar según el tratamiento y dosis aplicados, de forma que tanto *F. oxysporum* como el consorcio mostraron los mejores resultados como inoculantes eficaces durante el proceso. Por lo tanto, la inoculación de residuos vegetales con microorganismos lignocelulolíticos se postula como una excelente estrategia para tratamiento previo a los residuos vegetales utilizados en compostaje, pudiendo acelerar el proceso y mejorando la calidad del producto final.

Palabras clave: lignocelulosa, biodegradación, microorganismos ligninolíticos, compostaje, consorcio microbiano

Abstract

The agricultural sector produces every year large quantities of plant wastes worldwide. Currently, the treatment proposed as a sustainable and effective process to manage these wastes is composting, by which wastes are valorized obtaining a stabilized product called compost. However, the lignocellulosic fraction of the plant wastes presents as a challenge during the composting process by hindering the action of microorganisms, extending the process more than the desired and even generating a poor quality product. In this work, the inoculation of microbial agents with lignocellulosic capability is proposed with the aim of activating the biodegradability of the wastes as a composting pretreatment. For this purpose, three microbial strains (*Bacillus safensis*, *Bacillus licheniformis* and *Fusarium oxysporum*) belonging to the BIO-175 collection of the University of Almería were used, which were applied as a pure culture and as a microbial consortium of the three strains. The effectiveness of the inoculated treatments was tested by analyzing physicochemical parameters such as moisture, organic matter, AT4 respirometric index and cellulose and hemicellulose content, after incubation for 10 and 45 days. The obtained results showed that the biodegradation of lignocellulosic wastes can vary according to the treatment and doses applied, where both *F. oxysporum* and the consortium showed the best results as effective inoculants during the process. Therefore, the inoculation of plant wastes with lignocellulolytic microorganisms is postulated as an excellent strategy as a previous treatment in composting in order to accelerate the process and improving the quality of the final product.

Key words: lignocellulose, biodegradation, lignocellulolytic microorganisms, composting, microbial consortium

1. Introducción

1.1. Agricultura intensiva y residuos

A partir de la Segunda Guerra Mundial, la agricultura intensiva comenzó a desarrollarse como necesidad para abastecer a la creciente población como consecuencia del incremento exponencial demográfico. Sin embargo, no fue hasta mediados de los años 60 cuando comenzó a gestarse la denominada “Revolución Verde”. Esta revolución supuso un cambio de paradigma en las prácticas agrícolas mediante la implementación de mejoras técnicas como el cultivo bajo plástico para producir alimentos hortofrutícolas durante toda la temporada, el uso de pesticidas y fertilizantes de origen químico para incrementar los rendimientos, así como el establecimiento de monocultivos que se centraban principalmente en arroz, trigo y tubérculos, al presentar mayor contenido energético que otros cultivos (Gómez, 2013) (Figura 1).

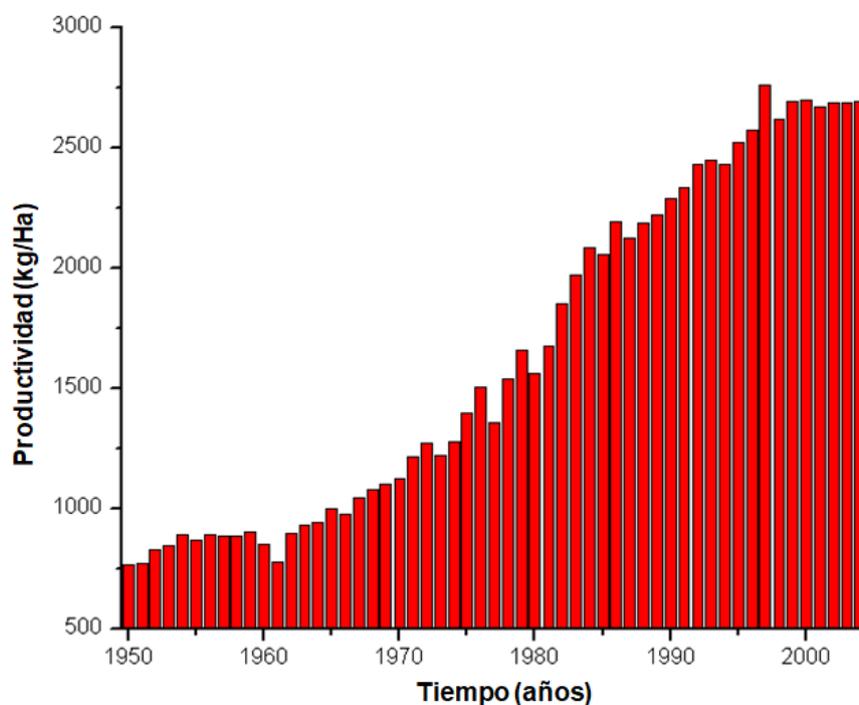


Figura 1. Evolución de la productividad de los cultivos de trigo en los países en desarrollo en Kg/ha entre 1950-2004. (Modificado de FAO, 2005).

No obstante, aquello que se propuso como avance socioeconómico acabó perjudicando al medio ambiente y provocando impactos negativos. El uso excesivo de pesticidas y fertilizantes químicos ha tenido como consecuencia la esterilización del suelo, reduciendo la biota de la tierra. Por otro lado, también ha contribuido a la contaminación de acuíferos y aguas subterráneas alterando los ciclos biogeoquímicos, especialmente el ciclo del nitrógeno. Asimismo, el continuado uso de maquinaria pesada y la implementación del sistema monocultivo, ha contribuido tanto a la compactación edáfica como a la pérdida de biodiversidad, suponiendo un importante impacto en el medio ambiente (Ceccon, 2008).

En la actualidad, España presenta 50,6 millones de hectáreas destinadas a la producción agrícola, de las cuales, 45 mil hectáreas están dedicadas a la agricultura intensiva bajo plástico desarrollada en el sureste peninsular (Figura 2). Las óptimas condiciones climáticas de la zona, junto a su elevada exposición solar anual facilitan la producción de una gran variedad de frutas y, principalmente hortalizas, llegando a cosecharse hasta 3,7 millones de toneladas anuales (Miteco, 2021). Estas características han hecho de Almería una tierra con una alta tasa de producción de alimentos, por lo que es denominada coloquialmente “La Huerta de Europa”.



Figura 2. Vista desde el espacio del mar de plástico de los invernaderos de Almería desde el espacio, 2008 (U.S./Japan Science Team, NASA, 2011).

1.2. Problemática y consecuencias de los residuos vegetales

El crecimiento expansivo de las prácticas agrícolas descritas anteriormente ha llevado aparejado un aumento progresivo del volumen de residuos vegetales generados. Se consideran como tales aquellas materias generadas en actividades agrícolas que no alcanza ningún valor económico o aprovechamiento (López-Hernández et al., 2016). Por añadidura, la generación elevada de residuos vegetales, que asciende a una media de casi 2 millones de toneladas anuales, se produce en un corto espacio de tiempo concentrado en un área relativamente reducida (Barres, 2012).

Las ingentes cantidades de residuo vegetal generadas anualmente imposibilitan una adecuada gestión, por lo que los agricultores tienden a llevar a cabo malas prácticas como quemas incontroladas o abandono de los residuos en ramblas contiguas a los invernaderos. Estas prácticas, además de insuficientes, generan impactos negativos entre los que destacan los siguientes (Mediterráneo, 1998):

- a. *Contaminación hídrica.* Debido al aporte de nutrientes y fertilizantes artificiales que acumulan trazas de residuos químicos en los cultivos y lixivian a la capa freática contaminando acuíferos subterráneos.
- b. *Contaminación atmosférica.* Las quemas incontroladas de los residuos vegetales, además de la producción de humos por parte de la locomoción y el sector industrial entre otros, liberan a la atmósfera gases de efecto invernadero que pueden perjudicar la salud humana y el medio ambiente.
- c. *Propagación de plagas.* Los residuos vegetales son un potencial hábitat de parásitos y patógenos que pueden desarrollarse con facilidad y propagarse a cultivos colindantes en el caso de ser abandonados en ramblas cercanas.
- d. *Obstrucción de vías de drenaje.* La acumulación de residuos vegetales en las ramblas obstruye las vías de drenaje de aguas de riego y lluvias aumentando el riesgo de inundación.
- e. *Alimentación del ganado.* Los residuos disponibles para alimentar al ganado pueden presentar un alto contenido en fitosanitarios químicos que se incorporan al animal y ser transferidos al ser humano.

f. Impacto paisajístico. Se debe a la acumulación excesiva de los residuos vegetales generados en la agricultura que se extienden a playas, caminos, vías pecuarias o parajes naturales mediante la dispersión del viento, entre otros factores.

En definitiva, la mala gestión de los residuos procedentes del sector agrícola da lugar a un impacto ambiental negativo que afecta a la sanidad vegetal y humana. Así, surge la necesidad de poner en práctica estrategias eficientes para la adecuada gestión de residuos agrícolas.

Las estrategias de tratamiento y gestión de residuos consisten en una serie de procesos que tienen como finalidad la valorización de los residuos para obtener productos de cierta calidad. Durante el proceso pueden generarse productos secundarios no deseados, por lo que se deben tener en cuenta y gestionar adecuadamente para evitar que acaben en el medio ambiente y así evitar generar un posible impacto ambiental (Moreno y Moral, 2008).

Algunas de estas estrategias de gestión consisten en (Mediterráneo, 1998):

- a. Enterrado del residuo vegetal.* Aunque pueda parecer beneficioso enterrar los residuos vegetales como adición de materia orgánica al sustrato del suelo, resulta contraproducente debido a las trazas de fitosanitarios y pesticidas químicos presentes en el material vegetal que contaminan la capa edáfica y lixivian a acuíferos subterráneos. Además, pueden producir un efecto bioacumulativo en la cadena trófica.
- b. Vertido controlado.* Mediante esta estrategia, los residuos son depositados en vertederos controlados existentes donde se mezclan con los residuos sólidos urbanos. La cantidad de residuo acumulado a gestionar resulta poco manejable y no se establece ninguna valorización del residuo.
- c. Alimento del ganado.* Como se ha establecido anteriormente, esta estrategia de gestión de residuos además de insuficiente resulta peligrosa para la salud humana.
- d. Pasta de celulosa.* Consiste en la conversión de los residuos vegetales mediante procesos de hidrólisis para obtener celulosa y su aprovechamiento para la producción de placas de aglomerado. La inconveniencia de esta estrategia radica en que en España principalmente los procesos consisten en deslignificaciones químicas que hidrolizan también celulosa y hemicelulosa disminuyendo su rendimiento (Carbajo, 2015).
- e. Fuente de energía.* Mediante el aprovechamiento de la biomasa generada durante las campañas de agricultura, se pretende valorizar la capacidad calorífica del residuo vegetal

obtenida mediante la quema controlada de los mismos para producir energía. Este tipo de estrategia presenta dos problemas ambientales, por un lado, la combustión de los residuos produce humos y gases nocivos para la salud y el medio ambiente y, por otro lado, el diverso poder calorífico de los residuos supone un coste añadido para proceder a su secado.

- f. *Gasificación*. Esta estrategia, es el resultado de una mejora de la valorización de residuos vegetales vistos en el punto anterior (e), ya que plantea un aprovechamiento de la descomposición de los residuos en la que los gases generados durante el proceso se revalorizan para producir energía.
- g. *Biocombustible*. El proceso de obtención de biocombustibles tales como biogás, biohidrógeno, biodiesel o bioetanol ha despertado el interés en la actualidad. Estos productos, generados en su mayoría por microorganismos, constituyen un importante sustituto a los combustibles derivados del petróleo. Sin embargo, la utilización de residuos lignocelulósicos podría contribuir a reducir su coste de producción.
- h. *Compostaje*. Sin duda, el tratamiento de residuos agrícolas mediante el compostaje es la práctica de aprovechamiento de residuos más aceptada, cuyo proceso se describirá más detalladamente en el siguiente apartado (1.3). Esta estrategia de biotransformación aeróbica de los residuos vegetales permite la valorización de los residuos y la obtención de un sustrato orgánico estabilizado, compost, y enriquecido de sustancias húmicas.

Dado que las estrategias de gestión más utilizadas pueden no ser las más adecuadas y resultar ineficientes, las técnicas biológicas para el tratamiento de residuos surgen como una alternativa sostenible a los actuales sistemas de gestión de residuos. Esta alternativa puede llevarse a cabo mediante el uso de microorganismos como herramienta biotecnológica para el tratamiento de los residuos vegetales, como es el proceso de compostaje.

1.3. Proceso de compostaje

Moreno y Moral (2008) definen el proceso de compostaje como “la acción de diversos microorganismos aerobios que actúan de manera sucesiva, sobre la materia orgánica en función de la influencia de determinados factores, produciendo elevadas temperaturas, reduciendo el volumen y el peso de los residuos y provocando su humificación y oscurecimiento”.

Para un correcto proceso de compostaje se requiere una gran variedad y riqueza de microorganismos que dependen de las características de cada proceso, el sustrato y las condiciones ambientales, las cuales pueden producir cambios en el crecimiento, supervivencia y metabolismo de los mismos (Moreno y Moral, 2008).

El proceso de compostaje está dividido en dos fases principales atendiendo a la actividad microbiana, una fase bio-oxidativa, correspondiente a la fase de mayor actividad microbiana, y una fase de maduración donde la actividad microbiana se reduce debido a la limitación de nutrientes y en la que el producto se estabiliza.

A su vez, este proceso también puede dividirse en cuatro fases principales en función de las temperaturas alcanzadas en el material sometido a compostaje (Figura 3).

→ **Fase Mesófila.** Es la fase más dinámica del compostaje, donde se alcanzan temperaturas de 10 a 40 °C en un corto periodo de tiempo, el pH experimenta holgadas variaciones y los compuestos más fácilmente asimilables se degradan. Durante esta fase los microorganismos mesófilos y termotolerantes comienzan a actuar a temperatura ambiente degradando compuestos orgánicos sencillos como azúcares y aminoácidos acidificando el pH, generando ácidos orgánicos. Debido a esta intensa actividad metabólica la temperatura se incrementa en el interior de la pila de compostaje, siendo los microorganismos más activos en esta fase las bacterias de metabolismo oxidativo-fermentativo (Tuomela et al., 2000). Aunque algunos polímeros como el almidón pueden ser degradados en esta fase, los compuestos poliméricos más complejos son degradados en fases sucesivas.

→ **Fase Termófila.** Se realiza en un rango de temperaturas entre 45 y 70°C donde actúan exclusivamente microorganismos termotolerantes y termófilos. El aumento de temperatura supone una disminución de la biodiversidad al inhibir tanto la microbiota mesófila como patógenos y parásitos (Suárez-Estrella et al., 2007). No obstante, aumenta la presencia de actinomicetos capaces de metabolizar proteínas y polímeros más complejos como la lignocelulosa, liberando compuestos asimilables por otros microorganismos como la celulosa. Al sobrepasar los 60 °C la actividad microbiana se ve reducida por el aumento de la temperatura que también actúa como limitante de en el suministro de oxígeno provocando una disminución de la temperatura y dando comienzo a la siguiente fase, donde las fuentes de carbono fácilmente asimilables comienzan a ser un factor limitante.

→ **Fase de Enfriamiento.** Se produce una disminución de temperatura de 50 a 25 °C y se conoce como una segunda fase mesófila ya que se desarrolla una nueva comunidad de microorganismos mesófilos distinta a la inicial. En esta fase los compuestos fácilmente asimilables han sido metabolizados y permanece la materia orgánica más compleja. Esta nueva comunidad recoloniza el material vegetal oxidando la materia orgánica, algunos gases generados durante el proceso y participan en la fijación del nitrógeno.

→ **Fase de Maduración.** Se realiza a temperatura ambiente en torno a los 15-20 °C y es la más duradera de las cuatro. En esta etapa la materia orgánica que no ha sido metabolizada se estabiliza y la biotransformación ocurre más lentamente que en las fases anteriores, dando lugar al producto húmico final. A medida que se realiza esta fase se estabiliza la comunidad microbiana donde principalmente predominan los hongos asemejando una composición típica de suelos oligotróficos (Guo et al., 2012).

Así, durante el proceso de compostaje la materia orgánica es transformada en condiciones aerobias por la acción enzimática de los microorganismos dando lugar a la mineralización del material vegetal. Asimismo, también se produce la humificación del material durante la fase de maduración, por lo que la proporción de sustancias húmicas aumenta frente a la de materia orgánica, teniendo como resultado final la obtención de un producto estabilizado y humificado denominado compost.

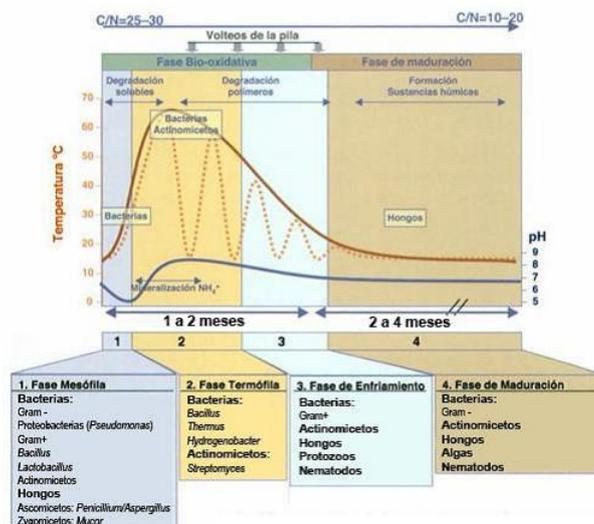


Figura 3. Sucesión microbiana y ambiental durante las fases del compostaje (Moreno y Moral, 2008).

El compostaje de residuos vegetales constituye uno de los mejores ejemplos de procesos transformativos que encajan en el modelo de economía circular, ya que, por una parte, permite valorizar residuos a través de la producción de compost y por otra, este producto cierra el ciclo al emplearse como sustrato para nuevos cultivos. Así, este proceso permite el reciclado de muchos tipos de residuos orgánicos, aportando valor e insumos para el sector agrícola, así como recursos naturales. El proceso y su producto final presentan cualidades ventajosas desde el punto de vista ambiental, ya que pueden prevenir la contaminación hídrica y atmosférica, así como contribuir al secuestro de carbono en el suelo.

Por otra parte, el compost ofrece unas excelentes cualidades como acondicionador del suelo asegurando su fertilidad y evitando la desertización, ya que mejora las propiedades físicas del suelo, proporciona estabilidad a la estructura de los agregados del sustrato agrícola y aumenta tanto la retención como la permeabilidad del agua. Además, mejora las propiedades químicas del suelo, ya que aporta macro y micronutrientes e incrementa la capacidad de intercambio de cationes. Junto a esto, aporta una población microbiana singular y beneficiosa exenta de microorganismos patógenos que pudieran acompañar a las materias primas sometidas a compostaje debido al efecto higienizante de las elevadas temperaturas que se alcanzan durante la fase termófila.

Finalmente, el proceso de compostaje puede catalogarse en función de las materias primas utilizadas o de las condiciones operacionales aplicadas, ofreciendo un amplio abanico de posibilidades. De esta forma, la aplicación del compostaje en pilas estáticas requiere de una instalación sencilla, control simple de humedad y temperatura, así como un mantenimiento reducido. Dados los diferentes sistemas para llevar a cabo el compostaje, el coste económico no supondría una desventaja, pudiendo optar por el sistema más adecuado dependiendo de las posibilidades y requerimientos del usuario.

Sin embargo, el compostaje presenta una serie de inconvenientes, generalmente consecuencia de malas prácticas. La mayoría de problemas asociados al compostaje provienen de la emisión de gases y malos olores que se generan principalmente en las primeras etapas del proceso. La amonificación producida durante la biotransformación de proteínas y otros compuestos nitrogenados libera NH_4^+ que puede volatilizarse a la atmósfera en condiciones de pH y temperatura elevadas. Esto ocurre, principalmente, cuando las

materias primas no presentan un balance adecuado de C y N. No obstante, el compost final presenta un bajo contenido en nitrógeno en comparación con otros fertilizantes químicos, debido a que los nutrientes presentes en el compost se encuentran en formas complejas que deben ser mineralizados para ser asimilados por las plantas (Negro et al., 2000).

La duración y manejo del proceso de compostaje depende del material a compostar y, tal y como se refleja en el siguiente apartado, los residuos vegetales están constituidos básicamente por lignocelulosa, la cual presenta una alta resistencia a la biodegradación retardando el comienzo del proceso. Así, surge la necesidad de establecer un pretratamiento que agilice el proceso manteniendo las condiciones necesarias de la materia a compostar. Este pretratamiento podría estar soportado por la acción de microorganismos con capacidades ligninolíticas.

1.4. Microorganismos ligninolíticos

Los residuos vegetales generados en la agricultura intensiva, a pesar de incluir también frutos en mal estado o no aprovechables en las actividades económicas, principalmente se componen de restos de poda como tallos y hojas de plantas. La materia orgánica de los residuos vegetales presenta una composición basada en una fracción mayoritaria de celulosa, hemicelulosa y lignina, presentando otros polímeros orgánicos como almidón, pectinas, proteínas y ceras. Los macropolímeros de celulosa, hemicelulosa y lignina se unen entre sí mediante enlaces covalentes produciendo entrecruzamientos que dan lugar a un tejido estructural complejo denominado lignocelulosa que presenta una elevada recalcitrancia o dificultad para ser biodegradado (Barros et al., 2015) (Figura 4). La lignocelulosa representa el 60% de biomasa de las plantas vasculares, considerándose el polímero natural mayoritario en la Tierra. Este macropolímero puede ser utilizado en procesos de biorrefinería para la producción de bioetanol, biofertilizantes y productos químicos, para los que se requiere su conversión mediante tratamientos químicos o bioquímicos (Tengerdy y Szakacs, 2003).

En los procesos de conversión de residuos vegetales es común la aplicación de microorganismos lignocelulolíticos con capacidad para producir enzimas que hidrolizan las paredes celulares de las plantas, dando como resultado la liberación de monómeros simples asimilables por otros microorganismos, estimulando así su crecimiento y reduciendo el tiempo necesario para iniciar el proceso de compostaje (Tuomela et al., 2000). Estas

características junto con las condiciones adecuadas de aireación, humedad y relación C/N en el sustrato, hacen que el uso de inoculantes microbianos ligninolíticos sean más recurrentes para fomentar la biotransformación y degradación de residuos vegetales (Castro, 2013).

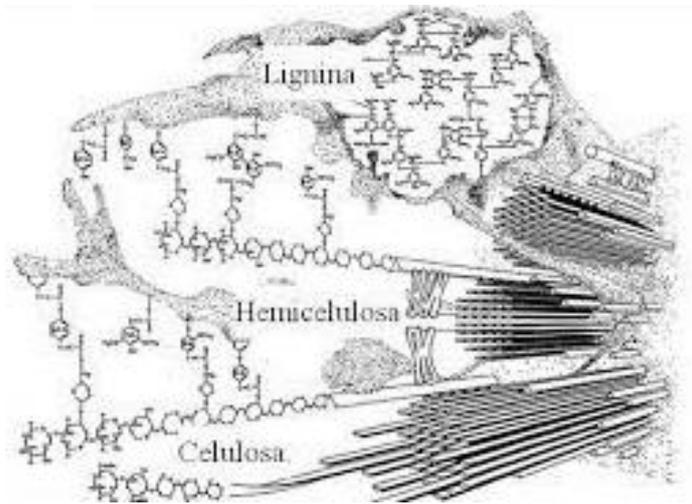


Figura 4. Estructura de la lignocelulosa (Bidlack, 1992).

La **celulosa** es un homopolisacárido constituido por unidades de glucosa unidas entre sí por enlaces glucosídicos $\beta(1-4)$, formando un polisacárido lineal de entre 14.000 y 15.000 monómeros (Figura 5). Las cadenas están unidas entre ellas mediante puentes de hidrógeno formando microfibrillas insolubles. Los agregados de microfibrillas generan fibras cristalinas de celulosa que conforman la pared celular y presentan mayor resistencia a reacciones de hidrólisis que los agregados de microfibrillas amorfos. A pesar de su simplicidad estructural, este compuesto compone entre el 40-50 % del material vegetal (Mussatto et al., 2008).

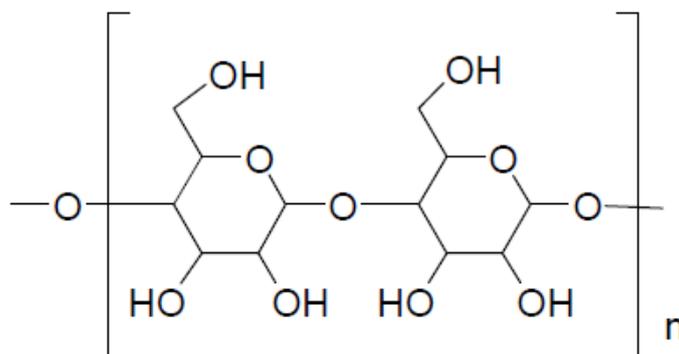


Figura 5. Monómero de las fibras de celulosa.

Para la degradación de la celulosa es imprescindible la actuación de celulasas que pueden ser sintetizadas por una amplia variedad de microorganismos. El sistema enzimático de estos microorganismos celulolíticos, especialmente de hongos del género *Trichoderma* o *Aspergillus*, así como de bacterias del género *Bacillus*, es capaz de hidrolizar la celulosa en celobiosa y glucosa mediante la acción sinérgica de celulasas como endo- β -1,4-glucanasa, exo- β -1,4-glucanasa y β -1,4-glucosidasa (Ovando-Chacón y Waliszewski, 2005; Szijártó et al. 2004).

La **hemicelulosa** es un heteropolisacárido compuesto por xilosa, arabinosa, glucosa, galactosa, manosa y ácidos urónicos que se unen entre sí mediante enlaces β (1-4) formando cadenas ramificadas más cortas que las de celulosa (Figura 6). En la estructura vegetal se encuentra ligada a la celulosa mediante enlaces de pectina en forma de microfibras capaces de reforzar la pared celular constituyendo el 20-30 % del material lignocelulósico (Mussatto et al., 2008).

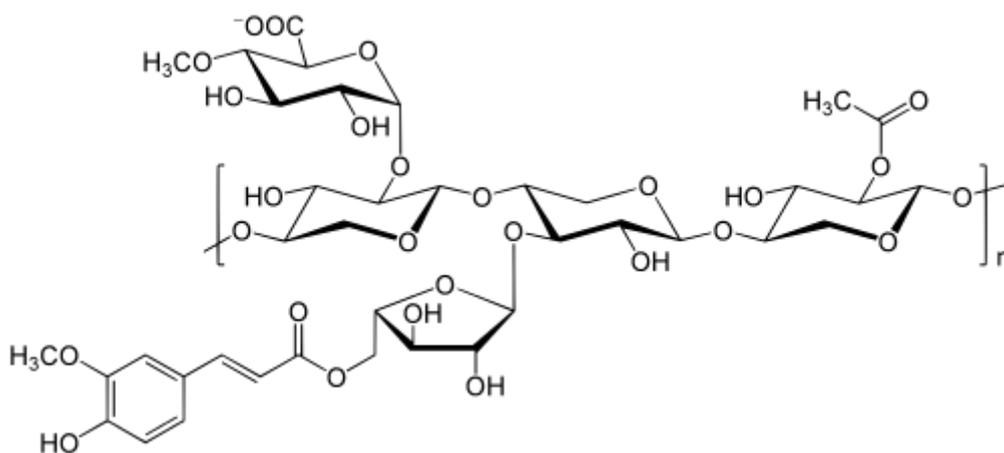


Figura 6. Estructura molecular de la hemicelulosa (xilano).

El complejo enzimático capaz de degradar la hemicelulosa se compone principalmente de xilanasas que hidrolizan la cadena principal de xilano, constituido por unidades repetitivas de xilosa. Dichas enzimas, al igual que las celulasas, comprenden un grupo de enzimas muy variadas, incluyendo endo-1,4- β -xilanasas, capaces de romper los enlaces que conforman la cadena principal de la hemicelulosa, o las β -D-xilosidasas que hidrolizan la matriz de la hemicelulosa al hidrolizar xilooligosacáridos y xilobiosa. Estas actividades enzimáticas se

encuentran muy extendidas en bacterias del género *Bacillus*, y algunos hongos como *Penicillium* o *Aspergillus* (Collins et al., 2005).

La **lignina** (Figura 7) es un polímero constituido por unidades derivadas del fenil propano generando un complejo polifenólico cuyas unidades se unen entre sí mediante un amplio abanico de enlaces aportando una estructura tridimensional amorfa. La estructura y composición de la lignina es específica de cada especie y dependiente del estado ontogénico y condiciones de crecimiento. Su función principal es estructural actuando como sostén de la planta y siendo el componente mayoritario en tejidos leñosos. Su carácter hidrofóbico impide pérdidas de agua en la pared celular y limita la difusión lateral. Además, refuerza la resistencia mecánica de la pared celular y la protege frente a ataques microbiano. Este polímero de difícil degradación constituye entre el 10-30 % del material vegetal (Barros et al., 2015).

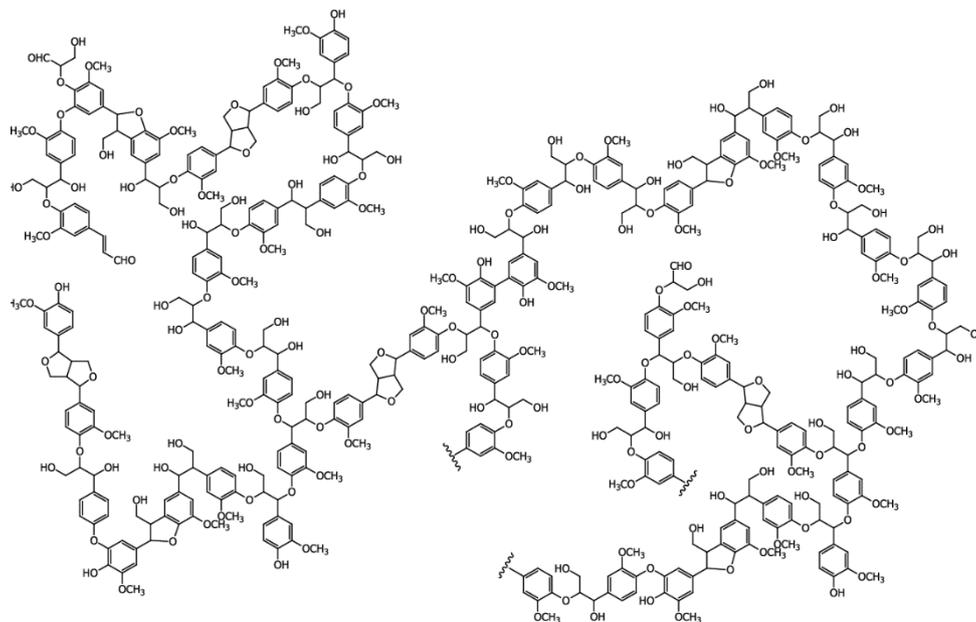


Figura 7. Estructura molecular de la lignina (Chávez-Sifontes, 2013).

La degradación de este complejo polímero es realizada mediante la acción de enzimas ligninolíticas, principalmente lacasas y peroxidasas. Entre las peroxidasas se encuentran la lignina peroxidasa y la manganeso peroxidasa expresadas principalmente por hongos como los pertenecientes a los géneros *Caribena*, *Ganoderma* y *Phanerochaete*. Esta actividad ligninolítica está asociada a la capacidad de degradación de compuestos recalcitrantes tales como compuestos orgánicos complejos o xenobióticos como pesticidas químicos, otorgando

a los microorganismos capaces de producir este sistema enzimático una capacidad biorremediadora (Pérez et al., 2002; Ijoma y Tekere, 2017).

Debido a la alta recalcitrancia característica de la lignocelulosa, tanto por estructura como por su gran resistencia a la biodegradación, esta fracción puede considerarse como obstáculo hacia una rápida intervención de los microorganismos en las primeras fases del compostaje. La celulosa y hemicelulosa, compuestos más fácilmente asimilables de este entramado, se encuentran embebidas en una matriz compleja revestida de lignina, limitando así la acción de celulasas y hemicelulasas. Por tanto, para llevar a cabo la degradación de la celulosa y la hemicelulosa, la lignina debe ser parcialmente degradada. Así, surgiendo la necesidad de promover la actuación de enzimas ligninolíticas con el objetivo de mejorar la eficiencia y acortar el tiempo de las fases iniciales del compostaje (Quintero et al., 2006).

2. Objetivos

El compostaje constituye una de las mejores opciones para la gestión de los enormes volúmenes de residuos vegetales generados en la agricultura hortícola intensiva bajo plástico. Dicho proceso permite valorizar los residuos y retornar la materia orgánica al suelo de forma segura cerrando el ciclo en el sistema productivo (Egea et al., 2018).

Aunque son los microorganismos presentes en los residuos vegetales los encargados de efectuar la transformación durante el compostaje, existe la posibilidad de inocular microorganismos externos que aceleran el proceso y mejoran la calidad del producto final (Jurado et al., 2014). Los mejores candidatos para tal finalidad son microorganismos lignocelulolíticos que podrían incrementar la biodegradabilidad del material facilitando la biotransformación durante el proceso. Este efecto se debe principalmente a que dichos microorganismos producen enzimas que dan lugar a la degradación temprana de la lignocelulosa de los materiales vegetales, liberando monómeros simples fácilmente accesibles para otros microorganismos, o facilitando la accesibilidad a carbohidratos poliméricos. Como resultado se estimula la biotransformación, por lo que es de esperar que se reduzca el tiempo necesario para el desarrollo del proceso. El grupo de investigación BIO-175 del Área de Microbiología de la Universidad de Almería ha aislado y seleccionado una

colección de microorganismos con actividades lignocelulolíticas a partir de residuos vegetales hortícolas sometidos a compostaje que muestran una elevada actividad enzimática y que en estudios previos han demostrado su eficacia como agentes aceleradores del proceso de compostaje de residuos hortícolas cuando se inoculan al inicio del mismo (Jurado et al., 2014). Sin embargo, cabe determinar si la aplicación de un pretratamiento de los residuos vegetales o bioactivación con microorganismos lignocelulolíticos previo a su compostaje puede mejorar aún más dicho proceso, para lo que es necesario determinar cuáles son los microorganismos adecuados y en qué condiciones debe realizarse.

De acuerdo con lo anteriormente expuesto, el objetivo principal de este Trabajo de Fin de Grado fue la evaluación del efecto de aplicación de inoculantes microbianos con intención de favorecer la biodegradación de los residuos vegetales con alto contenido en lignocelulosa, como tratamiento previo al proceso de compostaje.

Para la consecución de dicho objetivo principal se establecieron los siguientes objetivos específicos:

1. Establecer un protocolo de acondicionamiento de residuos vegetales de forma previa a su inoculación con microorganismos lignocelulolíticos, tanto en cultivo puro como en forma de consorcio.
2. Evaluación del efecto de la actividad microbiana en los residuos vegetales en función del inoculante, la dosis aplicada y el tiempo de incubación mediante el análisis de parámetros indicadores de la biodegradabilidad.

3. Material y Métodos

3.1. Fase experimental

Para el abordaje de los objetivos previamente establecidos se empleó la metodología que se ilustra en la Figura 8 y que se detalla en los siguientes apartados. De forma resumida, se inocularon residuos vegetales con dos dosis diferentes de monocultivos de las bacterias *Bacillus safensis* 190, *Bacillus licheniformis* 1974 o el hongo *Fusarium oxysporum* 4535 y con un consorcio de las tres cepas. Se tomaron muestras a tres tiempos desde la inoculación, en

las que se analizaron humedad, materia orgánica, respirometría y lignocelulosa (hemicelulosa y celulosa) para determinar el impacto de los factores evaluados (inóculo y dosis) sobre la bioactivación del material a distintos tiempos de incubación.

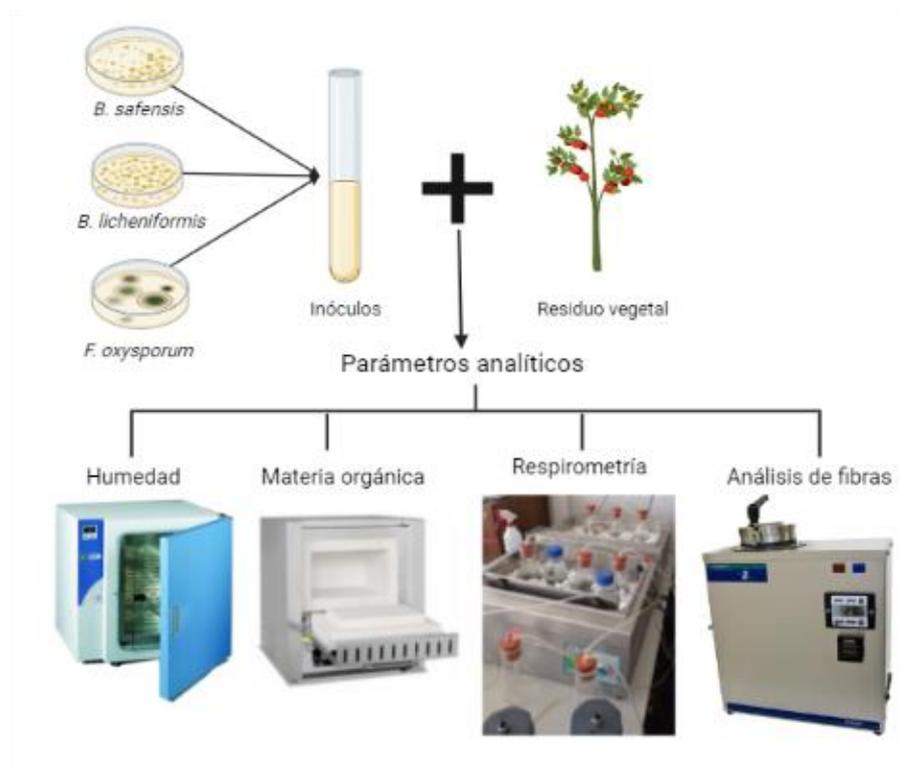


Figura 8. Esquema de la fase experimental del TFG.

3.2. Colección de microorganismos inoculantes

Para la realización de este estudio se emplearon tres cepas microbianas pertenecientes a la colección de microorganismos BIO-175 del grupo de investigación “Desarrollo de técnicas microbiológicas para la mejora de suelos de interés agrícola”, del Área de Microbiología de la Universidad de Almería. Estas cepas fueron caracterizadas e identificadas como *Bacillus safensis* 190, *Bacillus licheniformis* 1974 y *Fusarium oxysporum* 4535 (Moreno, 2002) (Figura 9) y fueron aisladas en estudios previos a partir de material vegetal sometido a compostaje (Jurado et al., 2014; López-González et al., 2015). En este trabajo se emplearon como estrategia de bioactivación de residuos vegetales en diferentes dosis, como pretratamiento del compostaje, aplicándose como cultivo puro y consorcio debido a sus actividades enzimáticas relacionadas con la hidrólisis de polímeros constituyentes del material vegetal (Tabla 1).

Tabla 1. Colección de microorganismos utilizados

Cepa	Tipo de microorganismo	Actividad enzimática
<i>Bacillus safensis</i> 190	Bacteria	Pectinasa, proteolítica y xilanolítica
<i>Bacillus licheniformis</i> 1974	Bacteria	Amilasa, pectinasa, proteolítica y xilanolítica
<i>Fusarium oxysporum</i> 4535	Hongo	Pectinasa, xilanolítica y celulasa



Figura 9. *Bacillus safensis* 190 (izda.), *Bacillus licheniformis* 1974 (centro), *Fusarium oxysporum* 4535 (dcha.).

3.3. Material vegetal

El material vegetal utilizado para este estudio procede de la planta Reciclados Almerienses 2005 S.L. ubicada en Cueva de los Úbeda (término municipal de Retamar) y estuvo constituido mayoritariamente de restos de plantas de tomate. Para la adecuación del material vegetal se trocearon los tallos y se retiraron los frutos, plásticos y rafia encontradas, obteniendo un material de partida cuya composición principal correspondía a restos de planta de tomate. El material vegetal se trituró y secó a 40 °C durante 24 h para reducir su humedad. Tras la desecación, se repartieron 70 g del material en recipientes de plástico de 0,5L de capacidad para su posterior tratamiento.

El análisis previo del material permitió conocer las características de partida, estableciendo que el residuo vegetal presentaba un 63% de humedad y 81% de materia orgánica.

3.4. Tratamiento del material vegetal

El material vegetal se trató con cuatro inóculos que se incorporaron a dos dosis diferentes: dosis alta o dosis 1 (10^6 UFC/g) y dosis baja o dosis 2 (10^4 UFC/g). Adicionalmente se incluyeron controles no inoculados. Los tres tiempos de muestreo realizados para el análisis de los diferentes parámetros fueron 0, 10 y 45 días. Cada condición se realizó por triplicado obteniendo un total de 48 recipientes inoculados y se incluyó 1 control para cada tiempo y dosis.

3.4.1. Preinóculo

Las cepas bacterianas *B. safensis* y *B. licheniformis* se sembraron mediante estrías en placas con medio APHA (OXOID, ref. CM0463) para la obtención de colonias aisladas con las cuales se inoculó con asa de siembra un tubo con Caldo Nutritivo (CN) (PanReac, ref.413793.1210). Tras incubación a 30 °C durante 24h, el cultivo en CN se sembró con un hisopo en toda la superficie de medio de cultivo APHA en placas cuadradas (12 cm x 12 cm). Las placas se incubaron a 30 °C durante 24h y posteriormente se recogió con espátula estéril la biomasa celular de la superficie de la placa incorporando pequeños volúmenes de solución salina estéril (NaCl, 0,9% p/v) para facilitar la recogida. Dicha biomasa se recogió en un recipiente estéril y se empleó para la preparación de los inóculos de *B. safensis* y *B. licheniformis*.

Para la cepa fúngica *Fusarium oxysporum* 4535 en primer lugar se obtuvieron colonias aisladas en Rosa de Bengala tras incubación a 30 °C durante 5 días. A partir de este aislamiento, se sembró un matraz con Caldo de Patata Dextrosado (PDB) (Scharlau, ref. 02-483-500) que se incubó durante 5 días a 30 °C en agitación de 110 rpm. Tras el periodo de incubación se filtró el cultivo en PDB con intención de separar la fase micelial y obtener las esporas con ayuda de una gasa de muselina estéril. Se obtuvieron las esporas mediante centrifugación durante 20 minutos a 4 °C y 4000 rpm, efectuando tres lavados del sedimento con solución salina estéril para obtener las esporas de *F. oxysporum* en suspensión libre de fuente de carbono.

La concentración celular de la biomasa bacteriana y de la suspensión de esporas de *F. oxysporum* se determinó mediante recuento en placa por el método de Miles y Misra (Miles et al., 1938) obteniendo una concentración en torno a 10^8 - 10^9 UFC/mL en los inóculos bacterianos y 10^5 - 10^6 UFC/mL en el inóculo fúngico. Los inóculos se preservaron a 4 °C hasta

su empleo para inocular los residuos. La biomasa bacteriana y la suspensión fúngica fueron convenientemente diluidos en solución salina estéril para obtener la concentración de inóculo por peso de material deseada en cada ensayo.

3.4.2. Inoculación e incubación de las muestras

Los recipientes con el material vegetal se distribuyeron en cuatro bloques formados por los tres inóculos individuales y el consorcio. Además, se fijaron 3 repeticiones por dosis de inóculo y tiempo de muestreo, por lo que cada bloque estuvo compuesto por 12 recipientes de plástico. Una vez estructurado el ensayo, se adicionó el inóculo al agua estéril necesaria para ajustar la humedad del material al 50-55% (40 mL).

Con intención de evaluar el efecto de la dosis, los inóculos se añadieron a dos concentraciones: dosis alta 10^6 UFC/g y dosis baja de 10^4 UFC/ g de materia vegetal. Los recipientes de plástico se incubaron a 30 °C durante un total de 45 días, realizando volteos cada 2 o 3 días mediante agitación del recipiente para asegurar el acceso de oxígeno y la distribución del inóculo en el material.

3.4.3. Muestras

Una vez realizada la inoculación del material vegetal se establecieron tres tiempos de muestreo a 0, 10 y 45 días (Figura 10) para el análisis de los distintos parámetros que se describen en el siguiente apartado.



Figura 10. Muestras inoculadas con *B. licheniformis* tras 10 días (izda.) y con *F. oxysporum* tras 45 días (dcha.).

3.5. Parámetros analíticos

Para evaluar la actividad de los distintos inóculos sobre el material vegetal se analizó la humedad, la materia orgánica, índice de consumo de oxígeno (AT4) y el contenido en celulosa y hemicelulosa.

3.5.1. Humedad

Para calcular el porcentaje de humedad se pesaron 10 g de cada muestra en frascos de vidrio previamente tarados y se mantuvieron en horno Selecta (J.P. Selecta S.A., Abrera, Barcelona, España) (Figura 11) durante 24 horas a 100 °C para su desecación. Transcurridas las 24 horas se volvieron a pesar las muestras obteniendo el porcentaje de humedad mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Humedad (\%)} = (\text{Peso fresco} - \text{peso seco}) / \text{Peso fresco} * 100$$

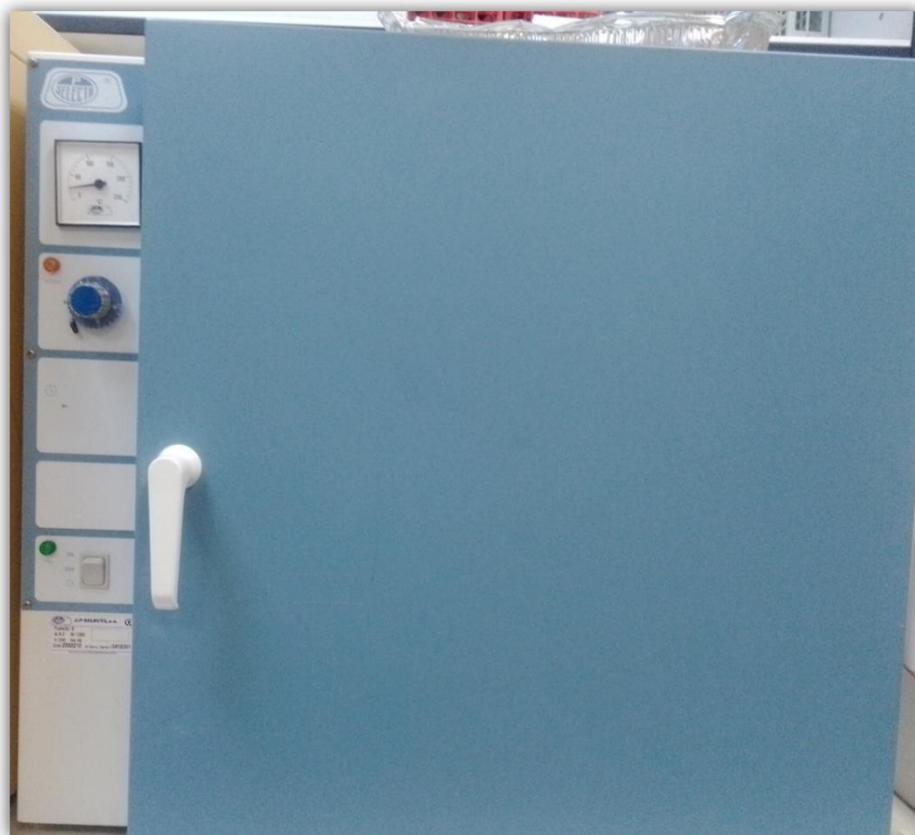


Figura 11. Horno Pasteur empleado en el cálculo del porcentaje de humedad.

La muestra desecada se molió hasta un tamaño de partícula de 1 mm para proceder a los análisis de fibras y materia orgánica.

3.5.2. Materia orgánica

Para la determinación de materia orgánica se secaron durante treinta minutos crisoles en horno a 100 °C para eliminar la humedad. Después se pesó 1 g de cada muestra en los crisoles y se incineraron a 550 °C en horno Mufla Hobersal HK-11 (Hobersal Furnaces & Ovens Technology, Caldes de Montbui, Barcelona, España) (Figura 12) durante 3,5 horas. Las muestras se dejaron enfriar en desecador para volver a pesar nuevamente. El contenido de materia orgánica de las muestras se obtuvo mediante la fórmula:

$$\text{Cenizas (\%)} = (\text{Peso fresco} - \text{Peso seco}) / \text{Peso fresco} * 100$$

$$\text{M.O. (\%)} = 100 - \text{Cenizas (\%)}$$



Figura 12. Horno mufla Hobersal HK-11.

3.5.3. Análisis respirométrico

El análisis respirométrico de las muestras se realizó en base al índice de consumo de oxígeno acumulado durante 4 días (AT4) y se expresó en gramos de oxígeno consumido por kilogramo de materia seca. Para determinar este parámetro se requirió un respirómetro, equipo que

incluye unos biorreactores en los que se incorpora la muestra a analizar, un sistema de caudalímetros y sensores conectados a un software que permite calcular el oxígeno consumido (Figura 13).

Para el análisis se empleó la metodología propuesta por Ponsá et al. (2010). Se introdujeron 70 g de muestra fresca en los biorreactores. A cada uno de estos biorreactores se conectó un canal input que proporcionó el caudal de aire y un canal output que envió la respuesta al sensor. Los biorreactores se sumergieron en un baño de agua a 37 °C y se ajustó en el software el tipo de muestra: peso, humedad y caudal de aire requerido para el análisis.



Figura 13. Detalle del biorreactor (izda.) y respirómetro (dcha.).

3.5.4. Análisis de fibras

El análisis de fibras (celulosa y hemicelulosa) se llevó a cabo mediante la técnica desarrollada por Ankom Technology Corporation (Safigueroa et al., 1999) que supone una mejora del método Goering y Van Soest (1970). Para el análisis se empleó el digestor ANKOM 200/220 (Ankom Technology, Macedonia, NY, USA) que permite la digestión de 24 muestras simultáneas (Figura 14). Las muestras (0,5 g de muestra seca molida) se incorporaron en bolsas taradas de poliéster libres de cenizas y nitrógeno que fueron selladas por calor. Las bolsas se colocaron en el soporte (Figura 14) que se introdujo en la cubeta del digestor en el

que fueron sometidas a distintos tratamientos con las soluciones descritas en la Tabla 2, de acuerdo con los procesos descritos a continuación.



Figura 14. Digestor ANKOM 200/220 (izda.) y detalle del soporte de muestras (dcha.).

Tabla 2. Composición de los reactivos empleados en la determinación del análisis de fibras.

Fibras Neutro Detergente (FND)	
Reactivo	Cantidad
Detergente neutro	59,98 g
Etilenglicol	10 mL
H ₂ O _d	1000 mL
Fibras Ácido Detergente (FAD)	
Detergente ácido	20 g
H ₂ SO ₄ 1N	1000 mL
Lignina Ácido Detergente (LAD)	
H ₂ SO ₄ 24 N	250 mL

Proceso FND. El proceso FND permite determinar la fracción celulósica de las muestras. Para llevar a cabo este proceso se utilizaron 2 L de detergente neutro (FND) preparados según las indicaciones de la marca comercial. Se colocaron las bolsas en el soporte y se añadió el detergente neutro, 20 g de sulfito sódico y 4 mL de α -amilasa y se encendió la calefacción y agitación del digestor durante 75 minutos.

Transcurridos los 75 minutos del proceso se procedió a los lavados. Este proceso requirió 3 lavados de 5 minutos en agitación, los dos primeros con agua destilada llevada a ebullición y 4 mL de α -amilasa y el tercero únicamente con agua destilada llevada a ebullición.

Proceso FAD. Durante este proceso se determinó la fracción hemicelulósica de las muestras. Para ello se prepararon 2 L de detergente ácido según las indicaciones de la marca comercial. Se introdujeron las bolsas en el soporte, se añadió el detergente ácido y se encendió la calefacción y agitación del digestor durante 60 minutos.

Tras el tiempo en el digestor se procedió a los tres lavados de las muestras con agua destilada llevada a ebullición durante 5 minutos en agitación.

Proceso LAD. Este proceso determinó la fracción de lignina y se realizó ajeno al digestor. Para realizarlo solo se necesitaron 250 mL de ácido sulfúrico 24N. Se introdujeron las bolsas en un vaso de precipitado, se añadió el ácido y se dejó actuar durante 3 horas en la campana de gases.

Una vez transcurridas las 3 horas se realizaron lavados continuos con agua destilada hasta alcanzar un pH neutro.

De forma común para los tres procesos, una vez realizados los lavados, se hizo un último lavado de 5 minutos en acetona y se secaron las muestras durante 2 horas en el horno a 100 °C. Una vez secas, se pesaron y se incineraron en el horno Mufla Hobersal, siguiendo el mismo procedimiento que en el apartado 3.5.2. durante 3,5 horas a 550 °C para determinar el contenido en cenizas de las muestras y calcular el porcentaje de celulosa, hemicelulosa y lignina.

3.6. Análisis de datos

Los resultados obtenidos de cada parámetro se recogieron en el programa Microsoft Office Excel 2016 para su análisis estadístico descriptivo de los datos y representación gráfica.

Para el análisis estadístico se consideraron como factores de variabilidad los inóculos utilizados, los tiempos de muestreo y las dosis establecidas, y como variables dependientes la humedad, la materia orgánica, el AT4 y el contenido en celulosa y hemicelulosa. Este análisis estadístico se realizó mediante el programa Statgraphics Centurion 18 para el cual se aplicó un Análisis de la Varianza (ANOVA) multifactorial y un test de rangos múltiples empleando el estadístico LSD de Fisher con un nivel de confianza del 95%.

4. Resultados y Discusión

A continuación, se describen y discuten los resultados obtenidos para cada uno de los parámetros descritos con el fin de evaluar la eficacia de cada cepa y el efecto de la dosis en la bioactivación del residuo vegetal.

4.1. Humedad

La presencia de agua es imprescindible en los procesos de compostaje debido a que es vital para el desarrollo de la actividad microbiana. La falta o exceso de agua tiene un efecto negativo sobre el proceso y la actividad microbiana, inhibiendo el crecimiento microbiano en el primer caso y originando condiciones de anaerobiosis en el segundo (Agnew y Leonard, 2003).

La evolución de la humedad presente en las muestras para cada inóculo y tiempo de incubación se muestra en las Figuras 15a y 15b para las dosis 1 y 2, respectivamente. En todos los casos se observó una reducción de la humedad a medida que avanzó el tiempo de incubación. Se obtuvo una reducción de hasta el 16% a los 45 días de incubación en el tratamiento con la dosis 1 de *F. oxysporum*. Las muestras inoculadas con *F. oxysporum* tuvieron la mayor pérdida de humedad, presentando una diferencia del 6 % respecto del control (no inoculado) a los 10 días y del 4 % a los 45 días.

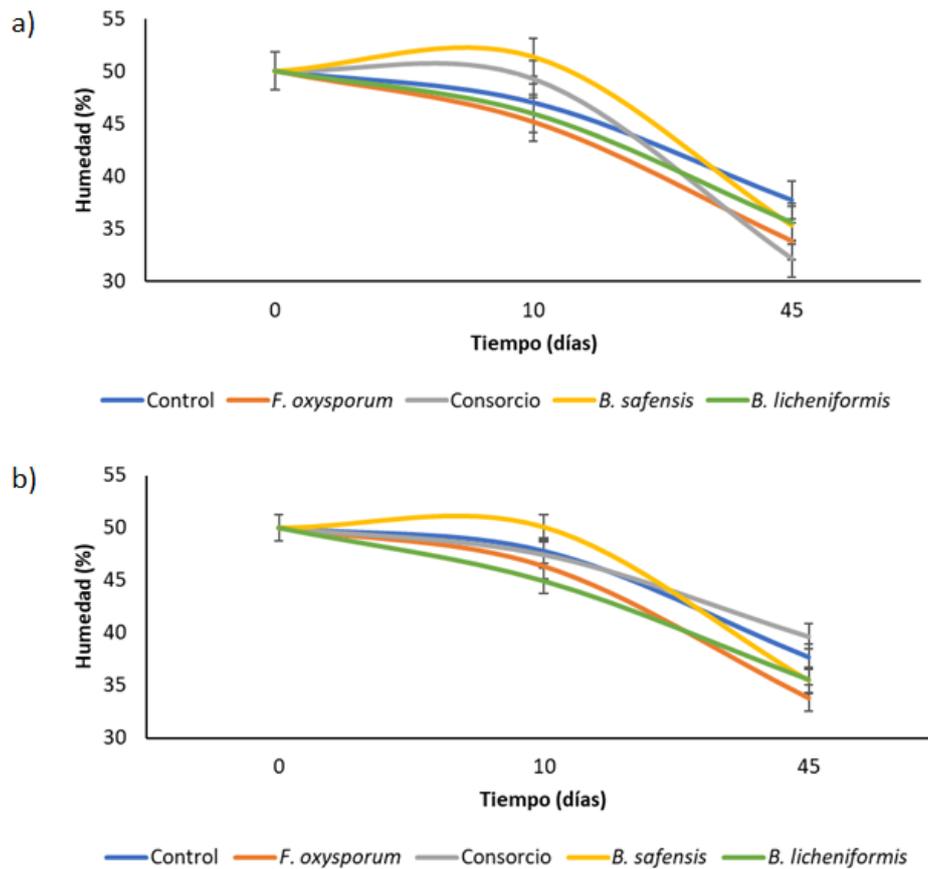


Figura 15. Evolución de humedad (%) en los inóculos *F. oxysporum*, *B. safensis*, *B. licheniformis*, Consorcio (*F. oxysporum*, *B. safensis*, *B. licheniformis*) y Control (no inoculado) durante los tiempos de muestreo para a) Dosis 1 (10^6 UFC/g material vegetal) y b) Dosis 2 (10^4 UFC/g material vegetal).

Se aplicó un análisis ANOVA multifactorial a los resultados obtenidos para cada una de las dos dosis, al objeto de analizar el efecto de los factores evaluados (inóculo y tiempo) sobre los valores de humedad alcanzados. Tanto para la dosis 1 (Figura 16a) como para la dosis 2 (Figura 16c), el inóculo utilizado no influyó significativamente sobre los niveles de humedad. Sin embargo, el tiempo de incubación sí afectó a dicho parámetro. En la dosis 1 (Figura 16b) la humedad se redujo significativamente a partir de los 10 días de incubación, mientras que cuando se empleó la dosis 2, la humedad se redujo de forma progresiva desde el inicio del ensayo (Figura 16d) siendo mayor dicha reducción entre los tiempos de incubación 10 días a 45 días que en el primer período.

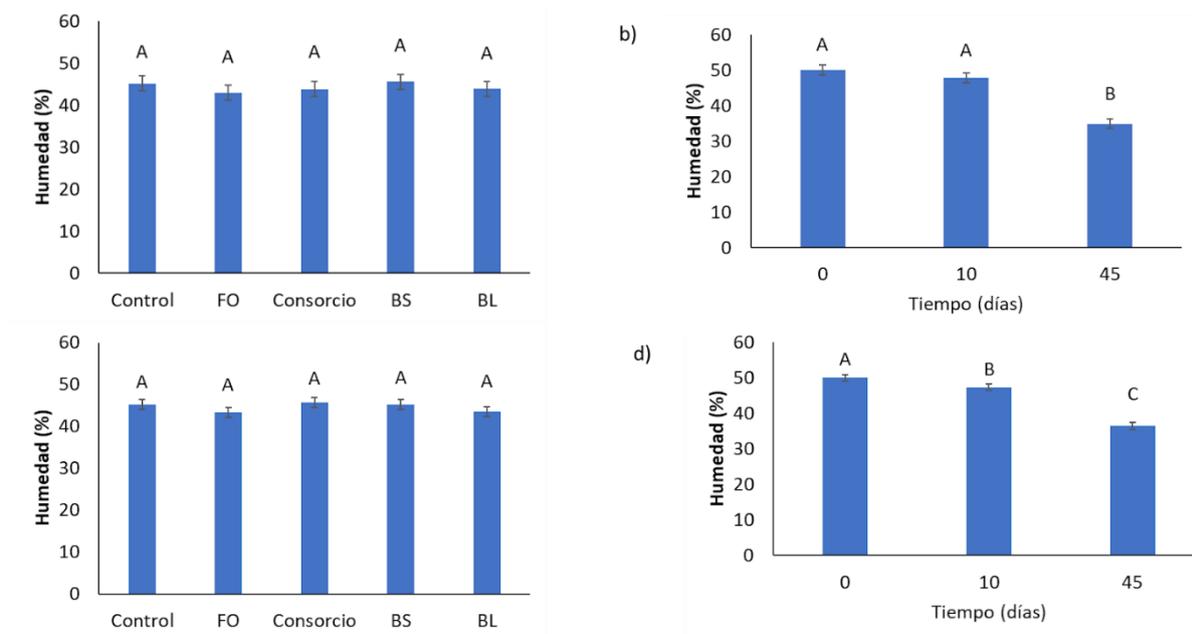


Figura 16. Valores de la humedad (%) para la dosis 1 en función del inóculo (a) y el tiempo (b) y para la dosis 2 en función del inóculo (c) y el tiempo (d). Las barras de error muestran el intervalo LSD de Fisher. Valores con la misma letra no son diferentes significativamente ($p < 0,05$).

Establecer una humedad del 50 % a tiempo 0 favorece el inicio de la actividad microbiana en el material a tratar, proporcionando unas condiciones óptimas para el crecimiento y división celular de las cepas inoculadas. Una humedad en torno al 50-40 % resulta óptima para el desarrollo de microorganismos, alcanzando el contenido en humedad del 65% resulta perjudicial para la difusión de gases (Bian et al., 2019).

A medida que avanza el tiempo, la temperatura constante a 35 °C y la actividad microbiana producen una disminución de la humedad presente en la muestra. Cabe destacar que, tras 10 días de incubación, el rango de humedad continúa siendo óptimo para todos los materiales (en torno a 50%), independientemente de la dosis o el inóculo. Sin embargo, tras 45 días de incubación el contenido en humedad se redujo a valores del 35-37 %, por lo que se espera una reducción de la actividad microbiana que afectaría principalmente a las muestras con inóculos bacterianos, más sensibles a condiciones limitadas en agua (Yang et al., 2021). Por ello, la muestra inoculada con *F. oxysporum*, a pesar de contener una reducida humedad (33,8 %) podría soportar el desarrollando la actividad fúngica (Moreno y Moral, 2008). De acuerdo con los resultados obtenidos parece recomendable ajustar la humedad durante el tratamiento de modo que no se limite el crecimiento de los inóculos durante el mismo o, alternativamente limitar el tiempo de tratamiento de 10 días siempre que el resto de parámetros pongan de manifiesto que se ha producido una biotransformación adecuada del material.

4.2. Materia orgánica

La evolución de la materia orgánica del material vegetal en función de inóculo y tiempo de incubación, para dosis de inóculo 1 y 2 se muestra en la Figura 17. De forma general, a tiempo 0, las muestras presentaron un 55 % de materia orgánica y una tendencia decreciente similar en ambas dosis. En la dosis 1 se observó que, para el tiempo de incubación a 10 días, la muestra que más redujo su contenido en materia orgánica, respecto del control (no inoculado) correspondió a aquella tratada con *B. safensis*, en cambio, a 45 días, esto ocurrió para *B. licheniformis*.

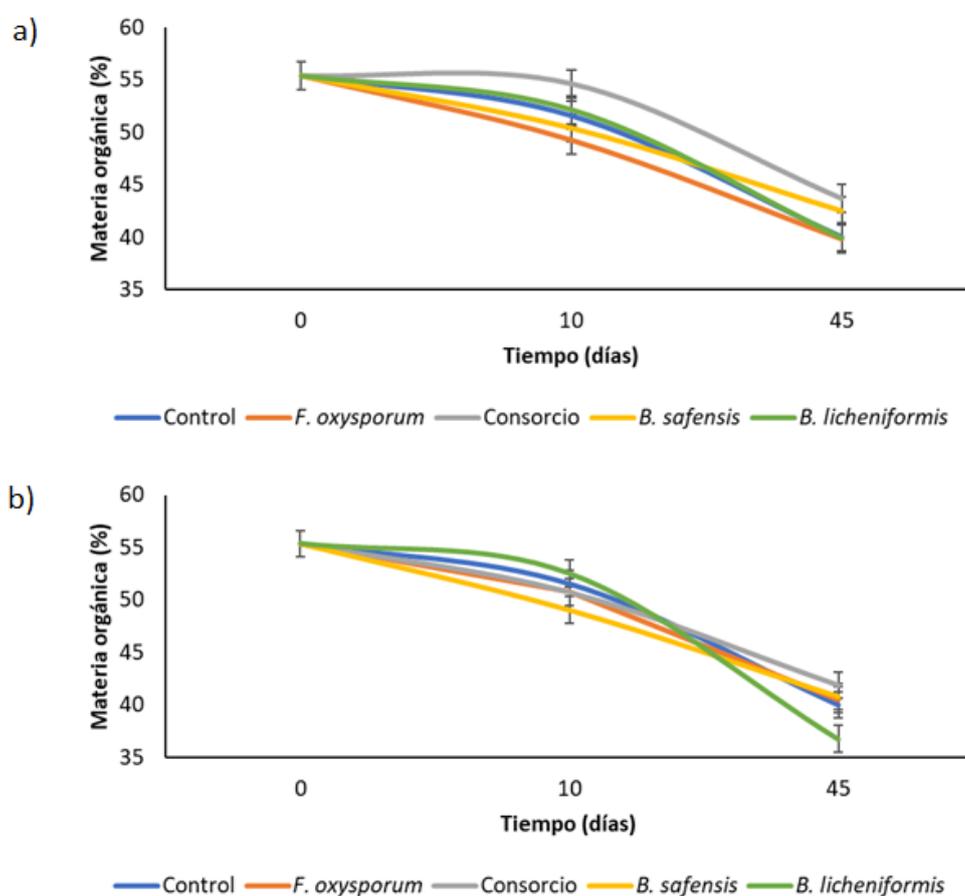


Figura 17. Evolución de la materia orgánica (%) en los inóculos *F. oxysporum*, *B. safensis*, *B. licheniformis*, Consorcio (*F. oxysporum*, *B. safensis*, *B. licheniformis*) y Control (no inoculado) durante los tiempos de muestreo para a) Dosis 1 (10⁶ UFC/g material vegetal) y b) Dosis 2 (10⁴ UFC/g material vegetal).

El análisis de la varianza reveló que el inóculo sólo afectó significativamente a los niveles de materia orgánica obtenidos cuando se empleó la dosis 1, mientras que el tiempo de incubación condujo a variaciones significativas de este parámetro para las dos dosis de inóculo empleadas (Figura 18). Para la dosis 1, se obtuvieron diferencias significativas sólo

entre *F. oxysporum* y el consorcio, de modo que los materiales inoculados con *F. oxysporum* tuvieron un contenido en materia orgánica significativamente inferior a los del consorcio (Figura 18a). Para la dosis 2 no se obtuvieron diferencias entre los distintos inóculos ni con el control no inoculado (Figura 18c). La tendencia fue similar respecto al tiempo para las dos dosis (Figuras 18b y 18d) se observaron diferencias significativas en los tres tiempos de muestreo presentando una tendencia decreciente desde el tiempo inicial hasta los 45 días.

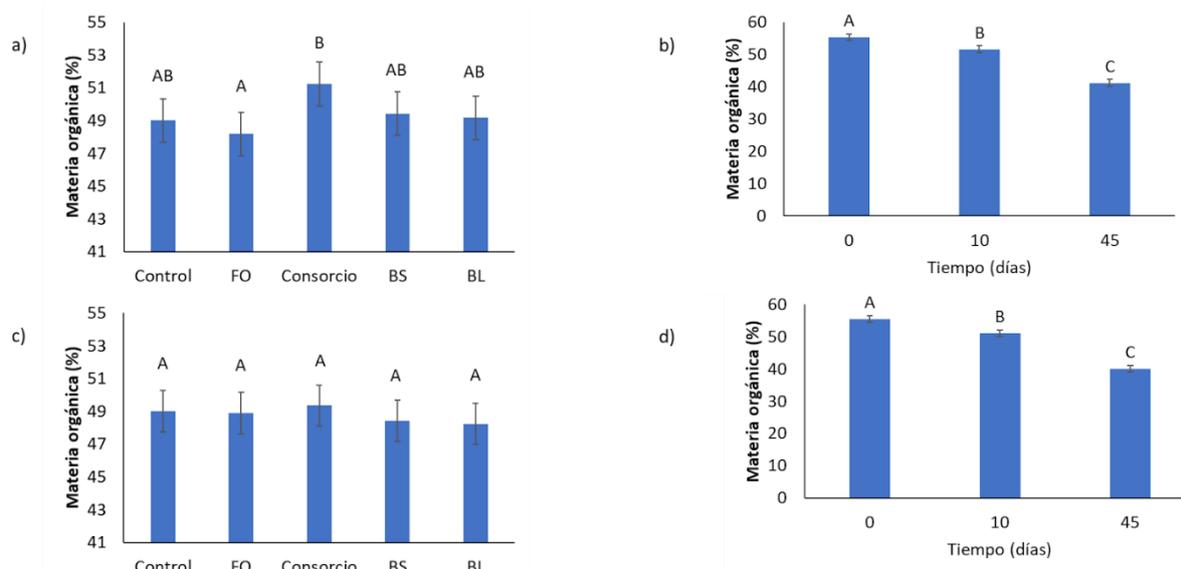


Figura 18. Valores de materia orgánica (%) para la dosis 1 en función del inóculo (a) y el tiempo (b) y para la dosis 2 en función del inóculo (c) y el tiempo (d). Las barras de error muestran el intervalo LSD de Fisher. Valores con la misma letra no son diferentes significativamente ($p < 0,05$).

El compostaje se basa en la transformación de la materia orgánica por acción microbiana en un producto estable conocido como compost. Varios estudios establecen que durante el proceso de compostaje ocurre una disminución de la materia orgánica debido a la acción microbiana, que es más acusada en las primeras fases del proceso y se mantiene con el tiempo hasta alcanzar la etapa de maduración. Durante esta etapa de maduración, se obtiene un producto estable, poniéndole fin a la degradación de la materia orgánica (Nakasaki et al., 2005; Sánchez, 2009).

Este trabajo se centra en la aplicación de un pre-tratamiento del material vegetal previo al compostaje, por lo que no se persigue la estabilización de la materia orgánica. Durante el tratamiento se reduce progresivamente el contenido en materia orgánica debido a la mineralización de la misma a causa de la respiración microbiana (Fornes et al., 2012). No obstante, en el contexto que nos ocupa, sería deseable limitar al máximo la pérdida de materia orgánica, ya que lo que se pretende es más un proceso de modificación de la misma que su reducción. De acuerdo con esto, y considerando los resultados obtenidos, resulta obvio que los inóculos biotransformaron y mineralizaron parcialmente la materia orgánica

contenida en los restos vegetales, pero para limitar al máximo las pérdidas resulta conveniente restringir el tratamiento a 10 días de incubación. Respecto al inóculo, aunque no se apreciaron importantes diferencias entre los diferentes microorganismos incorporados cabe destacar que el consorcio resultó más efectivo en cuanto al mantenimiento de la materia orgánica. Del mismo modo, la dosis de inóculo incorporada tampoco tuvo un efecto drástico por lo que la dosis baja (dosis 2) podría resultar más conveniente al reducir los requerimientos necesarios para implementar el tratamiento.

4.3. Análisis respirométrico

Los índices respirométricos se han utilizado en numerosos estudios como indicadores de la biodegradabilidad de la materia orgánica de diversos sustratos, o de la eficacia de diferentes procesos de tratamiento biológico para la estabilización de la materia orgánica (Moreno y Moral, 2008; Barrena et al. 2011). En este trabajo se ha empleado el índice AT4 que mide el consumo acumulado de oxígeno en 4 días y que de forma global es indicativo de la biodegradabilidad de la muestra.

En la Figura 19 se muestran los resultados obtenidos en las muestras inoculadas con la dosis 1 (Figura 19a) y dosis 2 (Figura 19b) para el parámetro AT4, que mide el consumo acumulado de oxígeno en 4 días. De forma general, en todos los casos se obtuvo una tendencia decreciente para este parámetro con el tiempo de incubación. Para la dosis 1, tras 10 días de incubación se redujo el valor de dicho parámetro en las muestras inoculadas de forma drástica, desde valores iniciales en torno a 25 g/kg a niveles por debajo de 5 g/kg, mientras que en el control no inoculado sólo se redujo casi a la mitad para el mismo tiempo. A los 45 días, se mantuvo la tendencia decreciente en todas las muestras, especialmente aquellas inoculadas con *F. oxysporum* y *B. safensis*, que alcanzaron valores finales casi nulos y por debajo del control. En cambio, para la dosis 2, el muestreo realizado a los 10 días reveló que, a pesar de la tendencia decreciente de las muestras, el tratamiento del consorcio presentó mayor valor de AT4 respecto al control (no inoculado). A los 45 días, las muestras tratadas con los inóculos *B. safensis* y *B. licheniformis* fueron las que menores valores de AT4 presentaron, en ambos casos casi nulos.

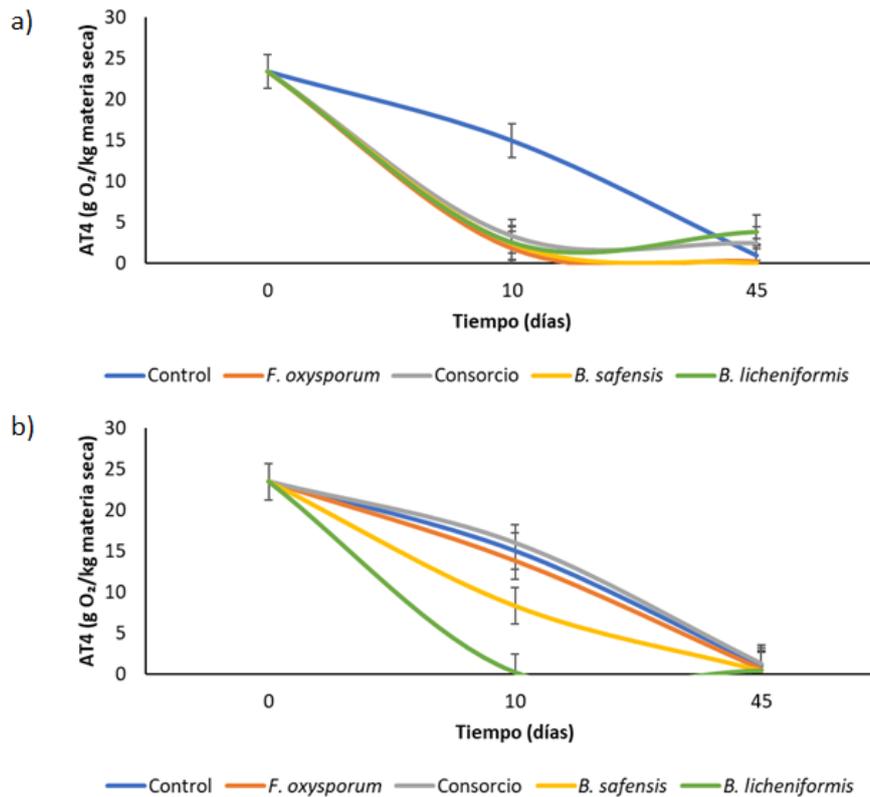


Figura 19. Comparativa de oxígeno consumido durante 4 días (AT4) expresado en gr de O₂ por kg de materia seca en los inóculos *F. oxysporum*, *B. safensis*, *B. licheniformis*, Consorcio (*F. oxysporum*, *B. safensis*, *B. licheniformis*) y Control (no inoculado) durante los tiempos de muestreo para a) Dosis 1 (10⁶ UFC/g material vegetal) y b) Dosis 2 (10⁴ UFC/g material vegetal).

Los resultados del análisis ANOVA multifactorial revelaron que sólo el tiempo tuvo un claro efecto sobre los niveles de AT4 para las dos dosis de inóculo (Figura 20). Para la dosis 1, las muestras inoculadas con *F. oxysporum* y *B. safensis* tuvieron valores de AT4 significativamente inferiores que el control (no inoculado) (Figura 20a), mientras que en para la dosis 2 (Figura 20c) dicho efecto se observó en las muestras inoculadas con *B. licheniformis*. La tendencia del índice AT4 con el tiempo de incubación para las dos dosis (Figuras 20 b y 20d) fue decreciente presentando diferencias significativas entre los tres tiempos. No obstante, en las muestras inoculadas con la dosis 1, dicha reducción fue más acusada a los 10 días de incubación que en las muestras inoculadas con la dosis 2, mientras que en ambos casos los valores finales fueron cercanos a cero.

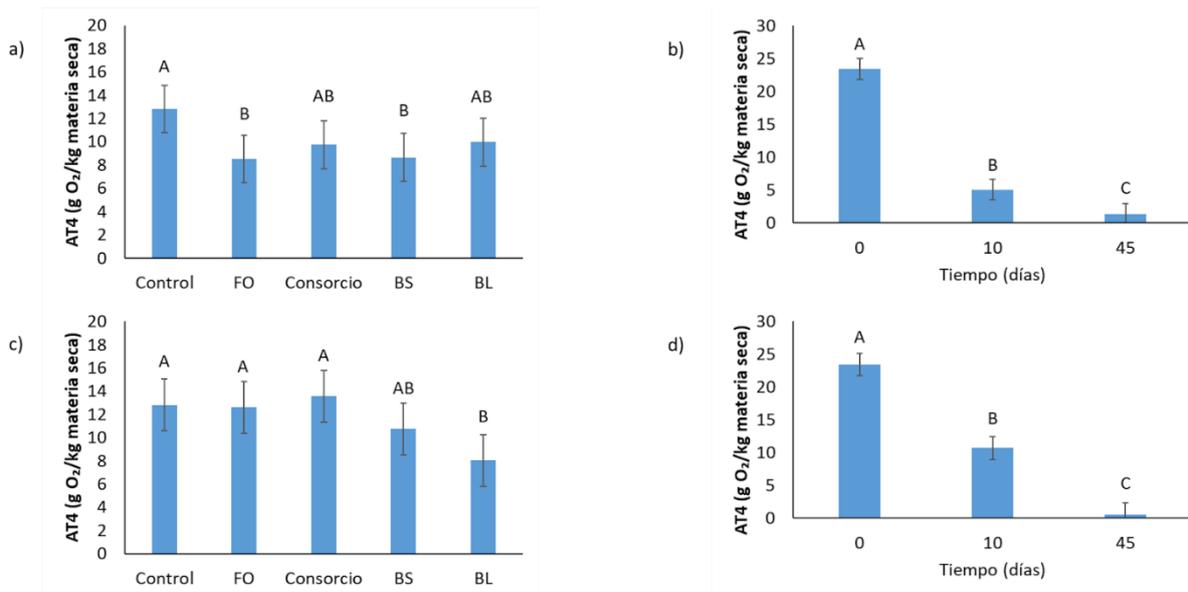


Figura 20. Valores de AT4 (g O₂ consumidos/kg de materia seca) para la dosis 1 en función del inóculo (a) y el tiempo (b) y para la dosis 2 en función del inóculo (c) y el tiempo (d). Las barras de error muestran el intervalo LSD de Fisher. Valores con la misma letra no son diferentes significativamente ($p < 0,05$).

El análisis respirométrico se encuentra directamente relacionado con la actividad metabólica de las poblaciones microbianas y la acción biodegradativa que estos presentan. Elevados niveles de consumo de oxígeno son indicativos de una mayor biodegradabilidad de la materia orgánica y la ralentización de la respiración microbiana ocurre cuando se ha degradado la materia orgánica casi en su totalidad o es menos disponible (Said-Pullicino y Gigliotti, 2007; Barrena et al., 2006). Por lo tanto, el agotamiento del sustrato produce el cese de la actividad microbiana, asumiendo que, a mayor actividad microbiana, mayor consumo de oxígeno y de degradación de la materia orgánica, obteniendo un sustrato estabilizado (Yamada y Kawase, 2006).

De acuerdo con los resultados obtenidos y teniendo en cuenta el objetivo perseguido en este trabajo, el tratamiento de los restos vegetales con dosis elevadas de inóculo (dosis 1) conduce a una indeseable reducción drástica de la biodegradabilidad del material vegetal, ya desde los 10 días de incubación (Figura 19). Esto se debe probablemente a la rápida metabolización de los componentes orgánicos biodegradables del material sometido a tratamiento cuando la carga de inóculo es elevada. Por ello, resulta más adecuado emplear una dosis de inóculo baja (dosis 2), especialmente del consorcio, que permitirá tras 10 días mantener un material biodegradable para su posterior compostaje.

4.4. Contenido en celulosa y hemicelulosa

Como se ha mencionado anteriormente, los residuos vegetales presentan un alto contenido en lignocelulosa, lo que limita parcialmente la biodegradación del material. La aplicación de microorganismos lignocelulolíticos favorece la liberación de moléculas más sencillas fácilmente metabolizables (Zeng et al., 2018).

En la Figura 21 se muestra la evolución de la celulosa en el material vegetal sometido a los distintos tratamientos. La evolución de dicho componente durante el período de incubación siguió un patrón similar independientemente de la dosis de inóculo incorporada, aunque con sensibles diferencias dependiendo del tipo de inóculo incorporado. En general, la celulosa se incrementó desde valores en torno al 2% a tiempo inicial a valores del 10 al 14% a los 10 días de incubación, para posteriormente reducirse hasta alcanzar niveles de alrededor del 6% a los 45 días. En las muestras inoculadas con la dosis 1 (Figura 21a), todas las muestras inoculadas presentaron mayor proporción de celulosa que el control (no inoculado), destacando *F. oxysporum* que alcanzó el mayor porcentaje de celulosa, siendo este del 13,6 %. De forma análoga, para la dosis 2 (Figura 21b), desde el tiempo 0 a los 10 días todas las muestras aumentaron el porcentaje en celulosa superando el valor del control, excepto en *B. safensis* que presentó un 1 % menos de celulosa que este. Por el contrario, a los 45 días, al igual que para la dosis 1, las muestras redujeron el contenido en celulosa salvo en el caso de las muestras inoculadas con *B. safensis* cuyos niveles de celulosa fueron casi un 3 % superiores que los del resto de tratamientos, incluido el control (no inoculado).

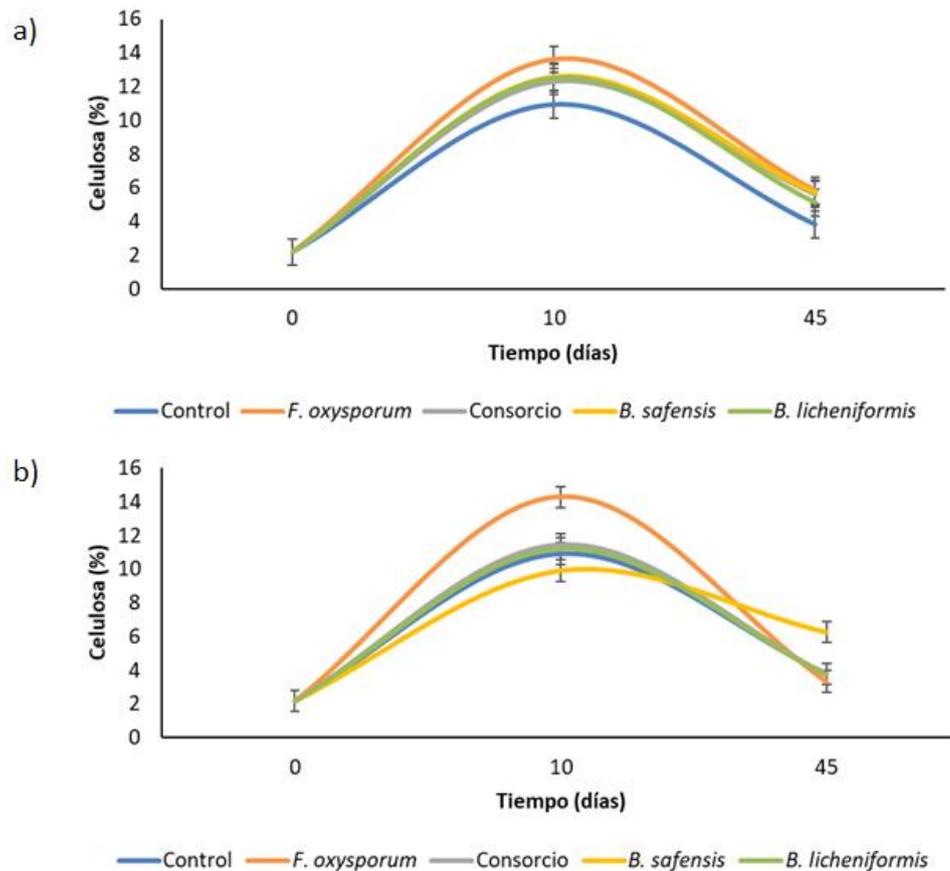


Figura 21. Evolución de la presencia de celulosa (%) en los inóculos *F. oxysporum*, *B. safensis*, *B. licheniformis*, Consorcio (*F. oxysporum*, *B. safensis*, *B. licheniformis*) y Control (no inoculado) durante los tiempos de muestreo para a) Dosis 1 (10^6 UFC/g material vegetal) y b) Dosis 2 (10^4 UFC/g material vegetal).

El análisis de la varianza reveló que el inóculo tuvo un efecto sobre los niveles de celulosa sólo cuando se empleó la dosis 1, mientras que el tiempo tuvo un claro efecto sobre la variación del contenido en celulosa de las muestras inoculadas con cualquiera de las dosis (Figura 22), tal y como cabría esperar de acuerdo con el patrón descrito anteriormente. En la dosis 1 (Figura 22a) se observaron diferencias significativas entre el control (no inoculado) y *F. oxysporum*, alcanzando estas últimas muestras mayores niveles de celulosa que el control. En cuanto al tiempo, en las dos dosis la celulosa se incrementó a los 10 días y posteriormente se redujo significativamente.

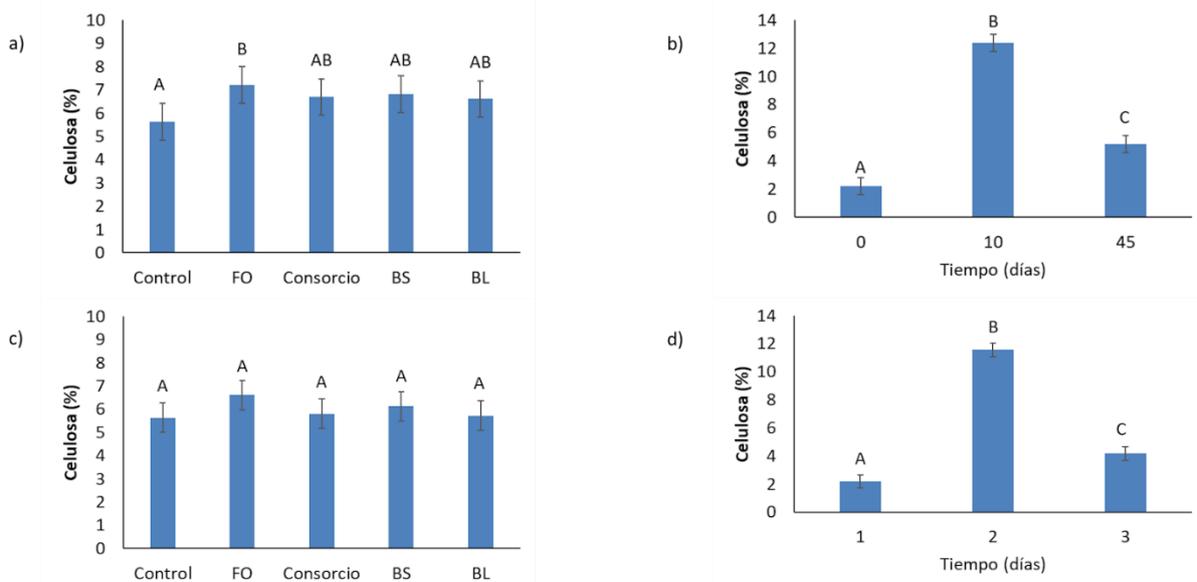


Figura 22. Valores de la celulosa (%) para la dosis 1 en función del inóculo (a) y el tiempo (b) y para la dosis 2 en función del inóculo (c) y el tiempo (d). Las barras de error muestran el intervalo LSD de Fisher. Valores con la misma letra no son diferentes significativamente ($p < 0,05$).

En la Figura 23 se muestra la evolución del contenido en hemicelulosa en las muestras sometidas a los distintos tratamientos. Al igual que se observó para el caso de la celulosa, este polímero también se incrementó durante los primeros 10 días de incubación para luego reducirse hasta alcanzar valores a los 45 días que siguieron siendo mayores que los iniciales. Sin embargo, en contraste con aquella, se obtuvieron diferencias notables entre las muestras inoculadas y el control no inoculado. Para la dosis 1 (Figura 23a), en todas las muestras inoculadas se observó un mayor aumento respecto al control, destacando las muestras tratadas con el consorcio que alcanzaron el mayor valor con un 12 % de hemicelulosa. Para el tiempo a 45 días, la disminución no fue tan pronunciada como en el caso de la celulosa, como se ha indicado, salvo en la muestra inoculada con *F. oxysporum* en la que se redujo la hemicelulosa hasta un 2 % menos que el control. Para la dosis 2 (Figura 23b), a los 10 días de incubación, las muestras inoculadas presentaron un mayor incremento del contenido en hemicelulosa respecto del control, destacando en este caso las muestras tratadas con *B. safensis* que tuvieron 11 % de hemicelulosa. En cambio, a los 45 días, en todas las muestras se redujo el contenido de hemicelulosa, excepto en las muestras tratadas con el consorcio, en las que dicho polímero se incrementó en un 3 % respecto a los valores obtenidos a los 10 días.

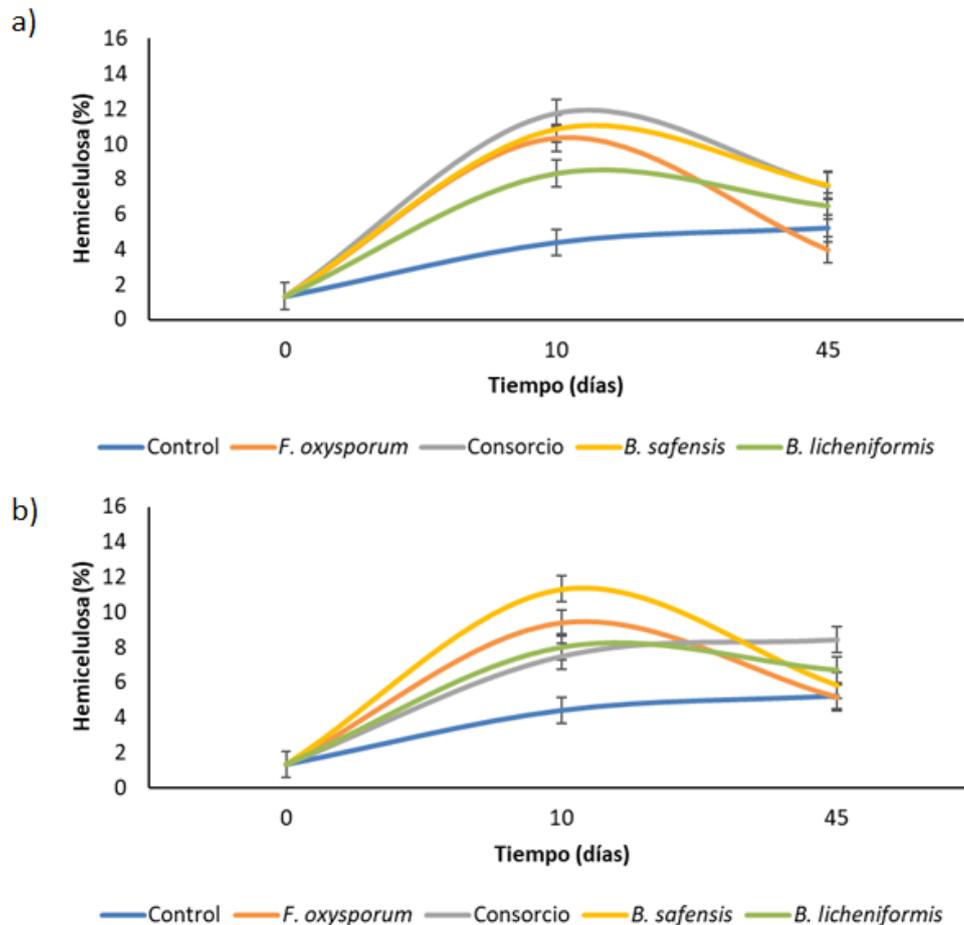


Figura 23. Evolución de la presencia de hemicelulosa (%) en los inóculos *F. oxysporum*, *B. safensis*, *B. licheniformis*, Consorcio (*F. oxysporum*, *B. safensis*, *B. licheniformis*) y Control (no inoculado) durante los tiempos de muestreo para a) Dosis 1 (10^6 UFC/g material vegetal) y b) Dosis 2 (10^4 UFC/g material vegetal).

El análisis estadístico ANOVA multifactorial reveló que tanto el inóculo como el tiempo afectaron significativamente a los niveles alcanzados de hemicelulosa. Todas las muestras inoculadas tuvieron niveles de hemicelulosa significativamente superiores que las muestras no inoculadas (Figura 24). Cuando se empleó la dosis 1, el tratamiento con el consorcio presentó los mayores valores de hemicelulosa respecto a los otros inóculos, mientras que no hubo diferencias significativas entre inóculos cuando se empleó la dosis 2. Referido al tiempo, ambas dosis (Figuras 24b y 24d) reflejaron la misma tendencia ya descrita, observándose diferencias significativas entre los tres tiempos de muestreo.

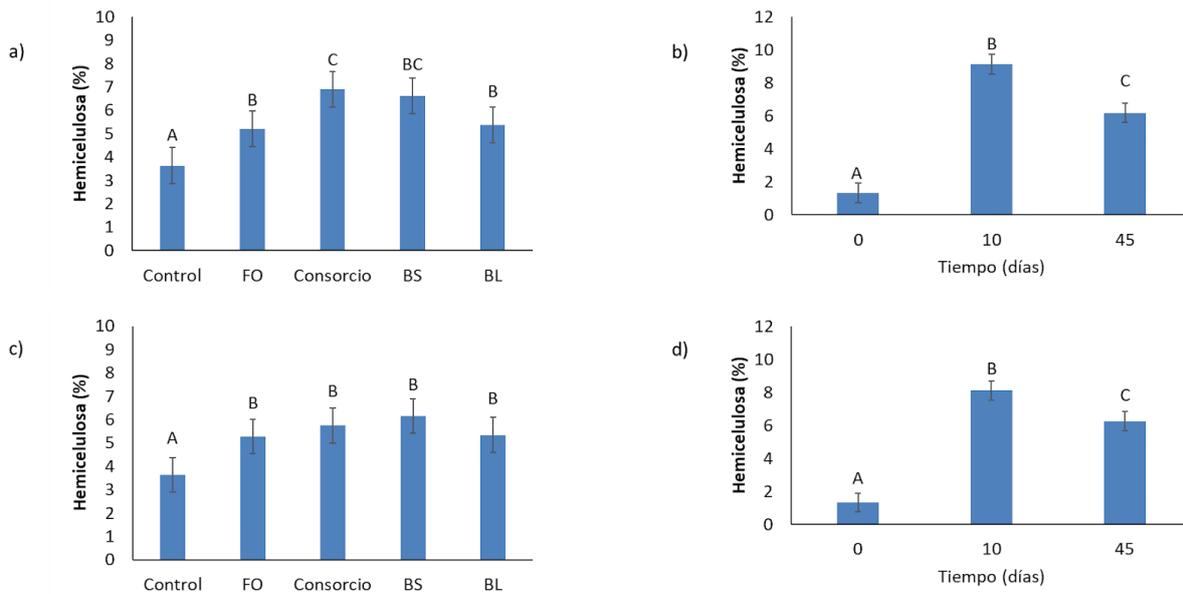


Figura 24. Valores de hemicelulosa (%) para la dosis 1 en función del inóculo (a) y el tiempo (b) y para la dosis 2 en función del inóculo (c) y el tiempo (d). Las barras de error muestran el intervalo LSD de Fisher. Valores con la misma letra no son diferentes significativamente ($p < 0,05$).

La lignocelulosa es un biopolímero constituido por celulosa, hemicelulosa y lignina estructurada mediante entrecruzamientos confiriéndole resistencia a la degradación (Ribeiro et al., 2017). Como posible solución se propone la utilización de microorganismos ligninolíticos capaces de sintetizar enzimas que hidrolizan y oxidan estos polímeros, destacando los inoculantes fúngicos por presentar un perfil enzimático idóneo para la degradación de residuos lignocelulósicos (Vallejos, 2013 y Suryadi et al., 2022).

Un estudio paralelo al que se presenta en este Trabajo Fin de Grado en el que se analizó el contenido en lignina de las muestras reveló que el contenido en lignina disminuía progresivamente con el tiempo de incubación (Bello, 2022). Dicha variación explica el incremento en el contenido tanto de celulosa como de hemicelulosa obtenido en este trabajo, dado que, como componentes globales de las fibras, la disminución de uno de los mismos lleva aparejado el incremento de los otros. Otros estudios reportan que la aplicación de inóculos microbianos como hongos filamentosos en material lignocelulósico como pretratamiento favorece la degradación de la lignina mediante la producción de enzimas que rompen los enlaces presentes entre los tres componentes de la lignocelulosa además de la propia molécula (Suryadi et al., 2022; Hubbe et al., 2010). Estos procesos resultan adecuados para el objetivo que nos ocupa, ya que dichas transformaciones facilitarían el ataque microbiano posterior y, por tanto, son indicativos de la eficacia del tratamiento propuesto. Por otra parte, la disminución ocurrida tras el primer tiempo de muestreo para el contenido en celulosa y hemicelulosa puede deberse a la actuación microbiana de las cepas sobre la

celulosa y la hemicelulosa una vez se ha estabilizado la degradación de la lignina. Por tanto, nuevamente resulta idóneo restringir el tratamiento a 10 días.

4.5. Análisis multiparamétrico

Para determinar las relaciones existentes entre los distintos parámetros analizados se realizó un análisis de correlación que reveló, como se esperaba, la existencia de correlación positiva entre AT4 y materia orgánica, así como entre el contenido en celulosa y hemicelulosa (Figura 25), dada la estrecha relación existente entre ambas parejas de parámetros cuya tendencia similar se ha puesto de manifiesto en los apartados anteriores.

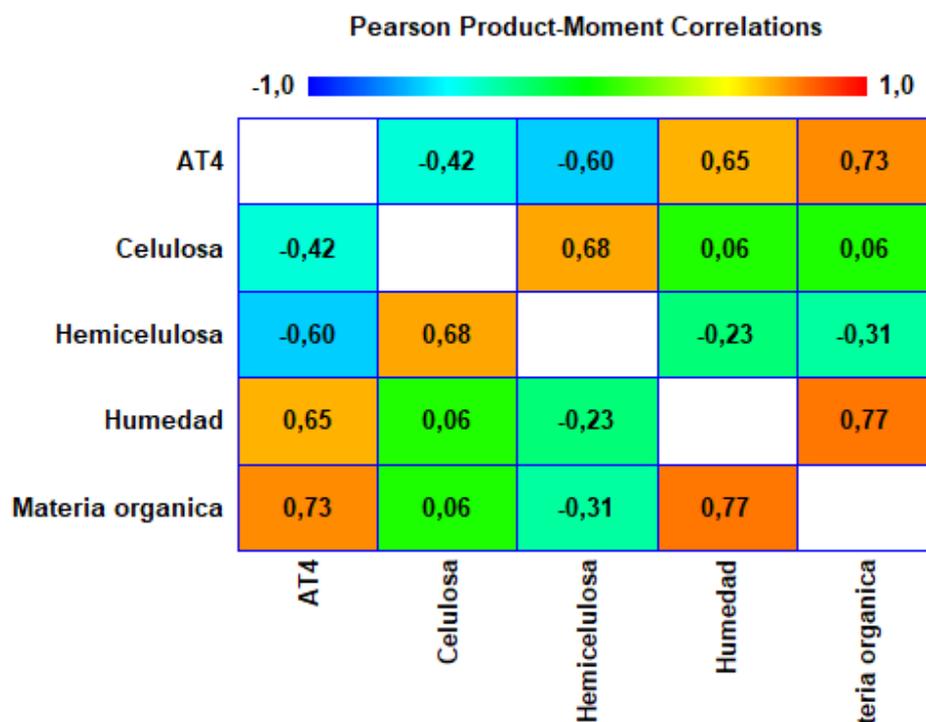


Figura 25. Análisis de correlación de Pearson entre los parámetros analizados.

El análisis discriminante empleando como criterio de clasificación el tiempo de tratamiento permitió obtener dos funciones que explicaron el 100% de la variabilidad y que agruparon los datos en tres clusters bien definidos para cada tiempo de tratamiento (Figura 26), lo que refleja las tendencias descritas para cada parámetro con respecto al tiempo de incubación.

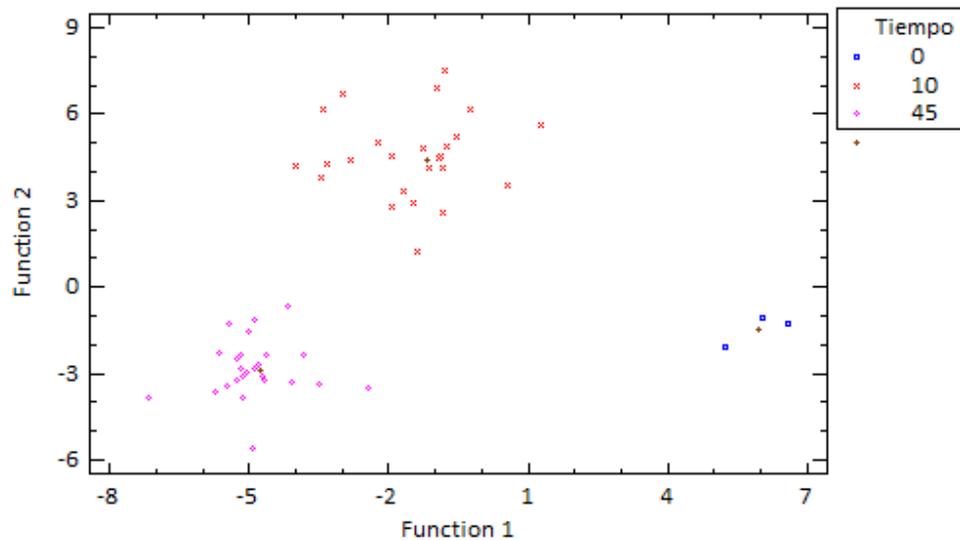


Figura 26. Análisis de componentes principales para los parámetros humedad, materia orgánica, AT4, celulosa y hemicelulosa.

Finalmente, con intención de abordar un enfoque global se realizó un análisis de componentes principales, obteniendo dos componentes que explicaron un 87% de la variabilidad (Figura 27). En el componente 1 (56% de la varianza) las variables más influyentes fueron el índice AT4 y materia orgánica junto con humedad en sentido opuesto a la hemicelulosa, lo que revela la estrecha relación existente entre la posible modificación de este polímero como principal responsable de las variaciones observadas en materia orgánica y biodegradabilidad expresada por el índice AT4. Por tanto, este componente estaría relacionado con el proceso transformativo llevado a cabo por los inóculos sobre los restos vegetales. En el componente 2 (31% de la varianza) la variable más influyente fue el contenido en celulosa, que podría explicar el resto de variaciones experimentadas por los restos vegetales durante su biotransformación y que no afectarían a otros parámetros distintos de la biodegradabilidad.

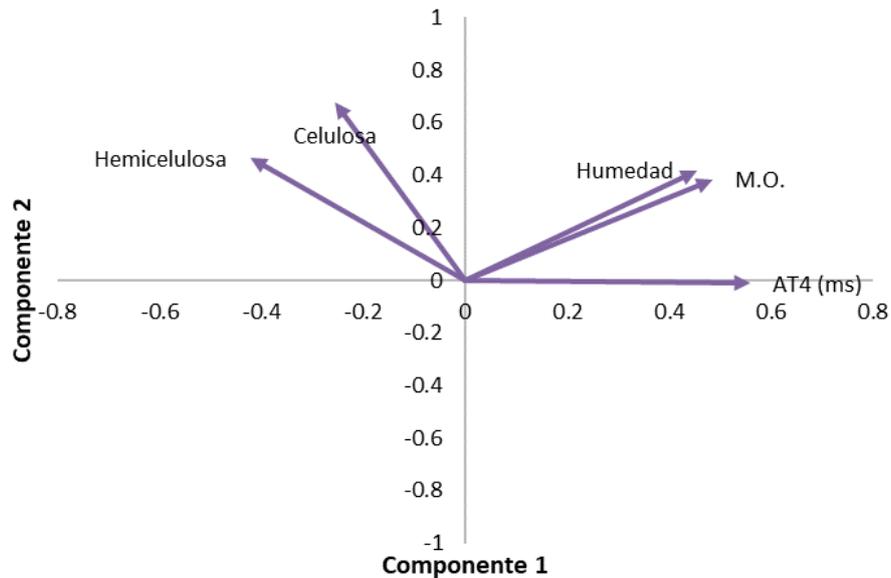


Figura 27. Análisis de componentes principales para los parámetros humedad, materia orgánica, AT4, celulosa y hemicelulosa.

5. Conclusiones

A continuación se enumeran las conclusiones obtenidas tras la realización de este trabajo:

1. La inoculación de residuos vegetales con microorganismos lignocelulolíticos se propone como un protocolo sostenible para el tratamiento de residuos vegetales previo al proceso de compostaje.
2. La bioactivación de los residuos lignocelulósicos depende del tratamiento de inoculación empleado, de la dosis de inóculo aplicada y del tiempo de incubación establecido.
3. Dosis elevadas de inoculante microbiano no son adecuadas para la bioactivación de restos vegetales previo a su compostaje debido a que producen una disminución pronunciada de la biodegradabilidad, por lo que resulta más adecuado aplicar el inóculo en baja concentración para favorecer la posterior actividad microbiana.
4. El tratamiento con *F. oxysporum* resulta eficaz para liberar celulosa de la matriz lignocelulosa lo que puede facilitar el posterior proceso de compostaje.
5. La aplicación en residuos vegetales tanto de *F. oxysporum* como del consorcio microbiano elaborado a partir de las cepas *B. safensis*, *B. licheniformis* y *F. oxysporum* en un tiempo de incubación de 10 días, resulta eficaz como tratamiento previo al compostaje para la bioactivación de residuos lignocelulósicos.

6. Financiación

Este trabajo ha sido financiado gracias al proyecto UAL2020-BIO-B1964 (Programa Operativo FEDER Andalucía 2014-2020, Consejería de Economía, Conocimiento, Empresa y Universidad).



7. Bibliografía

- Agnew, J.M. & Leonard, J.J. (2013). The physical properties of compost. *Compost Science & Utilization*, 11(3): 238-264.
- Barrena, R., Vázquez, F. & Sánchez, A. (2006). The use of respiration indices in the composting process: a review. *Waste Management*, 24: 37-47.
- Barrena, R., Turet, J., Busquets, A., Farrés, M., Font, X. & Sánchez, A. (2011). Respirometric screening of several types of manure and mixtures intended for composting. *Bioresource Technology*, 102(2): 1367-1377.
- Barres, T. (2012). Producción y consumo sostenibles y residuos agrarias. *Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente. Madrid, Spain*.
- Barros, J., Serk, H., Granlund, I. & Pesquet, E. (2015). The cell biology of lignification in higher plants. *Annals of Botany*, 115(7): 1053-1074.
- Bello, M.M. (2022). *Bioactivación de residuos lignocelulósicos como tratamiento previo al proceso de compostaje* (Trabajo de Fin de Grado). Universidad de Almería. Almería.
- Bian, B., Hu, X., Zhang, S., Lv, C., Yang, Z., Yang, W. & Zhang, L. (2019). Pilot-scale composting of typical multiple agricultural wastes: Parameter optimization and mechanisms. *Bioresource Technology*, 287: 121482.
- Bidlack, J., Malone, M. & Benson, R. (1992). Molecular structure and component integration of secondary cell walls in plants. *Proceedings of the Oklahoma Academy of Science*, 72: 51-56.
- Carbajo, J.M. (2015). *Utilización de hongos de podredumbre blanca en la producción de pasta de celulosa de alto rendimiento* (Tesis Doctoral). Universidad Complutense de Madrid. Madrid.
- Castro, Y. (2013). *Estudio de la bioquímica de las enzimas lignocelulolíticas* (Trabajo de Fin de Grado). Universidad Católica de Manizales. Colombia.
- Ceccon, E. (2008). La revolución verde: tragedia en dos actos. *Ciencias*, 91(91): 21-29.
- Chávez-Sifontes, M. & Domine, M.E. (2013). Lignina, estructura y aplicaciones: métodos de despolimerización para la obtención de derivados aromáticos de interés industrial. *Avances en ciencias e ingeniería*, 4(4): 15-46.
- Collins, T., Gerday, C. & Feller, G. (2005). Xylanases, xylanase families and extremophilic xylanases. *FEMS Microbiology Reviews*, 29(1), 3-23.
- Egea, F. J., Torrente, R. G. & Aguilar, A. (2018). An efficient agro-industrial complex in Almería (Spain): Towards an integrated and sustainable bioeconomy model. *New Biotechnology*, 40: 103-112.
- FAO (2005). El estado mundial de la agricultura y la alimentación. *Colección FAO: Agricultura* (36). ISSN 0251-1371.
- Fornes, F., Mendoza-Hernández, D., García de la Fuente, R., Abad, M. & Belda, R.M. (2012). Composting versus vermicomposting: a comparative study of organic matter evolution through straight and combined processes. *Bioresource Technology*, 118: 296-305.

- Goering, H.K. & Van Soest, P.J. (1970). *Forage fiber analyses (apparatus, reagents, procedures, and some application)*, (379). US Agricultural Research Service.
- Gómez, L.J. (2013). La Revolución Verde en el contexto de la «crisis ambiental». *I. Historia de la revolución verde*, 3(3): 49-61.
- Guo, R., Li, G., Jiang, T., Schuchardt, F., Chen, T., Zhao, Y. & Shen, Y. (2012). Effect of aeration rate, C/N ratio and moisture content on the stability and maturity of compost. *Bioresource Technology*, 112: 171-178.
- Hubbe, M.A., Nazhad, M. & Sánchez, C. (2010). Composting of lignocellulosics. *BioResources*, 5(4): 2808-2854.
- Ijoma, G. N., & Tekere, M. (2017). Potential microbial applications of co-cultures involving ligninolytic fungi in the bioremediation of recalcitrant xenobiotic compounds. *International Journal of Environmental Science and Technology*, 14(8): 1787-1806.
- Jurado, M. M., Suárez-Estrella, F., Vargas-García, M. C., López, M. J., López-González, J. A., & Moreno, J. (2014). Increasing native microbiota in lignocellulosic waste composting: Effects on process efficiency and final product maturity. *Process Biochemistry*, 49(11): 1958-1969.
- López-González, J. A., Suárez-Estrella, F., Vargas-García, M. C., López, M. J., Jurado, M. M., & Moreno, J. (2015). Dynamics of bacterial microbiota during lignocellulosic waste composting: studies upon its structure, functionality and biodiversity. *Bioresource Technology*, 175: 406-416.
- López-Hernández, J.C., Pérez-Martínez & C., Acien-Fernández, F.G. (2016). Residuos vegetales procedentes de los invernaderos de Almería. *Publicaciones Cajamar Caja Rural* (17): 1-9.
- Mediterráneo, G.E. (1998). Propuestas para la reducción y gestión de los residuos agrícolas en el poniente almeriense.
- Miles, A.A., Misra, S.S. & Irwin, J.O. (1938). The estimation of the bactericidal power of the blood. *Epidemiology & infection*, 38(6): 732-749.
- Miteco (2021). Encuesta sobre superficies y rendimientos de cultivos. *Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente. Madrid, Spain*.
- Moreno J. (2002). *Biotransformación de Residuos Vegetales: Determinación de Condiciones Óptimas para Escalado a Nivel Industrial* (Informe final Proyecto 1FD1997-1389, FEDER). Escuela Politécnica Superior, Universidad de Almería. Almería.
- Moreno, J. & Moral, R. (2008). *Compostaje*. Mundi-Prensa Libros.
- Mussatto, S.I., Fernandes, M., Milagres, A.M. & Roberto, I.C. (2008). Effect of hemicellulose and lignin on enzymatic hydrolysis of cellulose from brewer's spent grain. *Enzyme and Microbial Technology*, 43(2): 124-129.
- Nakasaki, K., Nag, K. & Karita, S. (2005). Microbial succession associated with organic matter decomposition during thermophilic composting of organic waste. *Waste Management & Research*, 23(1): 48-56.

- NASA (2011). Almería, Spain. *U.S./Japan Science Team*.
<https://www.jpl.nasa.gov/images/pia14146-almeria-spain> (Consultado el 25/05/2022).
- Negro, M. J., Villa, F., Aibar, J., Aracón, R., Ciria, P., Cristóbal, M.V., ... & Zaragoza, C. (2000). Producción y gestión del compost. *CIEMAT*: 1-31. *Recuperado de* <http://hdl.handle.net/10261/16792>.
- Ovando-Chacón, S.L. & Waliszewski, K.N. (2005). Preparativos de celulasas comerciales y aplicaciones en procesos extractivos. *Universidad y Ciencia*, 21(42): 113-122.
- Pérez, J., Muñoz-Dorado, J., de la Rubia, T. & Martínez, J. (2002). Biodegradation and biological treatments of cellulose, hemicellulose and lignin: an overview. *International Microbiology*, 5(2): 53-63.
- Ponsá, S., Gea, T. & Sánchez, A. (2010). Different indices to express biodegradability in organic solid wastes. *Journal of Environmental Quality*, 39(2): 706-712.
- Quintero, J.C., Feijoo, G. & Lema, J.M. (2006). Producción de enzimas ligninolíticas con hongos basidiomicetos cultivados sobre materiales lignocelulósicos. *Vitae*, 13(2): 61-67.
- Ribeiro, N.D.Q., Souza, T.P., Costa, L.M.A.S., Castro, C.P.D. & Dias, E.S. (2017). Microbial additives in the composting process. *Ciência e agrotecnologia*, 41: 159-168.
- Safigueroa, M., Giráldez, F.J., Gómez, A., López, S. & Mantecón, Á.R. (1999). Determinación en forrajes del contenido en fibra neutro detergente y de sus componentes: validación del método ANKOM. *ITEA*, 20(2): 556-558.
- Said-Pullicino, D. & Gigliotti, G. (2007). Oxidative biodegradation of dissolved organic matter during composting. *Chemosphere*, 68(6): 1030-1040.
- Sánchez, C. (2009). Lignocellulosic residues: biodegradation and bioconversion by fungi. *Biotechnology Advances*, 27(2): 185-194.
- Suárez-Estrella, F., Vargas-García, C., López, M. J., Capel, C., & Moreno, J. (2007). Antagonistic activity of bacteria and fungi from horticultural compost against *Fusarium oxysporum* f. sp. melonis. *Crop Protection*, 26(1): 46-53.
- Suryadi, H., Judono, J.J., Putri, M.R, Eclessia, A.D., Ulhaq, J.M., Agustina, D.N. & Sumiati, T. (2022). Biodelignification of lignocellulose using ligninolytic enzymes from white-rot fungi. *Heliyon*, 8(2), e08865.
- Szijártó, N., Szengyel, Z., Lidén, G. & Réczey, K. (2004). Dynamics of cellulase production by glucose grown cultures of *Trichoderma reesei* Rut-30 as a response to addition of Cellulose. En: Finkelstein, M., McMillan, J.D., Davison, B.H., Evans, B. (eds) *Proceedings of the twenty-fifth symposium on biotechnology for fuels and chemicals held May 4-7, 2003, in Breckenridge, CO* (pp. 115-124). Totowa, NJ. Humana Press. ISBN 978-1-59259-837-3.
- Tengerdy, R.P. & Szakacs, G. (2003). Bioconversion of lignocellulose in solid substrate fermentation. *Biochemical Engineering Journal*, 13(2-3): 169-1979.
- Tuomela M., Vikman M., Hatakka A. & Itävaara M. (2000). Biodegradation of lignin in a compost environment: a review. *Bioresource Technology*, 72(2): 169-183.

- Vallejos, N. (2013). Degradación de residuos vegetales mediante inoculación con cepas microbianas. *Enfoque UTE*, 4(1): 1-13.
- Yamada, Y. & Kawase, Y. (2006). Aerobic composting of waste activated sludge: Kinetic analysis for microbiological reaction and oxygen consumption. *Waste Management*, 26(1): 49:61.
- Yang, X., Zhu, K., Loik, M. E., & Sun, W. (2021). Differential responses of soil bacteria and fungi to altered precipitation in a meadow steppe. *Geoderma*, 384: 114812.
- Zeng, Z., Guo, X., Xu, P., Xiao, R., Huang, D., Gong, X., ... & Zeng, G. (2018). Responses of microbial carbon metabolism and function diversity induced by complex fungal enzymes in lignocellulosic waste composting. *Science of the Total Environment*, 643: 539-547.